

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

**Genetik und Pathobiochemie
neuer und atypischer Formen
neuronaler Ceroid-Lipofuszinosen**

Vorgelegt von
Dipl.-Biologin

Anne-Hélène Lebrun

aus Sainte-Catherine (Frankreich)

im Department Biologie,
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. T. BRAULKE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. D. WARNECKE
Tag der Disputation: 07. August 2009

Hamburg, den 23. Juli 2009



Jörg Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Braulke
2. Gutachter: PD Dr. D. Warnecke

Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt von Nächstenliebe e.V. und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHU1597/2-1).

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen.....	1
1.1.1 Allgemein.....	1
1.1.2 CLN1.....	4
1.1.3 CLN2.....	4
1.1.4 CLN3.....	4
1.1.5 CLN4.....	8
1.1.6 CLN5.....	9
1.1.7 CLN6.....	9
1.1.8 CLN7.....	10
1.1.9 CLN8.....	10
1.1.10 CLN9.....	11
1.1.11 CLN10	11
1.1.12 Chloridkanal-(CLC)-Familie	12
1.1.13 Unbekannte NCL-Formen	13
1.2 Zielsetzung	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte.....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel	17
2.1.4 Enzyme und Molekulargewichtstandards	19
2.1.5 Kits und Assays	20
2.1.6 Primer und Sonden.....	20
2.1.7 <i>E.coli</i> -Stamm	21
2.1.8 Humane cDNA-Klone.....	21
2.1.9 Antikörper.....	22
2.1.10 Medien, Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur	23
2.1.11 Zelllinien	23

2.1.12 Patientenproben und Kontrollen	23
2.1.12.1 Familie 1.....	23
2.1.12.2 Familie 2.....	24
2.1.12.3 Familie 3.....	24
2.1.12.4 CLN3-Patienten und Kontrollen	25
2.1.12.5 Kontroll-DNAs.....	25
2.2 Zellbiologische Methoden	26
2.2.1 Lymphozyten-Isolierung aus humanem Blut.....	26
2.2.2 Kultivierung von Zellen	26
2.2.3 Trypsinieren von Zellen	26
2.2.4 Konservierung und Revitalisierung von Zellen.....	27
2.2.5 Transiente Transfektion von Zellen	27
2.2.6 Inaktivierung des Proteasoms	28
2.2.7 Transfektion von siRNA in HeLa-Zellen	28
2.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse	28
2.3 Biochemische Methoden	30
2.3.1 Herstellung von Lysaten aus Zellen	30
2.3.2 Homogenisierung von Mäuse-Geweben	31
2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	31
2.3.4 Messung von Enzymaktivitäten	31
2.3.4.1 Cathepsin D.....	31
2.3.4.2 β -Hexosaminidase-Aktivität.....	32
2.3.5 Deglykosylierung von Proteinen.....	33
2.3.5.1 N-Glykosidase F (PNGaseF).....	33
2.3.5.2 Endoglykosidase H (EndoH)	33
2.3.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.3.7 Western-Blot-Analyse	35
2.4 Molekularbiologische Methoden	36
2.4.1 Isolierung humaner genomischer DNA.....	36
2.4.2 RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen	36
2.4.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	36
2.4.4 Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen.....	37
2.4.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
2.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
2.4.7 Mikrobiologie	38
2.4.7.1 Anzucht von <i>E. coli</i> und Lagerung	38
2.4.7.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	38
2.4.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	39

2.4.8 PCR und Anwendungen	39
2.4.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.4.8.2 Ortsspezifische Mutagenese.....	40
2.4.8.3 Sequenzierung von DNA.....	40
2.4.8.4 cDNA-Synthese.....	41
2.4.8.5 Quantitative Real-Time PCR.....	41
2.4.9 Genetische Kopplungsanalyse (<i>genetic linkage analysis</i>)	43
2.4.9.1 Prinzip.....	43
2.4.9.2 Methode.....	44
2.4.9.3 Analyse.....	45
2.4.10 DNA-Microarray	45
3 ERGEBNISSE	46
3.1 Etablierung des Cathepsin D-Tests	46
3.2 Identifikation von Genmutationen mittels genetischer Kopplungsanalyse	49
3.2.1 Ausschluss bekannter Gen- und Protein-Defekte	50
3.2.2 Identifikation einer homozygoten Mutation im <i>Neurabin-I</i>-Gen	52
3.2.2.1 Identifikation von vier potentiell homozygoten Genregionen durch genetische Kopplungsanalyse	52
3.2.2.2 Mutation in <i>PPP1R9A</i>	53
3.2.2.3 Bestimmung der Allelfrequenz der Mutation	55
3.2.2.4 Expressionsstudie der p.Asp368Asn-Mutation in Neurabin-I.....	56
3.2.2.5 Intrazelluläre Lokalisation des Neurabin-I	57
3.2.3 Atypische Formen von CLN5	60
3.2.3.1 Identifizierung einer Mutation in einem bekannten <i>NCL</i> -Gen	60
3.2.3.2 Identifizierung einer zweiten unbekanntenen Mutation im <i>CLN5</i> -Gen.....	62
3.2.3.3 Expressionsstudie mutanter CLN5-Proteine	63
3.2.3.4 Intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp- und mutanten CLN5-Proteine	64
3.3 Identifikation von „<i>modifier genes</i>“ der juvenilen NCL	66
4 DISKUSSION	75
4.1 Neue Genmutationen führen zu NCL bzw. NCL-ähnlichen Krankheiten	75
4.1.1 Bekannte Gen- und Protein-Defekte sind ausgeschlossen	75
4.1.2 Mutation im <i>Neurabin-I</i>-Gen bei Patienten mit NCL-ähnlicher Krankheit	79
4.1.2.1 Identifizierung der ersten pathogenetischen Mutation im <i>Neurabin-I</i> -Gen.....	79
4.1.2.2 Expression der Neurabin-I-Mutante p.Asp368Asn.....	81
4.1.2.3 Neurabin-I und seine potentielle Rolle bei Neurodegeneration	83
4.1.3 Atypische CLN5-Formen in asiatischen NCL-Patienten	85
4.1.3.1 Zwei neue <i>CLN5</i> -Mutationen bei asiatischen Patienten	85
4.1.3.2 Glykosylierungsmuster bei CLN5-Wildtyp und -Mutanten	86
4.1.3.3 ER-Retention mutanter CLN5-Polypeptide	87

4.2 Identifikation von CLN3-„ <i>modifier genes</i> “	89
4.2.1 <i>CDC42SE2</i> und <i>DUSP2</i> -Dysregulation bei CLN3-Patienten	90
4.2.2 <i>MARCKS</i> , <i>SPIB</i> , <i>RAPGEF1</i> und <i>BACE2</i>	92
4.2.3 Dysregulierte Expression lysosomaler und NCL-assoziiierter Gene bei CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion	95
5 ZUSAMMENFASSUNG	97
6 ANHANG.....	100
6.1 Primer und besondere PCR-Programme.....	100
6.1.1 <i>Neurabin-I</i>	100
6.1.2 <i>CLN5</i>	100
6.1.3 <i>CLN6</i>	101
6.1.4 <i>Calpain 9</i>	102
6.1.5 <i>TMEM78</i>	103
6.2 Überprüfte Kandidatengene in der Familie 1	104
6.3 Stark-dysregulierte Gene bei CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion	105
7 LITERATURVERZEICHNIS	108
8 PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	115
DANKSAGUNG	115

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Wildtyp-CLN3 und mögliche Transkripte nach 1,02 kb-Deletion.	5
Abb. 2	Anwendung des Hamburger-Scoring-Systems anhand von zwei CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion (Kohlschütter <i>et al.</i> , 1988).....	6
Abb. 3	Putatives Modell des CLN3-Proteins.	7
Abb. 4	Schematische Darstellung zur Durchführung des <i>Gene Mapping (Affymetrix)</i>	44
Abb. 5	Spezifische Aktivität von Cathepsin D in Leber-Extrakten von Wildtyp- und <i>CtsD</i> -defizienten Mäusen.	46
Abb. 6	Proteinmenge-Linearitätsbestimmung der spezifischen Aktivität von Cathepsin D in Leber-Homogenat aus einer Wildtyp-Maus.....	47
Abb. 7	Zeit-Linearitätsbestimmung der spezifischen Aktivität von Cathepsin D in Leber-Homogenat aus einer Wildtyp-Maus.....	48
Abb. 8	Spezifische Cathepsin D-Aktivität in vier Fibroblasten-Zelllinien gesunder Kontrollen.	48
Abb. 9	Stammbaum der Familie 1.....	49
Abb. 10	Stammbaum der Familie 2.....	49
Abb. 11	Spezifische Aktivität von Cathepsin D in Lysaten von Fibroblasten von Patienten aus drei Familien mit unklarer NCL.	51
Abb. 12	Spezifische Aktivität von β -Hexosaminidase in Lysaten von Fibroblasten von Patienten aus drei Familien mit unklarer NCL.	51
Abb. 13	Genetische Kopplungsanalyse der Familie 1.	53
Abb. 14	Sequenzabschnitt des <i>PPP1R9A</i> -Exon 1 mit der c.1102G>A Mutation.....	54
Abb. 15	Konservierung des Aspartat-Restes an Position 368 des Neurabin-I in verschiedenen Spezies.	55
Abb. 16	Expression der Neurabin-I-Mutante in BHK-Zellen.....	56
Abb. 17	Expression des endogenen Neurabin-I im Hirnextrakt einer Maus.	57
Abb. 18	Lokalisation des endogenen Neurabin-I in kultivierten Maus-Neuronen.	58
Abb. 19	Lokalisation des humanen Wildtyp- und des p.Asp368Asn-mutanten Neurabin-I in BHK-Zellen.....	59
Abb. 20	Genetische Kopplungsanalyse der Familie 2.	60
Abb. 21	Sequenzabschnitt des <i>CLN5</i> -Exon 4 mit der c.1072_1073delTT-Mutation.....	61
Abb. 22	Sequenzabschnitt des <i>CLN5</i> -Exon 4 mit der c.1137G>T-Mutation.....	62
Abb. 23	Expressionsanalyse der CLN5-Mutanten in COS7- (A) und BHK-Zellen (B).	63
Abb. 24	Endoglykosidase H-Sensitivität von Wildtyp und mutanten CLN5-Proteinen.....	64
Abb. 25	Lokalisation des mutanten p.Leu358AlafsX4- bzw. p.Trp379Cys-CLN5 in transfizierten COS7-Zellen.	65
Abb. 26	Altersabhängige Verläufe bei zwei CLN3-Patienten basierend auf dem Hamburger-Scoring-System.	67
Abb. 27	Verteilung der dysregulierten Gene bei CLN3-Patienten mit der 1,02 kb Deletion	69
Abb. 28	Relative mRNA-Expression von CLN3, DUSP2 und CDC42SE2 in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen.....	72

Abb. 29	Relative mRNA-Expression von CLN3, RapGEF1, Spi-B, MARCKS und BACE2 in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen.	73
Abb. 30	Diagnostikschritte bei NCL-Verdacht (Kohlschütter und Schulz, 2009).	76
Abb. 31	Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Neurabin-II, PP1 und <i>Doublecortin</i>	80
Abb. 32	Schematische Struktur des humanen Neurabin-I-Proteins.....	81
Abb. 33	Schematische Darstellung der Interaktion und Regulation des Phosphorylierungszustandes des AMPA-Rezeptors mit PP1 und Neurabin-I nach Kelker <i>et al.</i> (2007).	83
Abb. 34	Schematische Darstellung des CLN5-Proteins.....	87

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Molekulargenetische Einteilung der NCL-Formen	3
Tab. 2	Putative Interaktionspartner von CLN3	7
Tab. 3	Ausschluss der bekannten Gen- und Protein-Defekte (CLN1, 2, 3, 6, 8 und 10).....	52
Tab. 4	Gebildete Vergleichsgruppen.....	68
Tab. 5	Dysregulierte Gene bei allen CLN3-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.	70
Tab. 6	Gene, die hochreguliert sind, bei CLN3-Patienten mit schnellem Verlauf, und die herunterreguliert sind, bei CLN3-Patienten mit langsamem Verlauf.	70
Tab. 7	Expression von ausgewählten Genen, die für Proteine des Lysosoms kodieren bzw. für Proteine, die für die Biogenese der Lysosome von Bedeutung sind, kodieren.	74
Tab. 8	Kandidatengene, die durch Mutationsanalysen genomischer DNA aus Patient 2 der Familie 1 mit unbekannter NCL überprüft wurden.	104
Tab. 9	Auflistung der 20 am stärksten dysregulierten Gene in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit klassischem Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen.	105
Tab. 10	Auflistung der 20 am stärksten dysregulierten Gene in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit langsamem Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen.	106
Tab. 11	Auflistung der 20 am stärksten dysregulierten Gene in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen.....	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Neben den hier aufgeführten Abkürzungen wurden die gängigen chemischen Formeln und SI-Einheiten verwendet. Alle englischen und lateinischen Abkürzungen und Wörter, deren Übersetzung nicht gebräuchlich ist, sind kursiv dargestellt.

4MU	4-Methyl-Umbelliferon
AA	Aminosäure
Ac/F	Acetate/Formiate
AMCA	6-[(7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl) amino]hexoid acid
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP	Adaptorprotein
APP	<i>Amyloid-Precursor-Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BACE2	<i>β-site APP cleaving enzyme</i>
BD	Bindedomäne
BHK	Zelllinie aus Hamster-Nieren (<i>Baby Hamster Kidney</i>)
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
C3G (RapGEF1)	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor</i> (GEF) 1
CC	Coiled-coil
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLC (CIC)	<i>Chloride-channel</i>
C_T	<i>cycle of threshold</i>
CTS (Cts)	Cathepsin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
DUSP2 (PAC1)	<i>Dual specificity phosphatase 2</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i>
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
EndoH	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>

FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAD65	Glutamat-Decarboxylase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM130	Golgi Matrix Protein
GRODS	granuläre osmiophile Einlagerungen
Hb	Hemoglobin
HeLa	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (Henrietta Lacks)
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
IC	Inhibitor-Cocktail
Ig	Immunglobulin
INCL	Infantile NCL
JNCL	Juvenile NCL
JNK/SAPK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase/Stress-activated protein kinase</i>
kb	Kilobasenpaare
LAMP	<i>Lysosomal associated membrane protein</i>
LAP/ACP2	<i>lysosomal acid phosphatase</i>
LINCL	Spätinfantile NCL
LOD	<i>logarithmic odds ratio</i>
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MAP	Mitogen Activated Protein
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NCL bzw. CLN	Neuronale Ceroid-Lipofuszinose
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
OSTM1	<i>Osteopetrosis associated transmembrane protein 1</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
p38	p38/RK/CBP
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pDCs	plasmazytoide dendritischen Zellen
PDI	Protein Disulphide Isomerase

PDZ	<i>PSD-95, DlgA, ZO-1-like</i>
PNGaseF	Peptid-N-Glycosidase F
PP1	Protein Phosphatase 1
PPT	Palmitoyl Protein Thioesterase
RNA	<i>Ribonucleinacid</i>
RNA_i	<i>RNA interferenz</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	steril- α Motiv
Saposin	Sphingolipid Aktivator Protein
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfat</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPEC	<i>CDC42 small effector</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N',-Tetra-methyl-ethylendiamin
TPP1	Tripeptidyl Peptidase 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx100	Triton X-100
U	<i>Units</i>
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen

1.1.1 Allgemein

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) gehören zu den lysosomalen Speicherkrankheiten und bilden die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter. Sie werden autosomal rezessiv vererbt und treten mit einer Inzidenz in Skandinavien, USA und Deutschland von etwa 1:12 500 und weltweit von etwa 1:100 000 auf (Jalanko und Braulke, 2009). Alle NCL-Krankheiten weisen einen progressiven Verlauf auf, sind unheilbar und führen zum vorzeitigen Tod der Patienten. Klinische Hauptsymptome der NCL-Krankheiten sind Erblindung, psychomotorischer Abbau und Epilepsie. In vielen Geweben und Organen der Patienten kommt es zur lysosomalen Speicherung eines wachsartigen, autofluoreszierenden Ceroid-Lipofuszinmaterials (Haltia, 2003). Die Zelldegeneration beschränkt sich jedoch nur auf Nervenzellen.

Auf der Grundlage des Erkrankungsbeginns, der klinischen Symptome und der Ultrastruktur des Speichermaterials wurden die NCL-Erkrankungen anfänglich in **infantile**, **spätinfantile**, **juvenile** und **adulte** NCL eingeteilt (Dyken, 1989). Genetische und biochemische Studien führten jedoch zu einer neuen Einteilung der NCL-Formen aufgrund des betroffenen Genlokus, wobei die Numerierung der Krankheiten (CLN1 bis CLN10) die historische Reihenfolge der Entdeckung des entsprechenden Gendefekts widerspiegelt (Tab. 1).

Bislang wurden ca. 205 Mutationen in 9 humanen NCL-assoziierten Genen (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN7*, *CLN8*, *CLN10* und *CLCN6*) identifiziert, die zu NCL führen. Zusätzlich gibt es Mutationen im *CLCN7*-Gen, die zur Osteopetrose und zu einer NCL-ähnlichen Krankheit (Kyttälä *et al.*, 2005; Jalanko und Braulke, 2009) führen.

1. Einleitung

Im Hinblick auf die Ultrastruktur des lysosomalen Speichermaterials sind sogenannte granuläre, osmiophile Einlagerungen (GRODS) für die infantile Form typisch, während bei der spätinfantilen Form curvilineare Einlagerungen und bei der juvenilen NCL-Form Kombinationen aus GRODS, curvilinearen und rectilinearen Einschlüssen, den sogenannten „*Fingerprint Bodies*“, zu finden sind (Mole *et al.*, 2005). Die Hauptkomponente des Speichermaterials bei nahezu allen NCL-Formen ist die c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (sub c), ein kleines, hochkonserviertes, hydrophobes Protein (Palmer *et al.*, 1992). Es wird vermutet, dass die fehlende lysosomale Degradation der Untereinheit c zu den NCL-Symptomen beiträgt. Einzig bei CLN1 und CLN10 sind Sphingolipid Aktivator Proteine A und D (Saposin A und D), bei denen es sich um kleine hydrophobe Glykoproteine handelt, die für den lysosomalen Abbau von Sphingolipiden benötigt werden, in Speichermaterial gefunden worden (Tyynelä *et al.*, 1993).

1. Einleitung

Tab. 1 Molekulargenetische Einteilung der NCL-Formen

Gene	Krankheitsbeginn	Lokus	Genprodukt
CLN1	Infantile NCL + spätinfantile, juvenile und adulte	1p32	PPT1 (Palmitoyl Protein Thioesterase 1) Lösliches lysosomales Enzym
CLN2	„Klassische“ spätinfantile NCL + juvenile	11p15	TPP1 (Tripeptidyl Peptidase 1) Lösliches lysosomales Enzym
CLN3	„Klassische“ juvenile NCL	16p12	CLN3 Lysosomales Transmembranprotein
CLN4 unbekannt	Adulte autosomal rezessive NCL	-	-
CLN5	Finnische spätinfantile NCL	13q22	CLN5 Lösliches lysosomales Glykoprotein
CLN6	Indisch-iberische spätinfantile NCL	15q21-q23	CLN6 Transmembranprotein des ER
CLN7 (MFS8)	CLN7-assoziierte türkische spätinfantile NCL	4q28	MFS8 Lysosomales Transmembranprotein
CLN8	CLN8-assoziierte türkische spätinfantile NCL + Nordische Epilepsie	8p23	CLN8 Transmembranprotein des ER
CLN9 unbekannt	Juvenile NCL	-	-
CLN10 (CTSD)	Kongenitale NCL + spätinfantile + juvenile NCL	11p15	CTSD (Cathepsin D) Lösliches lysosomales Enzym
CLCN6	Adulte NCL	1p36	CLC-6 (Chloridkanal 6) Transmembranprotein des späten Endosomen

1. Einleitung

1.1.2 CLN1

Bislang wurden 45 Mutationen des *CLN1*-Gens beschrieben, die zur infantilen NCL (INCL) führen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/cln1.shtml>). Diese Mutationen bedingen eine sehr rasch fortschreitende Gehirnerkrankung, die im ersten Lebensjahr beginnt und zum frühen Tod der Patienten in einem Alter von 8-12 Jahren führt. Es sind aber auch CLN1-Patienten mit spätinfantilem, juvenilem und adultem Beginn der Erkrankung beschrieben worden (Haltia, 2003; Goebel und Wisniewski, 2004). *CLN1* kodiert für die Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 (PPT1).

1.1.3 CLN2

Bislang wurden 40 Mutationen des *CLN2*-Gens beschrieben, die zur „klassischen“ spätinfantilen NCL (LINCL) führen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/cln2.shtml>). Im typischen Fall beginnt die Erkrankung um das dritte Lebensjahr mit einem Zurückbleiben der Entwicklung oder mit epileptischen Anfällen. Die Kinder erblinden, verlieren langsam alle psychomotorischen Fähigkeiten und versterben zwischen dem 10. und 15. Lebensjahr (Kohlschütter *et al.*, 1993). *CLN2* kodiert für die Tripeptidyl Peptidase 1 (TPP1).

1.1.4 CLN3

Die „klassische“ juvenile NCL, auch „Batten Disease“ genannt, ist in Deutschland mit einer Inzidenz von 1:50 000 Lebendgeborenen die häufigste NCL-Erkrankung (Claussen *et al.*, 1992). Mutationen des *CLN3*-Gens verursachen eine im Schulalter mit Erblindung beginnende Krankheit, später kommen Demenz und weitere psychomotorische Abbauerscheinungen hinzu. Trotz des weiteren Verfalls aller psychischen und motorischen Fähigkeiten können die Patienten bis zum 30. Lebensjahr überleben, was eine sehr lange Leidenszeit bedeutet (Kohlschütter *et al.*, 2005).

Das *CLN3*-Gen ist auf Chromosom 16p12.1 lokalisiert (The International Batten Disease Consortium, 1995), enthält 15 Exone und überspannt eine Region von 35 kb. *CLN3* ist von der Hefe bis zum Mensch konserviert (Taschner *et al.*, 1997).

1. Einleitung

Bislang wurden mehr als 40 *CLN3*-Mutationen beschrieben (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/cln3.shtml>). Die häufigste Mutation ist eine 1,02 kb Deletion, die in 85 % der *CLN3* Patienten diagnostiziert wird (Munroe *et al.*, 1997). Diese Deletion führt zum Verlust von Exon 7 und 8, und kann zur Entstehung von zwei möglichen mRNA-Transkripten führen. Das Haupt-mRNA-Transkript enthält die 6 ersten Exone, die für die ersten 153 der 438 Aminosäuren kodieren, und einen Teil des Exons 9, das zu einem frühzeitigen Stopp-Codon führt und für 28 neue Aminosäuren kodiert (Abb. 1, Transkript 1). Das zweite mRNA-Transkript, das weniger häufig vorkommt, verbindet die ersten 6 Exone mit Exon 10-15 und bleibt dabei in dem normalen Leseraster von *CLN3*, was zu einem *CLN3*-Protein ohne die Aminosäuren 154 bis 263 führt (Abb. 1, Transkript 2). In beiden Fällen scheint *CLN3* seine Funktion nicht vollständig verloren zu haben (Kitzmüller *et al.*, 2008).

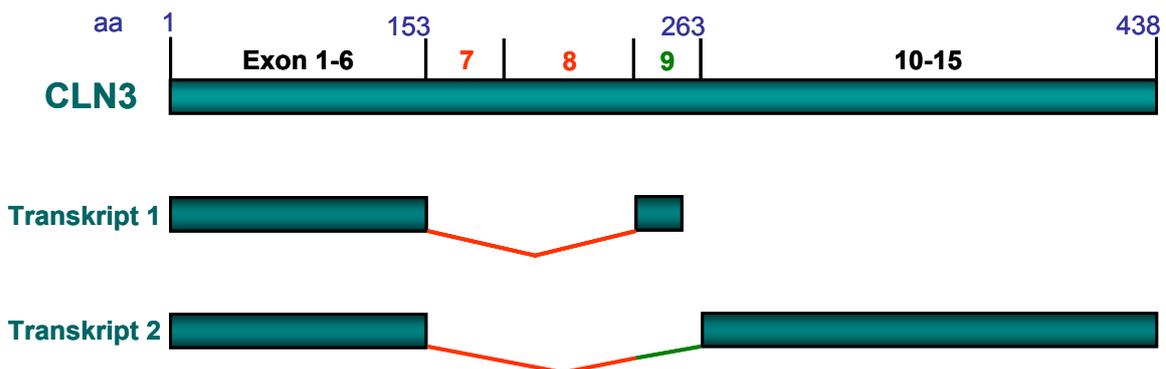


Abb. 1 Wildtyp-*CLN3* und mögliche Transkripte nach 1,02 kb-Deletion.

Im oberen Teil ist schematisch der Aufbau des Wildtyp-*CLN3* dargestellt (Exonstruktur und Aminosäure-Kodierung). Durch 1,02 kb-Deletion kommt es bei *CLN3*-Patienten zum Verlust der Exone 7 und 8, was zu zwei verschiedenen Transkripten (1 und 2) führen kann. Transkript 1 ist mit einem Frameshift nach Exon 6 verbunden und kodiert für die ersten 153 Aminosäuren von *CLN3* und 28 neue Aminosäuren. Bei Transkript 2 ist der Verlust der Exone 7 und 8 mit einem Spleißverlust des Exons 9 (*in frame*) assoziiert und führt zu einem mutierten Protein, dem die Aminosäuren 150-263 fehlen. In rot sind die verlorenen Exone und in grün das gespleißte Exon markiert.

Bei der 1,02 kb-Deletion besteht eine hohe Genotyp-Phänotyp Variabilität (Kohlschütter *et al.*, 1988), die sich mittels eines 3-Punkte-Scoring-Systems erfassen lässt (Abb. 2, Seite 6).

1. Einleitung

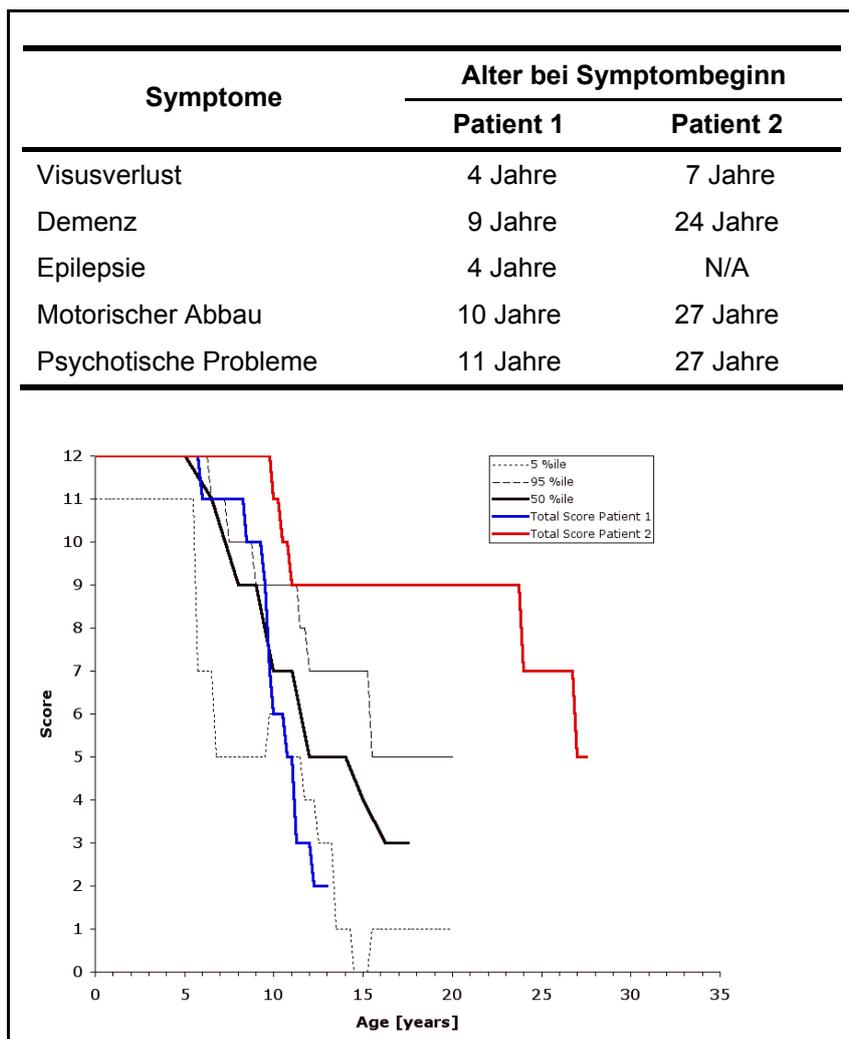


Abb. 2 Anwendung des Hamburger-Scoring-Systems anhand von zwei CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion (Kohlschütter *et al.*, 1988).

Patient 1 (blau) zeigt einen „schnellen“ Krankheitsverlauf im Vergleich zum „klassischen“ Krankheitsverlauf (Median, schwarz). Patient 2 (rot) zeigt hingegen einen „langsamen“ Krankheitsverlauf im Vergleich zum „klassischen“ Krankheitsverlauf. Die graue gepunktete Linie weist auf die 5 % Perzentile des Verlaufs aller Patienten im deutschen NCL-Register, die homozygot für die 1,02 kb-Deletion sind (n=55), hin. Die graue gestrichelte Linie weist auf 95 % Perzentile des Verlaufs aller Patienten mit Homozygotie für die 1,02 kb-Deletion hin. Der Score wird aus der Summe der Scoring-Punkte für die verschiedenen Problemkategorien Visus, Sprache, Motorik und Intellekt berechnet, in dem 3 „sehr gut“ und 0 „sehr schlecht“ bedeutet. Der Maximalscore berechnet aus den Einzelscores der vier Problemkategorien beträgt somit 12. Die Graphik zeigt, da es sich um eine degenerative Erkrankung handelt, die Abnahme der Scoring mit zunehmendem Alter der Patienten. Je schneller die Scoring-Punkte über das Alter abnehmen, desto schneller verläuft die Krankheit.

CLN3 kodiert ein hydrophobes glykosyliertes Protein aus 438 Aminosäuren mit 6 Transmembrandomänen und einer molaren Masse von 43 kDa (Abb. 3, Seite 7) (Ezaki *et al.*, 2003; Kyttälä *et al.*, 2004; Storch *et al.*, 2007). CLN3 kann durch seine luminalen Domänen mit dem CLN5-Protein (Vesa *et al.*, 2002) und durch seine zytosolischen Domänen mit HOOK1 (Luiro *et al.*, 2004) interagieren (Tab. 2, Seite 7). Es wird zusätzlich kontrovers diskutiert, ob CLN3 durch sein lysosomales Dileucin-

1. Einleitung

Sortierungssignal mit den Adaptor-Komplexen AP1 und AP3 interagieren und so zielgerichtet zum Lysosom transportiert werden kann (Storch *et al.*, 2004; Kyttälä *et al.*, 2005).

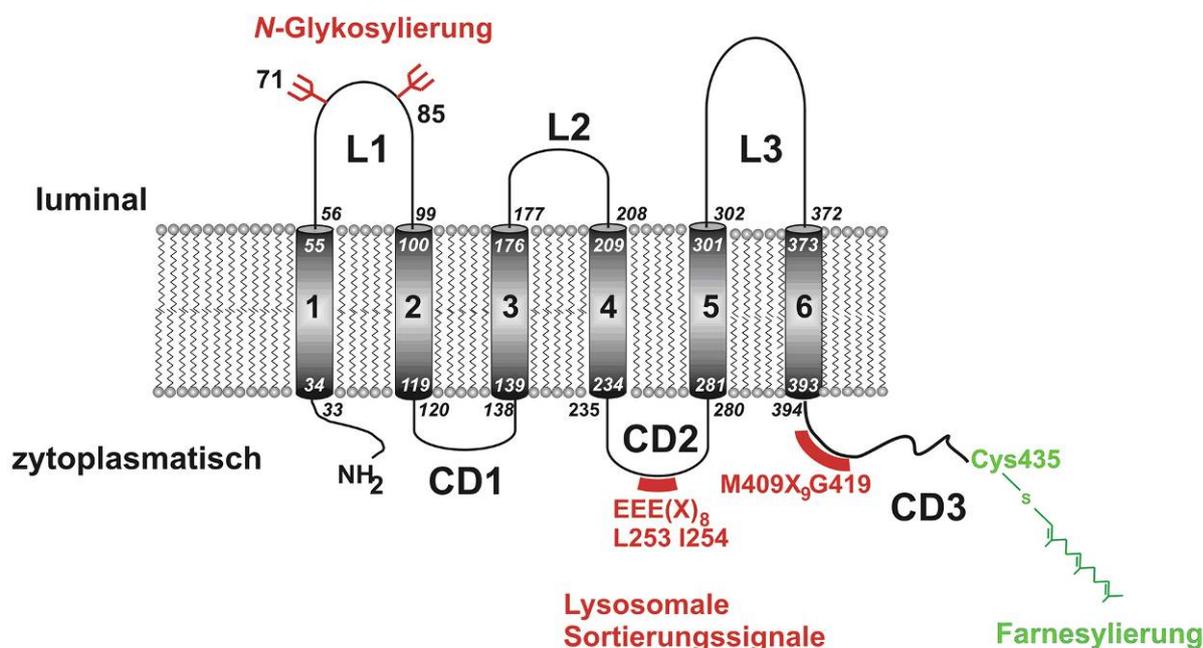


Abb. 3 Putatives Modell des CLN3-Proteins.

CLN3 besteht aus 6 hydrophoben Membrandomänen. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus ragen in das Cytosol. In der ersten luminalen Domäne (L1) sind 2 *in vivo* genutzte N-Glykosylierungsstellen lokalisiert. Die zweite zytosomatische Domäne (CD2) und der C-Terminus (CD3) enthalten lysosomale Sortierungssignale. Der prenylierte C-Terminus ist möglicherweise in der Membran verankert und führt zu einer Schleifenbildung (Storch *et al.*, 2007).

Tab. 2 Putative Interaktionspartner von CLN3

Interaktionspartner	Topologie		Angenommene Funktion der Interaktion
	zytosolisch	luminal	
CLN5	-	+	Regulation des lysosomalen pH (Vesa <i>et al.</i> , 2002)
HOOK1	+	-	Bindung an Mikrotubuli – Endozytose (Luiro <i>et al.</i> , 2004)
AP1 und AP3	+	-	Lysosomale Sortierung (Storch <i>et al.</i> , 2004; Kyttälä <i>et al.</i> , 2005)

Die genaue Funktion von CLN3 ist nicht bekannt, aber es scheint für verschiedene Prozesse wie der Erhaltung der vakuolären/lysosomalen pH-Homöostase (Pearce und Sherman, 1998; Holopainen *et al.*, 2001), der Regulation des lysosomalen

1. Einleitung

Protonen- und Arginin-Transports (Ramirez-Montealegre und Pearce, 2005), der Regulation des vesikulären Transports entlang der Mikrotubuli (Weimer *et al.*, 2006), dem Schutz vor Apoptose (Puranam *et al.*, 1999) und der Reifung von Autophagolysosomen (Cao *et al.*, 2006) beteiligt zu sein. Weiterhin wurde CLN3 auch eine $\Delta 9$ -Palmitoyl-Desaturase-Aktivität zugeschrieben, die für die Umwandlung der $\Delta 9$ -Doppelbindung von Palmitoyle Säure zu einer Einfachbindung verantwortlich sein soll. Dies konnte jedoch nur am Beispiel von dem membranassoziierten Protein H-Ras gezeigt werden (Narayan *et al.*, 2006).

Außerdem werden Veränderungen in der Expression bestimmter Proteine in Verbindung zur CLN3-Krankheit gebracht und könnten daher als Biomarker zur Diagnostik dienen. Zum einen wird eine erhöhte Aktivität der lysosomalen sauren Phosphatase (LAP/ACP2) und des lysosomalen Membranproteins LAMP-2 in CLN3-Patienten-Fibroblasten, in CLN3 siRNA behandelten HeLa-Zellen und in den Hirnen *Cln3*-defizienter Mäusen beobachtet (Pohl *et al.*, 2007). Zum anderen sind Autoantikörper gegen die Glutamat-Decarboxylase (GAD65) im Serum von *Cln3*-defizienten Mäusen und CLN3-Patienten nachgewiesen worden. Es wird angenommen, dass die inhibitorische Wirkung der Antikörper zu einem erhöhten Spiegel von Glutamat im Hirn beiträgt, der zu einem vermehrten Zelltod GABAerger Interneurone führen könnte (Chattopadhyay *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2006).

1.1.5 CLN4

CLN4, auch Kufs-Krankheit genannt, bildet die Gruppe der seltenen adulten NCL-Variante, die klinisch unterschiedlich verlaufen kann. Der Typ A zeigt epileptische Anfälle mit Myoklonien, Demenz und Ataxie, während der Typ B Verhaltensstörungen, Demenz und auffällige Gesichtsdyskinesie zeigt. Bei den beiden Typen tritt keine retinale Degeneration auf (Berkovic *et al.*, 1988). Das *CLN4*-Gen konnte bislang noch nicht identifiziert werden (Mole *et al.*, 2005).

1. Einleitung

1.1.6 CLN5

Das *CLN5*-Gen ist auf Chromosom 13q21-q32 lokalisiert, besteht aus 4 Exonen und überspannt eine Region von 13 kb (Savukoski *et al.*, 1998). Bislang wurden 11 Mutationen im *CLN5*-Gen beschrieben, die zur finnischen spätinfantilen NCL-Variante führen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/clin5.shtml>). Die häufigste Mutation ist eine 2 bp Deletion in Exon 4 (c.1175delAT), die mit einer Häufigkeit von 94 % bei finnischen Patienten gefunden wird, und die zu einem verkürzten Protein (Tyr392X) führt (Holmberg *et al.*, 2000).

Die Erkrankung beginnt mit motorischen Störungen und einem zunehmenden Visusverlust bis hin zu Blindheit im Alter zwischen 4 und 7 Jahren. Dazu kommen psychische und motorische Degeneration, Myoklonien, epileptische Anfälle und ein frühzeitiger Tod im Alter zwischen 14 und 36 Jahren (Santavuori *et al.*, 1982; Santavuori *et al.*, 1991).

CLN5 kodiert ein lösliches glykosyliertes Protein unbekannter Funktion, das aus 407 Aminosäuren besteht (Savukoski *et al.*, 1998). Aufgrund der Benutzung vier verschiedener Methioninreste als Translationsstartsignal konnten vier verschiedene *CLN5* Polypeptide mit Molekularmassen von 39 bis 47 kDa in *in vitro*-Translationsversuchen nachgewiesen werden. *CLN5* enthält acht mögliche *N*-Glykosylierungsstellen und weist eine Molekularmasse von 60-72 kDa mit hohem Anteil an Mannose-6-Phosphat-Resten auf. Das *CLN5*-Protein ist hauptsächlich im lysosomalen Kompartiment lokalisiert (Isosomppi *et al.*, 2002; Vesa *et al.*, 2002; Sleat *et al.*, 2006). Es wurde beschrieben, dass *CLN5* mit den NCL-Proteinen *CLN2* und *CLN3* interagieren kann (Vesa *et al.*, 2002).

1.1.7 CLN6

Bislang wurden 39 Mutationen des *CLN6*-Gens beschrieben, die zu einer spätinfantilen NCL-Variante führen, die ursprünglich als Indisch-Iberische spätinfantile NCL-Variante bezeichnet wurde (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/clin6.shtml>). Die Krankheit kann mit 18 Monaten aber auch erst im 8. Lebensjahr beginnen und ist durch progressiven Sehverlust bis zur Erblindung, Krampfanfälle und Verlust sämtlicher motorischer Fähigkeiten charakterisiert. Sie schreitet sehr schnell voran und die

1. Einleitung

meisten Patienten sterben zwischen dem 5. und 12. Lebensjahr. Die CLN6-Variante wurde vor allem in Osteuropa (Tschechien), Pakistan und Portugal (Siintola *et al.*, 2006a) diagnostiziert, aber einige Fälle wurden auch in Frankreich, Costa Rica, Italien, Brasilien und Türkei identifiziert (Sharp *et al.*, 2003; Siintola *et al.*, 2005).

CLN6 kodiert ein 27 kDa nicht-glykosyliertes Membranprotein aus 311 Aminosäuren mit 7 putativen Transmembrandomänen (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002), ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und kann Homodimere bilden (Heine *et al.*, 2004; Mole *et al.*, 2004; Heine *et al.*, 2007). Die Funktion des CLN6-Proteins ist unbekannt. CLN6 weist keine Homologien zu anderen Proteinen oder funktionellen Domänen auf.

1.1.8 CLN7

Bislang wurden 20 Mutationen des CLN7-Gens beschrieben, die zu einer türkischen spätinfantilen NCL-Variante führen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/cln7.shtml>). Wie bei den anderen spätinfantilen NCL-Varianten CLN5, CLN6 und CLN8 beginnt die Krankheit mit 2-7 Jahren. Die ersten Symptome sind meist schwere epileptische Anfälle. Progressive psychomotorische Degeneration, Myoklonien und Blindheit führen zum frühzeitigen Tod (Topcu *et al.*, 2004).

Das CLN7-Gen wurde mittels genetischer Kopplungsanalysen identifiziert und kodiert ein 58 kDa lysosomales Protein aus 518 Aminosäuren mit 12 putativen Transmembrandomänen (Siintola *et al.*, 2007). CLN7 gehört zur Major-Facilitator-Superfamilie (MFS). Proteine dieser Familie transportieren gelöste Verbindungen wie Zucker, anorganische und organische Kationen und verschiedene Metabolite durch Zellmembranen (Kasho *et al.*, 2006). Das spezifische Substrat von CLN7 ist jedoch noch unbekannt.

1.1.9 CLN8

Bislang wurden 10 unterschiedliche Mutationen im CLN8-Gen beschrieben (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/cln8.shtml>), die zu zwei verschiedenen Krankheiten führen, einer türkischen spätinfantilen NCL-Variante mit einem rasch fortschreitenden Krankheitsverlauf und zum anderen einer progressiven Epilepsie-Form mit mentaler

1. Einleitung

Retardierung (EPMR), auch „Northern Epilepsy“ genannt, die vor allem in der finnischen Bevölkerung vertreten ist und einen sehr milden Phänotyp aufweist (Ranta *et al.*, 1999; Ranta *et al.*, 2004). Die ersten Symptome bei finnischen CLN8-Patienten sind epileptische Anfälle im Alter von 5-10 Jahren (Ranta und Lehesjoki, 2000), gefolgt von progressiver psychischer Degeneration und motorischen Problemen (Lang *et al.*, 1997). EPMR-Patienten können bis zu 60 Jahre überleben und weisen keine NCL-typische Blindheit auf. Türkische Patienten mit *CLN8*-Mutationen zeigen hingegen einen NCL-typischeren Phänotyp mit Visusverlust (Topcu *et al.*, 2004).

CLN8 kodiert ein 33 kDa Transmembranprotein aus 286 Aminosäuren, das in nicht-neuronalen Zellen im ER lokalisiert ist (Lonka *et al.*, 2000; Lonka *et al.*, 2004). Die genaue Funktion von *CLN8* ist unbekannt, aber aufgrund homologer Domänen wird es der TLC- (TRAM, Lag1p, *CLN8*) Protein-Familie zugeordnet, die an der Translokation neusynthetisierter Transmembranproteine in das ER und an der Ceramidsynthese beteiligt sein soll (Winter und Ponting, 2002; Guillas *et al.*, 2003).

1.1.10 CLN9

Bislang wurden vier Patienten mit juveniler NCL jedoch ohne Mutationen im *CLN3*-Gen beschrieben. Die Fibroblasten dieser Patienten wurden biochemisch charakterisiert und zeigen abnorme Genexpressionsmuster und Ceramidstoffwechseleränderungen. Anhand dieser Ergebnisse wird dem putativen krankheitsverursachenden *CLN9*-Protein die Funktion eines Regulators der Ceramidsynthese zugeschrieben. Das hierfür kodierende *CLN9*-Gen konnte noch nicht identifiziert werden (Schulz *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2006).

1.1.11 CLN10

Bislang wurden vier Mutationen im *CTSD*-Gen beschrieben, die zur kongenitalen bzw. zur juvenilen NCL führen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/catD.shtml>) (Siintola *et al.*, 2006b; Steinfeld *et al.*, 2006; Fritchie *et al.*, 2009). Es wurde von 10 Patienten mit kongenitaler Form berichtet, die jedoch nicht genetisch definiert werden konnten (Siintola *et al.*, 2006a). Diese Patienten zeigten seit Geburt erhöhten Muskeltonus, epileptische Anfälle und Ateminsuffizienz und starben innerhalb weniger Stunden bis

1. Einleitung

Wochen nach der Geburt. Es wurde auch über einen deutschen Patienten mit Cathepsin D (CTSD)-Defizienz berichtet, der Visusprobleme und Ataxie ab dem Schulalter aufwies, gefolgt von progressiver psychomotorischer Degeneration. Dieser Patient ist compound-heterozygot für zwei Missense-Mutationen (Steinfeld *et al.*, 2006).

CLN10 kodiert die lysosomale Aspartylprotease Cathepsin D (CTSD), die als inaktives glykosyliertes 53 kDa Vorläuferprotein aus 412 Aminosäuren synthetisiert wird. Weitere proteolytische Prozessierungsschritte führen zu 47, 31 und 14 kDa intermediären und reifen, enzymatisch aktiven Formen (Gieselmann *et al.*, 1985). Die Aktivität von CTSD wird von Pepstatin A spezifisch inhibiert. CTSD soll auch an Prozessen der Zellproliferation, Antigenprozessierung, Apoptose und Regulation des plasmatischen HDL-Cholesterolgegels beteiligt sein (Berchem *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2005; Benes *et al.*, 2008).

1.1.12 Chloridkanal-(CLC)-Familie

Es wurden über 30 Mutationen im *CLCN7*-Gen gefunden, welches den Chloridkanal 7 (ClC-7) kodiert, und die zu einer autosomal rezessiven, infantilen, bösartigen Osteopetrose und einem frühzeitigen Tod in den ersten 10 Jahren führen (Frattini *et al.*, 2003; Waguespack *et al.*, 2007). Die Patienten weisen zusätzlich Hirnatrophie, Mikrozephalie, Autismus, Taubheit und Blindheit auf (Frattini *et al.*, 2003).

ClC-7 ist ein 89 kDa nicht-glykosyliertes Membranprotein, das aus 805 Aminosäuren besteht (Brandt und Jentsch, 1995) und in späten Endosomen/Lysosomen lokalisiert ist (Kornak *et al.*, 2001; Kasper *et al.*, 2005).

Der Chloridkanal 6 (ClC-6) wird überwiegend in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert und ist in späten Endosomen lokalisiert. *Clcn6*-defiziente Mäuse zeigten eine lysosomale Speicherung lipofuszinartigen Materials, welches die c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase enthält. Der lysosomale pH ist unverändert und es gibt keinen Verlust von Neuronen. Die Mäuse sind fruchtbar und haben eine normale Lebenserwartung, was vergleichbar mit milden Formen von NCL ist (Poët *et al.*, 2006). In zwei von 75 Patienten mit adulter NCL-Variante wurde jeweils eine heterozygote Mutation im *CLCN6*-Gen gefunden.

1. Einleitung

Dabei wurden zusätzlich keine anderen Defekte in den bekannten NCL-Genen festgestellt. (Poët *et al.*, 2006).

Der Chloridkanal 3 (ClC-3) ist in endosomalen Membranen und synaptischen Vesikeln lokalisiert und arbeitet als Cl⁻/H⁺-Austauscher (Stobrawa *et al.*, 2001; Scheel *et al.*, 2005). *Clcn3*-defiziente Mäuse zeigen Entwicklungsstörungen, hohe Mortalität und einen NCL-ähnlichen Phänotyp, charakterisiert durch Blindheit und motorische Bewegungsstörungen (Yoshikawa *et al.*, 2002).

1.1.13 Unbekannte NCL-Formen

Mindestens 10 % aller Patienten mit Verdacht auf NCL lassen sich keiner der bekannten NCL-Formen zuordnen. Man spricht dabei von „unklarer NCL“. Darüberhinaus gibt es Hinweise anhand natürlicher und genetisch hergestellter Tiermodelle, dass Mutationen in weiteren Genen wie *CTSF* (Cathepsin F), *CTSB* (Cathepsin B), *CTSL* (Cathepsin L), *PPT2* (Palmitoyl Protein Thioesterase 2), *OSTM1* (Osteopetrosis associated transmembrane protein 1) einen NCL-ähnlichen Phänotyp verursachen (Järplid und Haltia, 1993; Gupta *et al.*, 2001; Felbor *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2006). Bei Menschen konnten bisher keine krankheitsrelevanten Mutationen in diesen Genen nachgewiesen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass einige der bisher unbekanntes NCL-Formen beim Menschen hierdurch verursacht werden.

1.2 Zielsetzung

Die neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) bilden die am weitesten verbreitete Gruppe neurodegenerativer lysosomaler Speichererkrankungen des Kindes- und Jugendalters. Bislang wurden Mutationen in 9 humanen Genen (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN7*, *CLN8*, *CLN10* und *CLCN6*) gefunden, die zu NCL führen. Mindestens 10 % aller NCL-Patienten können jedoch genetisch keiner der bekannten NCL-Formen zugeordnet werden. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Identifizierung des Gendefektes bei zwei konsanguinen Familien mit unklarer spätinfantiler NCL mittels genetischer Kopplungsanalysen. Aus den erhaltenen Chromosomenabschnitten sollten die krankheitsverursachenden Gene durch Sequenzierungen und Mutationsanalysen identifiziert und auf ihre Relevanz für lysosomale Dysfunktion untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit war auf die Identifizierung von „*modifier genes*“ gerichtet, die für die ausgeprägte Genotyp-Phänotyp-Variabilität bei *CLN3* verantwortlich sein könnten. Dazu sollten von acht Patienten mit schnellem, klassischem und langsamem Krankheitsverlauf, die alle homozygot für die 1,02 kb-Deletion im *CLN3*-Gen waren, und sieben geschlechts- und alters-entsprechenden Kontrollen genomweite Microarray-Analysen durchgeführt werden. Veränderte Expressionsmuster von Genen sollten am *CLN3*-Mausmodell und an mit *CLN3*-RNA_i behandelten Zellen verifiziert werden. Die Identifizierung der „*modifier genes*“ könnte nicht nur als „Biomarker“ die Diagnostik der Erkrankung erleichtern, sondern auch potentielle Zielstrukturen für alternative Therapien bei *CLN3* darstellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Absaugpumpe	Miniport	Servox Medizintechnik, Köln
Autoklav	3850 EL	Systemec, Wettenberg
Blockthermostat	BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
	TM130-6	HLC, Bovenden
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer	Gelsystem Mini L	Peqlab, Erlangen
	Agagel Midi Wide	Biometra, Göttingen
	SE600	Hoefler, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
	Optimax [®]	Protec [®] , Oberstenfeld
Gel Dokumentation System	Molecular Imager [®] / ChemiDoc [™] XRS	Bio-Rad, München
Fluorimeter	VersaFluor [™]	BioRad, München
Horizontalschüttler	Rocky	Fröbel Labortechnik, Wasserburg
Inkubationsschrank	CO ₂ -Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
	CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kryo-Einfriergerät	Nalgene [™] Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, USA
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Phasenkontrast Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
	Fluoreszenz Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
	NanoDrop [™] ND-1000	PeqLab, Erlangen
Pipetten/Multipette		Eppendorf, Hamburg

2. Material und Methoden

Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann , Eberstadt
Plattenlesegerät	VICTOR™X2	PerkinElmer, USA
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Einfriertank	Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen
	Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
	Mastercycler, Gradient	Eppendorf, Hamburg
	Realtime MX3000P™	Stratagene, USA
Transferkammer	TE 50X	Hoefer, USA
Ultraschall-Gerät	Sonopuls HD60	Bandelin Electronic, Berlin
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen	AC100	Mettler Toledo, Giessen
	BP2100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt Labortechnik, Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg
	Microcentrifuge MC6	Sarstedt, Nümbrecht
	Minifuge RF	Heraeus, Hanau
	Ultracentrifuge Sorvall Discovery M120	Kendro, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma
Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Heckt KG, Sondheim
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einwegmaterial für Zellkultur	BD Falcon, Heidelberg
	Sarstedt, Nümbrecht
	Nunc, Wiesbaden
Einweg-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht
Filterschwämme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Gel-Glasplatten	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2. Material und Methoden

Fluorometrie-Küvetten	Bio Rad, München
Kanülen	Becton Dickensen GmbH, Heidelberg
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Daßel
Einmalküvetten	Plastibrand, Wertheim
Objektträger	Engelbrecht, Kassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg Greiner, Essen
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Skalpelle	BBraun, Melsungen
Spritzen	BBraun, Melsungen
Sterilfilter	VWR, Darmstadt
Stripes/Deckel für realtime-PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Szintillationsröhrchen	Perkin Elmer, USA
Teflonkämme	Hoefer, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman, Daßel
Filmkassetten	Rego, Ausburg

2.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien	Firma
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
APS	Roth, Karlsruhe
BSA	Serva, Heidelberg
CaCl₂	Merck, Darmstadt
Coomassie[®] Brilliant blue G	Serva, Heidelberg
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

DAKO®Cytomation-Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTP-Set	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll (Biocoll Separating Solution)	Biochrom AG, Berlin
Formiate/Ameisensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hemoglobin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalium-Acetat (KAc)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kalium-Chorid (KCl)	J.T. Baker, Griesheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lactacystin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luminol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
4-Methyl-Umbelliferon	Sigma-Aldrich, Steinheim
MnCl₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
NaAcetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Roche Diagnostics, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. Material und Methoden

RbCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	J.T. Baker, Griesheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sucrose	J.T. Baker, Griesheim
TEMED	Bio Rad, München
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)	Merck, Darmstadt

2.1.4 Enzyme und Molekulargewichtstandards

Enzyme und Standards	Firma
DNA-Standard, 1 kb-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Standard, 100 bp-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Full-Range Rainbow™ Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Go Taq®-Polymerase	Promega, Mannheim
PfuTurbo™-Polymerase	Stratagene, USA
Platinum® Pfx-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Phusion®-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Maxima™ Probe qPCR Master Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
FastDigest™ Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot
N-Glycosidase F (PNGaseF)	Roche, Mannheim
Endoglycosidase H (EndoH)	Roche, Mannheim
Exo-SAP-IT®	Usb®, USA
BigDye + Puffer	Applied Biosystem, Darmstadt

2. Material und Methoden

2.1.5 Kits und Assays

Folgende kommerzielle Kits und Assays wurden in dieser Arbeit verwendet:

Kit oder Assay	Firma
<i>Bio-Rad Protein Assay</i>	Bio-Rad, München
<i>Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit</i>	Promega, Mannheim
<i>QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep[®] Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick[®]-Spin Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy[®] Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy[®] Micro Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Superscript[™]-III First-Strand Synthesis System Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>High Capacity cDNA ReverseTranscription Kit</i>	Applied Biosystem, Darmstadt
<i>TaqMan[®] Gene Expression Assay</i>	Applied Biosystem, Darmstadt
<i>pcDNA[™]Gateway[®] Directional TOPO Expression Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe

Diese Fertigprodukte wurden nach Gebrauchsanweisung verwendet.

2.1.6 Primer und Sonden

Für die *Real-Time* PCR wurden vorgefertigte TaqMan[®]-Primer und -Sonden von der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Oligonukleotidsequenzen sind nicht erhältlich.

Gen	TaqMan[®]-Gene Expression Assay
<i>CLN3</i>	Hs00164002_m1
<i>DUSP2</i>	Hs00358879_m1
<i>CDC42SE2</i>	Hs00184113_m1
<i>RAPGEF1</i>	Hs00178409_m1
<i>SPIB</i>	Hs00162150_m1
<i>MARCKS</i>	Hs00158993_m1
<i>BACE2</i>	Hs00273238_m1
β -Actin	Hs99999903_m1
<i>Neurabin-1</i>	Hs00393460_m1

Zur Sequenzierung von genomischer DNA wurden die Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert (Anhang 6.1, Seiten 100-103).

2. Material und Methoden

Zur RNA-Interferenz (RNA_i) von endogenem *CLN3* in HeLa-Zellen wurden folgenden siRNAs (small interfering RNA) der Firma Invitrogen (Paisley, UK) verwendet:

Primer	Sequenz
siRNA-2	5'-GCCAGCUAAUUCUUGUUGCUCACAU-3'
Scrambled siRNA	5'-GCCUCUAAUUCGUUUCGCUAGACAU-3'

2.1.7 *E.coli*-Stamm

Escherichia coli TOP10F → Rif^r, F', *proAB*, *lacIqzΔM15*, Tn10, Tetr^r

2.1.8 Humane cDNA-Klone

Vektor	Herkunft
ORF clone of Homo sapiens <i>CLN5</i> in pCMV6-XL4	OriGene Technologies, Rockville, USA
ORF clone of Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A (<i>PPP1R9A</i>) in pCMV6 Entry (Myc/Flag tagged)	OriGene Technologies, Rockville, USA

2. Material und Methoden

2.1.9 Antikörper

Antigen	Host	Spezies	Herkunft/Referenz	Verdünnung	
				WB	IF
Primärantikörper					
Actin	M	alle	#A3853 Sigma-Aldrich, München	-	1:50
CLN5	MS	H	#2Gmll-3 (Holmberg <i>et al.</i> , 2004)	1:500	-
CLN5	K	M, H	# IR-ml-4 (Holmberg <i>et al.</i> , 2004)	-	1:500
EEA1	M	H	#610456 Transduction Lab., USA	-	1:50
FLAG	M	alle	# 200471 Stratagene, USA	1:1000	-
GM130	M	alle	#G65120 Transduction Lab., USA	-	1:100
LAMP1	M	H	#H4A3 Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA	-	1:150
Neurabin-I	K	H, R	# SP5407 Acris Antibodies, Herford	1:1000	1:500
Neurabin-I	M	M, R	#611088 Transduction Lab., USA	1 : 250	1:100
PDI	M	alle	#SPA-891 StressGen, Kanada	-	1:600
Sekundärantikörper					
Anti-K IgG, HRP gekoppelt	Z	-	#111-035-003 Dianova, Hamburg	1:10000	-
Anti-M IgG, HRP gekoppelt	Z	-	#115-035-003 Dianova, Hamburg	1:5000	-
Anti-MS IgG, HRP gekoppelt	Z	-	#106-035-003 Dianova, Hamburg	1:5000	-
Anti-M IgG, Cy3 gekoppelt	S	-	#C2306 Sigma-Aldrich, München	-	1:2000
Anti-K IgG, FITC gekoppelt	Z	-	#F9887 Sigma-Aldrich, München	-	1:50
AlexaFluor® 546 Anti-M IgG	Z	-	#A11030 Invitrogen, Karlsruhe	-	1:500
AlexaFluor® 488 Anti-K IgG	Z	-	#11008 Invitrogen, Karlsruhe	-	1:1000

H: Human, K: Kaninchen, M: Maus, MS: Meerschweinchen R: Ratte, S: Schaf, Z: Ziege
IF: Immunofluoreszenz, WB: Western Blot

2. Material und Methoden

2.1.10 Medien, Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur

Für sterile Zellkultur-Arbeiten wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

Chemikalien	Firma
DMEM	GIBCO/BRL, Eggenstein
FKS (Fetales Kälberserum)	PAA, Österreich
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem®-1 + GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS (10X)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.11 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
HeLa	Humane Cervix-Karzinom Zellen	ATCC, Rockville, USA
COS7	Immortalisierte Affen-Nieren Zellen	Hofmann, Sodrowski, Dana-Faber, Cancer Institute, Harvard University
BHK	<i>Baby hamster kidney cells</i>	Clarke et al., 1970
Kontroll-Fibroblasten	Humane-Fibroblasten gesunder, deutscher Patienten	UKE, Hamburg

Primäre Neuronen aus Mausembryonen wurden freundlicherweise von A. Kurze und Dr. G. Galliciotti (Abt. Kinderklinik Biochemie, UKE, Hamburg) präpariert und zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Patientenproben und Kontrollen

2.1.12.1 Familie 1

Es handelt sich um eine konsanguine Familie türkischer Herkunft mit einem früh verstorbenen Kind, zwei kranken (10 und 12 Jahre alt) und vier gesunden Kindern (Abb. 9, Seite 49). Bei den zwei Patienten wurde eine normale psychomotorische Entwicklung bis zum 5. Lebensjahr, Epilepsie mit tonischen Anfällen und Absencen ab dem 5. Lebensjahr, Visusverlust mit 6 Jahren, vollständige Blindheit mit 7 Jahren

2. Material und Methoden

und schließlich beginnende Ataxie mit 8 Jahren beobachtet. Mit 7 Jahren war das Elektretinogramm ausgelöscht und eine Kleinhirn-Atrophie wurde mittels cerebraler Magnetresonanztomographie (MRT) festgestellt. Bei der Elektronenmikroskopie der Hautbiopsie war keine sichere Diagnose einer NCL möglich, da es keinen Nachweis ekkriner Schweißdrüsen im Präparat gab. In diesen lässt sich jedoch lysosomales Speicher material mit der höchsten Wahrscheinlichkeit identifizieren. Aufgrund des klinischen Verlaufs und der cerebralen Bildgebung bestand jedoch weiterhin der Verdacht auf eine NCL-ähnliche neurodegenerative Erkrankung.

Hautfibroblasten des älteren Patienten sowie EDTA-Blut der Eltern und der 6 Geschwister wurden von Dr. Z. Yapici (Istanbul University, Faculty of Medicine, Dpt of Child Neurology, Istanbul, Türkei) zur Verfügung gestellt.

2.1.12.2 Familie 2

Es handelt sich um eine konsanguine Familie pakistanischer Herkunft mit zwei kranken Brüdern und einem gesunden Kind (Abb. 10, Seite 49). Bei den zwei Patienten wurden eine normale psychomotorische Entwicklung bis zum 5. Lebensjahr, Ataxie und Probleme der Feinmotorik ab dem 5. Lebensjahr, ein Abbau der rezeptiven und expressiven Sprachfähigkeiten mit 7 Jahren, ein Visusverlust mit 7,5 Jahren und Epilepsie mit 8,5 Jahren beobachtet. Mit 5 und 7 Jahren wurde eine progrediente cerebrale und cerebelläre Atrophie festgestellt. Mit 8 Jahren war das Elektretinogramm ausgelöscht. Bei der Elektronenmikroskopie der Hautbiopsie wurden intralysosomale Einschlusskörper mit „*Fingerprint*“-Profilen festgestellt, was die Diagnose einer NCL sicherte.

Hautfibroblasten von einem der zwei Patienten sowie EDTA-Blut der Eltern und der zwei Patienten wurden von Dr. L. D. Mewasingh (St Mary's Hospital Imperial College Healthcare NHS Trust, London, UK) zur Verfügung gestellt.

2.1.12.3 Familie 3

Es handelt sich um eine konsanguine Familie afghanischer Herkunft mit zwei kranken und zwei gesunden Kindern. Bei den zwei Patienten wurden eine normale psychomotorische Entwicklung bis zum 2. Lebensjahr, eine Ataxie und ein Abbau der Sprachfähigkeit ab dem 2. Lebensjahr und Epilepsie mit 4 Jahren beobachtet. Dieser

2. Material und Methoden

klinische Verlauf ergab den Verdacht auf einer spätinfantilen NCL. Bei elektronenmikroskopischer Untersuchung von Hautbiopsien beider Patienten wurden intralysosomale Einschlusskörper mit curvilinearer Ultrastruktur, was die Diagnose einer NCL sicherte.

Hautfibroblasten der zwei Patienten wurden von Dr. med. V. Boda (Universitätsklinikum Frankfurt, Abteilung für Kinderneurologie, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

2.1.12.4 CLN3-Patienten und Kontrollen

EDTA-Blut von acht CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion und von sieben alters- und geschlechts-entsprechenden Kontrollen wurden ausgesucht und von Dr. A. Schulz (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Patienten	Alter	Geschlecht	Kontrollen	Alter	Geschlecht
CLN3-Patient 1	18J	Mädchen	Kontrolle-1	18J	Mädchen
CLN3-Patient 2	10J	Junge	Kontrolle-2	10J	Junge
CLN3-Patient 3	9J	Mädchen	Kontrolle-3	10J	Mädchen
CLN3-Patient 4	12J	Junge	Kontrolle-4	13J	Junge
CLN3-Patient 5	12J	Mädchen	Kontrolle-5	12J	Mädchen
CLN3-Patient 6	12J	Mädchen			
CLN3-Patient 7	28J	Junge	Kontrolle-6	27J	Junge
CLN3-Patient 8	29J	Junge	Kontrolle-7	29J	Junge

2.1.12.5 Kontroll-DNAs

92 türkische Kontroll-DNAs wurden freundlicherweise von Dr. Zur Stadt, Abt. für Pädiatrische Onkologie, UKE, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

20 deutsche Kontroll-DNAs wurden freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Gal, Abt. für Humangenetik, UKE, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Lymphozyten-Isolierung aus humanem Blut

Zur Isolierung von Lymphozyten aus humanem Blut wurden zunächst 3,5-4 ml gut gemischte EDTA-Vollblut-Proben auf 7 ml einer Ficoll-Lösung (1,077 g/ml) vorsichtig überschichtet und anschließend für 20 min bei 1200 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der an der Trennschicht entstandene Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß ohne Erythrozyten Kontamination überführt. Die Probe wurde dann mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und 10 min bei 400 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Lymphozyten-Pellet in 4 ml PBS resuspendiert und erneut für 10 min bei 400 x g und RT zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 1100 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich komplett abgenommen und das Lymphozyten-Pellet sofort bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Alle Techniken zur Kultivierung von Zellen wurden mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Alle Zelllinien wurden in DMEM, 10 oder 20 % FKS und Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Fibroblasten wurden einmal pro Woche passagiert, alle anderen Zelllinien alle 3 Tage.

2.2.3 Trypsinieren von Zellen

Zum Passagieren und Aussäen von Zellen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 0,5 ml (bei 25 cm²-Flaschen) oder 1 ml (bei 75 cm²-Flaschen) Trypsin-Lösung für 2-5 min bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen von der Kulturflasche lösten. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

2. Material und Methoden

2.2.4 Konservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium

10 % DMSO / 10 % FKS in DMEM

Zur Konservierung wurden in 75 cm²-Flasche konfluent gewachsene Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und für 7,5 min bei 1.000 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 2-3 ml Einfriermedium aufgenommen und in 2-3 Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C in einem Kryo-Einfriergerät mit Isopropanol mit einer Abkühlrate von 1°C pro Minute über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen bei RT angewärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

2.2.5 Transiente Transfektion von Zellen

Zur transienten Transfektion wurden Zellen (BHK oder COS7) in Kulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % kultiviert. Für die DNA-Transfektion wurde Lipofectamin[®]2000 verwendet. Die eingesetzte Menge an vektorieller cDNA und Transfektionsreagenz richtete sich nach der Größe der Kulturschale.

Kulturschale	cDNA	Lipofectamin
24-Well	1,0 µg	2,5 µl
35-mm	2,5 µg	5,0 µl
60-mm	5,0 µg	10,0 µl

Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2. Material und Methoden

2.2.6 Inaktivierung des Proteasoms

Um den Abbau von Proteinen durch das Proteasom zu verhindern, wurden BHK-Zellen mit Lactacystin behandelt. Dafür wurde 24 h nach der Transfektion Lactacystin in einer Endkonzentration von 10 μM dem Kulturmedium zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend für weitere 15-20 h kultiviert.

2.2.7 Transfektion von siRNA in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in 60 mm-Kulturschalen ausgesät, bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % kultiviert und anschließend mit 80 pmol (10 μl) der jeweiligen siRNA und 10 μl Lipofectamin[®]2000 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit der jeweiligen siRNA transfiziert und für weitere 48 h in Kultur gehalten. Die Analyse der Zellen erfolgte 72 h nach der ersten Transfektion.

2.2.8 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Sterile Deckgläschen in einer 24-Well-Gewebekulturschale wurden mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) für 10 min bei RT beschichtet, anschließend zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und für 2 h unter dem Abzug luftgetrocknet. BHK- bzw. COS7-Zellen wurden ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 60 bis 70 % kultiviert und anschließend transfiziert. 24-48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert.

COS7-Zellen wurden zuerst für 1 h mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid inkubiert, um die Proteinsynthese zu hemmen und den Austritt aus dem ER zu ermöglichen, bevor sie fixiert wurden.

Methanol-Fixierung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol für 5 min auf Eis fixiert. Danach wurden die Zellen viermal mit PBS bei RT gewaschen und zur Reduktion von unspezifischen Proteinwechselwirkungen dreimal für 5 min mit 1 % BSA in PBS (BSA/PBS) inkubiert. Die Deckgläschen wurden auf einen Parafilm[®]-Streifen überführt und anschließend für 2 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper (siehe 2.1.9, Seite 22) in 70 μl BSA/PBS inkubiert.

2. Material und Methoden

Daraufhin wurden die Deckgläschen dreimal 5 min mit BSA/PBS gewaschen und für 1 h unter Lichtausschluss bei RT mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern in 70 µl BSA/PBS inkubiert (siehe 2.1.9, Seite 22). Nach dreimaligem Waschen mit BSA/PBS wurden die Zellen für 10 min in einer DAPI-Lösung (1:2500 der 5 mg/ml-Stocklösung in BSA/PBS) inkubiert und erneut zweimal für 5 min mit BSA/PBS gewaschen. Um eventuelle Salze zu entfernen, wurden die Zellen schließlich zweimal mit Wasser gewaschen. Mit Hilfe eines Eindeckmediums („DAKO[®]Cytomation-Fluorescent Mounting Medium“) wurden die Deckgläser auf Objektträgern fixiert und über Nacht bei RT im Dunkel lichtgeschützt getrocknet.

Paraformaldehyd-Fixierung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5-10 min permeabilisiert. Zur Reduktion von unspezifischen Proteinwechselwirkungen folgte ein 30 minütige Inkubation mit 2 % FKS in PBS (FKS/PBS) bei RT. Die Deckgläschen wurden auf einen Parafilm[®]-Streifen überführt und anschließend für 2,5 h bei RT mit dem Erstantikörper in FKS/PBS inkubiert. Nach Waschen der Zellen 3 x 5 min mit PBS folgte die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern in PBS für 1 h unter Lichtausschluss bei RT. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min mit DAPI-Lösung inkubiert und weiter behandelt wie nach der Methanol-Fixierung.

Für Kollokalisationsstudien wurden die Zellen simultan mit den jeweiligen Erstantikörpern, die in unterschiedlichen Spezies generiert worden waren, inkubiert (siehe 2.1.9, Seite 22). Durch geeignete Wahl der Sekundärantikörper konnten diese spezifisch dargestellt werden.

Nach Einbettung der Deckgläschen wurden die Zellen durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (Vergrößerung: 63x, Leica DMIRE2) untersucht. Bei Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erfolgten nach Einzelaufnahme der Fluoreszenzsignale eine Überlagerung der digitalen Bilder (Adobe[®] Photoshop[®] Software).

2. Material und Methoden

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Lysaten aus Zellen

Zur Präparation des Lysates wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS bzw. Sucrose-Puffer (0,25 M Sucrose in 10 mM Tris/HCl pH 7,4) abgeschabt. Die Zellsuspension wurde für 5-10 min bei 200-1000 x g (siehe Tabelle) und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde die Zellsuspension in 0,1 % Triton X-100 (Tx100) in PBS in An- oder Abwesenheit von 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (IC) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurden nicht solubilisierte Membranbestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 20800 x g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde dann für weitere Analysen verwendet (siehe Tabelle).

Alternativ wurden sedimentierte Zellen in Sucrose-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und anschließend 40x in einem Tight-Douncer homogenisiert. Das Homogenat wurde dann für 30 min bei 119000 x g und 4°C in dem S100 AT4-523-Rotor der Sorvall Micro-Ultracentrifuge® zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für weitere Analysen verwendet (siehe Tabelle).

Zelltyp in Kultur	Erntepuffer	Zentrifugation	Lysispuffer	Lysatherstellung
6 cm Schale COS-7- bzw. BHK-Zellen (CLN5-Versuche)	1 ml PBS	10 min 200 x g 4°C	100 µl PBS 0,1 % Tx100 IC	10 min auf Eis Zentrifugation 10 min 20800 x g 4°C
6 cm Schale BHK-Zellen (Neurabin-I-Versuche)	1 ml Sucrose- Puffer	5 min 800 x g 4°C	200 µl Sucrose-Puffer IC	40 x douncen Ultrazentrifugation 30 min 119000 x g 4°C
75 cm ² -Flasche Fibroblasten (CTSD-Versuche)	5 ml Sucrose- Puffer	7,5 min 1000 x g 4°C	500 µl Sucrose-Puffer	10 min auf Eis Zentrifugation 10 min 20800 x g 4°C

2. Material und Methoden

2.3.2 Homogenisierung von Mäuse-Geweben

Die Gewebe wurden mit Hilfe eines Skalpells auf Eis zerkleinert und anschließend in 400 µl 0,1 % Triton X100 in PBS pro 100 mg aufgenommen und 40x mit einem Douncer auf Eis homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde das Homogenat für 15 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann für weitere Analysen verwendet.

Aus den Hirnen von Mäusen unterschiedlichen Alters wurden Cortex, Cerebellum und Stammhirn präpariert.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinmenge in Lösungen wurde mit dem *Bio-Rad Protein Assay* gemäß Herstellerprotokoll bestimmt.

2.3.4 Messung von Enzymaktivitäten

2.3.4.1 Cathepsin D

Acetate/Formiate (Ac/F)-Puffer

50 mM Essigsäure
50 mM Ameisensäure
pH 3,7

Substratgemisch

0,02 % AMCA^{*}-Hb
0,08 % Hb in 5 mM Tris/HCl pH 8,0
0,1 mM Leupeptin
(Vor dem ersten Gebrauch wurde das SG
60 min bei 37°C inkubiert)

^{*}AMCA: 6-[(7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl)
amino]hexoic acid

Pro Ansatz wurden 5 µg Protein eingesetzt und mit d.H₂O auf ein Volumen von 20 µl adjustiert. Nach dem Zufügen von 10 µl Ac/F-Puffer und 10 µl Substratgemisch folgte eine Inkubation von 4 bis 5 h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 50 % Trichloressigsäure gestoppt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Proben für 5 min bei 1600 x g zentrifugiert und 40 µl Überstand entnommen und in eine 96 Wellplatte (schwarz) überführt. Jedem Well wurden 150 µl 1 M Tris-Puffer pH 9,0 zugesetzt und die Fluoreszenz im VICTOR™ X2 Wallac® Multilabel Counter (Emission bei 460 nm) gemessen. Mittels einer Eichgeraden aus 4-Methyl-

2. Material und Methoden

Umbelliferon (4MU) wurde die spezifische Enzymaktivität bezogen auf Zellproben (pmol/h/mg Protein) berechnet.

Um die Spezifität der Aktivitätsbestimmung zu bestimmen, wurden Parallelproben in der Gegenwart von 2,5 µg/ml des spezifischen Cathepsin D-Inhibitors Pepstatin A inkubiert.

2.3.4.2 β-Hexosaminidase-Aktivität

Substratpuffer

10 mM 4-Nitrophenyl N-Acetyl-β-D-glucosaminide
0,1 M Na-Citrat-Puffer pH 4,6
0,2 % Triton X100

Stopp-Puffer

0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4

Pro Ansatz wurden 2-10 µl des zu messenden Zelllysates eingesetzt und mit d.H₂O auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Nach Zugabe von 100 µl Substratpuffer folgte eine Inkubation von 30 bis 240 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µl Stopp-Puffer beendet und die Absorption des entstandenen p-Nitrophenol bei 405 nm gemessen.

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für p-Nitrophenolat beträgt 18,5 cm²/µmol. Die Einheit U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Substrat pro Minute bei Standardbedingungen umsetzt. Daher berechnet sich die Aktivität des Enzyms nach der Formel:

$$\begin{aligned} \text{Aktivität [mU/ml]} &= \frac{E_{405} \times \text{Gesamtvolumen [ml]} \times 1000}{\epsilon \times \text{Probenvolumen [ml]} \times \text{Inkubationszeit [min]} \times \text{Schichtdicke [cm]}} \\ &= \frac{E_{405} \times 1 \times 1000}{18,5 \times \text{Probenvolumen [ml]} \times 30 \text{ bis } 240 \times 1} \end{aligned}$$

2.3.5 Deglykosylierung von Proteinen

2.3.5.1 N-Glykosidase F (PNGaseF)

Das Enzym PNGaseF spaltet *in vitro* N-glykosidische Bindungen an Glykoproteinen. Dazu wurden 100 µg zelluläres Protein in 100 µl 0,1 % Triton X100 in PBS mit 2 µl 10 % SDS versetzt und für 10 min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl 10 % NP-40 und 3 µl PNGaseF (3 U) hinzugefügt und die Proben 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Proben unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne PNGaseF, inkubiert.

2.3.5.2 Endoglykosidase H (EndoH)

Das Enzym EndoH spaltet *in vitro* mannosereiche Glykane von Glykoproteinen. Dazu wurden 100 µg zelluläres Protein in 80 µl 0,1 % Tx100 in PBS mit 8 µl 10x Denaturationspuffer (0,5 % SDS mit 1 % Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl Reaktionspuffer (0,5 M Na-Citrat pH 5,5) und 10 µl EndoH (0,05 U) hinzugefügt und die Proben 15 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Proben unter den gleichen Bedingungen ohne EndoH inkubiert.

2. Material und Methoden

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

Trenngel

7,5-10 % Acrylamid
375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1 % SDS
0,08 % APS
0,08 % TEMED

Sammelgel

4 % Acrylamid
125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1 % SDS
0,1 % APS
0,1 % TEMED

Solubilisierungspuffer (Endkonz.)

50 mM Tris/HCl pH 6,8
4 % SDS
12 % Glycerin
Coomassie® Blue G
+/- 100 mM DTT

Anodenpuffer (1x)

250 mM Tris/HCl, pH 8,6
192 mM Glycin

Kathodenpuffer (5x)

125mM Tris-Base pH 8,6
960 nM Glycin
0,5 % SDS

Die Proteine wurden nach ihrer molaren Masse durch SDS-PAGE in modifizierter Form nach Laemmli *et al.* (1970) in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele variierte von 7,5-10 %. Je nach Experiment wurden die aufzutragenden Proben zuvor in reduzierendem (mit DTT) oder nicht reduzierendem Solubilisierungspuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte bei RT und 55 mA/Gel für ca. 3 h.

2.3.7 Western-Blot-Analyse

Transferpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

Blockpuffer

PBS bzw. TBS
0,2 % Tween 20 0,2 % Tween 20
5 % Milchpulver 1 % BSA

Waschpuffer

PBS bzw. TBS
0,2 % Tween 20
5 % Milchpulver

ECL-1

2,7 mM Luminol
0,44 mM p Cumarinsäure
100 mM Tris/HCl pH 8,5

ECL-2

100 mM Tris/HCl pH 8,5
0,02 % H₂O₂

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus dem Gel auf Nitrocellulosemembranen wurde in Abhängigkeit der molaren Masse der untersuchten Proteine für 2-3,5 h bei 900 mA in einer Elektroblot-Apparatur durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung unspezifischer Bindungen 1-3 h in Blockpuffer inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (in Blockpuffer verdünnt) für 1-3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dann dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 h mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (in Waschpuffer verdünnt) unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit Waschpuffer erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch eine „enhanced chemilumineszenz“ (ECL)-Reaktion. Dafür wurden die Lösungen ECL-1 und ECL-2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Dies konnte anschließend entweder auf Röntgenfilmen entwickelt oder mit dem *Bio-Rad-Molecular Imager*[®]/*ChemiDoc*TM*XRS* mit eingebauter Digital-Kamera aufgenommen werden.

Durch die vollständige Entfernung von Antikörpern können Nitrocellulosemembranen mehrfach in Western-Blot-Analysen verwendet werden. Dazu wurde die

2. Material und Methoden

Membran einmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in 0,2 M Natronlauge für 3 bis 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit d.H₂O gewaschen, bevor sie erneut mit dem Blockpuffer inkubiert wurde.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung humaner genomischer DNA

Die Isolierung humaner genomischer DNA wurde aus EDTA-Vollblut sowie aus kultivierten Patienten Hautfibroblasten mittels des *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* nach den Instruktionen des Herstellers isoliert.

2.4.2 RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen

Die Aufarbeitung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen (humanen Fibroblasten, BHK-Zellen, HeLa-Zellen) wurde mit dem *RNeasy[®] Mini Kit* nach den Instruktionen des Herstellers (Qiagen, Hilden) isoliert.

Die Aufarbeitung von Gesamt-RNA aus isolierten Lymphozyten wurde mit dem *RNeasy[®] Micro Kit* nach den Instruktionen des Herstellers (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.4.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen d.H₂O. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Die Konzentrationsbestimmung von RNA sowie eine genauere Messung von DNA und die Qualitätsmessung von Nukleinsäure erfolgten ohne Küvette mit dem NanoDrop[™] ND-1000 Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen).

2.4.4 Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl pH 8,5
20 mM Essigsäure
2 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (5x)

0,05 % Bromphenolblau
0,05 % Xylencyanol
15 % Ficoll

RNA-Probenpuffer

48 % deionisiertes Formamid
10 % MOPS
17 % Formaldehyd
8 % Glycerin
3 % Bromphenolblau

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder RNAs wurden 1-2 %ige Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera aufgenommen.

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA konnte mit Hilfe des *QIAquick®-Spin-Gel Extraction* Kit nach Anweisung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aus der Agarose extrahiert werden.

2.4.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische kurze Nukleotidsequenzen und spalten die DNA in diesem Bereich. Um die optimalen Bedingungen für das jeweils benutzte Enzym zu schaffen, wurde einem Restriktionsansatz neben dem Restriktionsenzym (10 Units pro 20 µl Ansatz) und der zu spaltenden DNA (0,1-1 µg pro 20 µl Ansatz) der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Reaktionspuffer zugegeben. Der Restriktionsansatz wurde für 30 min (mit *FastDigest™*-Restriktionsenzymen) bzw. 1-2 h (mit NEB-Restriktionsenzymen) bei 37°C bzw. bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

2. Material und Methoden

2.4.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Moleküle miteinander verbunden, beispielsweise bei der Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor. Ligationen wurden gemäß den Herstelleranweisungen mit dem *pcDNATMGateway[®]Directional TOPO Expression Kit* durchgeführt.

2.4.7 Mikrobiologie

2.4.7.1 Anzucht von *E. coli* und Lagerung

LB-Medium

1 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt
1 % NaCl

LB-Agar

1,5 % Agar in LB-Medium

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C. Zur kurzzeitigen Lagerung der Bakterienklone bei 4°C wurden LB-Agarplatten mit Antibiotikum verwendet.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Bakterien als so genannte Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 500 µl Glycerin (70 %) mit 500 µl einer Übernachtskultur gemischt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.4.7.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemokompetente TOP10-*E. coli*-Zellen (100 µl) (freundlicherweise von Dr. G. Galliciotti bereitgestellt) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA bzw. mit einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bis 1 min bei 42°C und einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurden 0,5 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht angezogen. Diese Übernachtskultur wurde für die Präparation der Plasmid-

2. Material und Methoden

DNA verwendet. Für die Plasmidselektion wurden die Antibiotika Ampicillin (100 mg/l) und Kanamycin (50 mg/l) verwendet.

2.4.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-Mini- und Midipräparationen wurden mittels des *QIAprep[®] Miniprep Kit* (bis 20 µg DNA) und *QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit* (für 20-100 µg DNA) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.4.8 PCR und Anwendungen

2.4.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren. Als Template wurde DNA bzw cDNA verwendet. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

50µl-Ansatz

50-150 ng DNA-Template
1 µl (=10 pmol) je Primer
4 µl (10 mM je Nukleotid) dNTPs-mix
1,5 µl (50 µM) MgCl₂ bzw. 3 µl (25 µM) MgCl₂
5 µl (10x) PCR-Puffer bzw. 10 µl (5x) GoTaq[®]-Puffer
0,5 µl *Taq*-Polymerase bzw. 0,5 µl GoTaq[®]-Polymerase

Typisches PCR-Programm

Denaturierung: 95°C 10 min
Denaturierung: 94°C 1 min
Annealing: T_m 1 min
Elongation: 72°C 2 min
Elongation: 72°C 10 min

} 35 x
←

(Die verschiedenen Primer und besondere PCR-Programme sind im Anhang 6.1 aufgelistet.)

2. Material und Methoden

2.4.8.2 Ortsspezifische Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) wurden gezielt einzelne Nukleinbasen eines Gens ausgetauscht. Dafür wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die beide die gewünschte Mutation enthielten. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde die Template-DNA kopiert, so dass Plasmide mit der neuen Sequenz synthetisiert wurden.

50 µl-Ansatz

50 ng Template-DNA
2 µl (= ca. 125 ng) je Primer
4 µl (10 mM je Nukleotid) dNTPs-mix
5 µl (10x) *Pfu*-Puffer bzw. 10 µl (5x) *Phusion*[®] HF-Puffer
1 µl *PfuTurbo*-Polymerase bzw. 0,5 µl *Phusion*[®]-Polymerase

PCR-Programm mit *PfuTurbo*

Denaturierung: 95°C 30 s

Denaturierung: 95°C 30 s
Annealing: T_m 1 min
Elongation: 68°C 17 Min } 16 x
Elongation: 68°C 10 Min

PCR-Programm mit *Phusion*[®]

Denaturierung: 98°C 1 min

Denaturierung: 98°C 30 s
Annealing: T_m 1 min
Elongation: 72°C 8 min } 18 x
Elongation: 72°C 15 min

Anschließend wurde die parentale, methylierte Plasmid-DNA 20 min bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (*FastDigest*TM) abgebaut, welches nur methylierte DNA spaltet. Danach wurde die amplifizierte, mutierte, einzelsträngige, zirkuläre DNA in *E.coli* transformiert und dort zur doppelsträngigen Plasmid-DNA vervollständigt.

Da die Ausbeute an zielgerichtet mutierter DNA nicht bei 100 % liegt, wurde zur Bestätigung der korrekten Sequenz das mutierte Gen anschließend sequenziert.

2.4.8.3 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA-Proben erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger *et al.* (1977).

20 µl-Ansatz

ca. 1 µg Plasmid-DNA
6 µl Puffer
2 µl Big-Dye-Terminator-Mix

Der Ansatz wurde mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Der Big Dye-Terminator-Mix enthält dNTPs, fluoreszenz markierte ddNTPs, Taq-DNA-

2. Material und Methoden

Polymerase und Reaktionspuffer. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler durchgeführt.

PCR-Programm

<i>Denaturierung:</i>	96°C 5 min	
<i>Denaturierung:</i>	96°C 10 s	} 25 x
<i>Annealing:</i>	50°C 5 s	
<i>Elongation:</i>	68°C 4 min	

Nach der Amplifikation wurde die DNA mit 2 µl 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 50 µl Ethanol (96 %) gemischt und für 15 min bei RT gefällt. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 17000 x g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Sediment wurde anschließend mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen, nochmals für 10 min zentrifugiert, für 30 min bei RT getrocknet und sequenziert.

2.4.8.4 cDNA-Synthese

RNA kann im Rahmen einer PCR nicht amplifiziert werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. Es ist daher nötig, in einem Zwischenschritt mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), zuerst eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die entstandene cDNA diente als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR. Die cDNA-Synthese aus RNA erfolgte mittels des *SuperScriptTM-III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, Karlsruhe) oder des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem, Darmstadt) nach Angabe der jeweiligen Hersteller.

2.4.8.5 Quantitative Real-Time PCR

Für die quantitative Analyse der RNA-Expression wurde der *TaqMan[®] Gene Expression Assay* verwendet. Dieser Assay enthält vorgefertigte Primer und Sonden. Die Sonde ist 5' mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, FAM, markiert, während das 3'-Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher-Farbstoff FAM-MGB trägt. Um die Extension der Sonde zu verhindern, ist das 3'-Ende zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert.

Liegt der Quencher in ausreichender Nähe zu dem Reporterfarbstoff (max. 17-20 Basen entfernt), wird die Energie des Reporterfarbstoffs nach Anregung bei 488 nm direkt an den Quencher-Farbstoff weitergeleitet (Cardullo *et al.*, 1988) und nur das

2. Material und Methoden

Fluoreszenzspektrum des Quenchers emittiert. Dieser Mechanismus wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Während der Extension des Primers trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und beginnt diese zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase aktiviert wird (Holland *et al.*, 1991). Die Aktivierung bewirkt die Hydrolyse der Sonde. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird aufgehoben und das nun entstehende Fluoreszenzsignal kann detektiert werden.

Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Die gemessene Fluoreszenz bleibt jedoch für eine gewisse Anzahl an Zyklen unverändert, da die entstehenden Produktmengen zu gering sind. In der exponentiellen Anstiegsphase wird der so genannte *cycle of threshold* (C_T) gesetzt. Der C_T -Wert einer Probe entspricht der Zahl der Zyklen der PCR, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dieser Wert ist die Grundlage für die weitere Auswertung.

Zuerst wurde die Differenz zwischen dem C_T -Wert des zu untersuchenden Gens und dem Kontrollgen (β -*Actin* oder *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)) gebildet. Die relative Expression wurde aus dem Vergleich der einzelnen Gruppen (Testgewebe (z.B. aus *knock-out*-Maus) gegen Kontrollgewebe (z.B. aus Wildtyp-Maus)) nach der folgenden Gleichung ermittelt (Livak und Schmittgen, 2001):

$$2^{-\Delta(\Delta Ct)} \text{ wo } \Delta Ct = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{Kontrollgen}}$$
$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{Testgewebe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrollgewebe}}$$

Für die graphische Auswertung wurde $\Delta Ct_{\text{Kontrollgewebe}}$ gleich 1 gesetzt.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem 20 μ l PCR-Ansatz in einer 96-Wellplatte, wobei alle PCR-Produkte dreifach bestimmt wurden. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000P™ (Stratagene, USA).

Real-Time PCR-Ansatz

10 μ l Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2x)
7 μ l Nuclease free H₂O
1 μ l *TaqMan*® Gene Expression Assay
2 μ l Template cDNA

PCR-Programm

95°C 10 min
95°C 30 s
60°C 1 min  40 x

2.4.9 Genetische Kopplungsanalyse (*genetic linkage analysis*)

Bei der genetischen Kopplungsanalyse werden genomweit genetische Marker, die in der Bevölkerung variabel sind, bei betroffenen und gesunden Familienmitgliedern analysiert. Der Vergleich zwischen genetischen Merkmalen innerhalb der Familie erlaubt die Identifizierung chromosomaler Abschnitte, die gemeinsam mit der Erkrankung an betroffene, nicht aber an gesunde Nachkommen vererbt wurden. Innerhalb einer so gekoppelten Region können dann krankheitsverursachende Mutationen durch Sequenzanalyse von Kandidatengenen ermittelt werden. Die in dieser Arbeit dargestellte Kopplungsanalyse an zwölf Patienten aus zwei Familien mit unklaren NCL wurde unter Anleitung von Dr. Kathrin Saar am Max-Dellbrück-Centrum, Medical Genomics and Genetics Institut, in Berlin durchgeführt.

2.4.9.1 Prinzip

SNPs

Die Kopplungsanalyse beruht auf der Analyse von mehr als 50 000 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Diese Einzelnukleotid-Polymorphismen bezeichnen Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang. SNPs stellen ca. 90 % aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar, sie treten nicht gleich sondern nur ungleichmäßig stark verteilt an bestimmten Regionen auf.

LOD-Score

Gene trennen sich auf verschiedenen Chromosomen nach der dritten Mendelschen Regel mit einer 50 %igen Wahrscheinlichkeit. Trennen sich zwei Gene auf einem Chromosom jedoch seltener, so spricht man von Genkopplung. Je näher die Gene aneinander liegen, desto unwahrscheinlicher ist die Trennung bei einem Rekombinationsereignis. Die statistische Abschätzung dieser Wahrscheinlichkeit wird als LOD-Score (*logarithmic odds ratio*) bezeichnet. Ein LOD-Score größer drei wird üblicherweise als Indikator für eine Genkopplung angesehen. LOD=3 bedeutet, dass bei einer beobachteten gemeinsamen Übertragung zweier Gene die

2. Material und Methoden

Wahrscheinlichkeit 1000 mal größer ist, dass die beiden Genorte aufgrund der Kopplung gemeinsam übertragen werden im Vergleich mit einem zufälligen Ereignis.

Vergleichsanalyse

Mit dem Vergleich zwischen den SNPs innerhalb einer Familie mit betroffenen und nicht betroffenen Mitgliedern bzw. innerhalb einer Gruppe von Familien, die einen ähnlichen Krankheit/Phänotyp nachweisen, können LOD-Scores für ein passendes Merkmal berechnet werden.

2.4.9.2 Methode

Die genaue Durchführung der verschiedenen Versuchsschritte erfolgte nach Angaben von Affymetrix (GeneChip® Mapping 100K Assay Manual).

250 ng genomischer DNA aus nativem Blut (wenn möglich) wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut, bevor es mit dem *Xba*I-Adaptor ligiert wurde. Diese DNA-Fragmente dienten als Template für eine anschließende PCR mit Adaptor-Primer. Nach Reinigung konnten 40 µg DNA mit *DNase*I fragmentiert und anschließend mit Hilfe der Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase Biotin-markiert werden. Danach konnten die Biotin-markierten DNA-Fragmente auf dem *Gene Chip*® *Human Mapping 50K Array Xba 240* hybridisiert werden. Schließlich wurden der Chip mit Streptavidin-Phycoerythrin und Antikörper inkubiert, bevor es mit dem GeneChip-Scanner gelesen werden konnte.

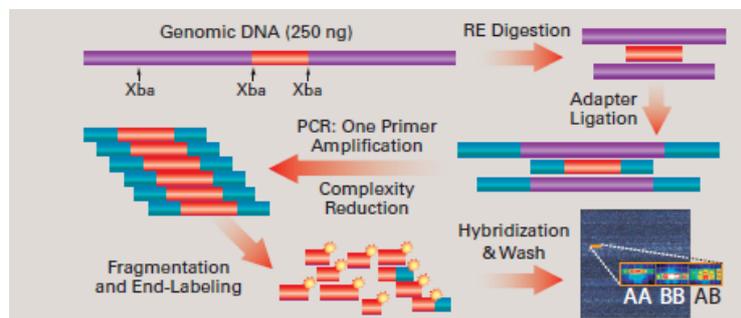


Abb. 4 Schematische Darstellung zur Durchführung des *Gene Mapping* (Affymetrix).

2. Material und Methoden

2.4.9.3 Analyse

Die Analyse und Korrelation der Daten sowie ihre statistische Auswertung wurde mit Hilfe von den ALOHOMORA- (Rüschendorf und Nürnberg, 2005), Merlin- (Abecasis *et al.*, 2002) und GeneHunter- (Kruglyak *et al.*, 1996) Programmen von Dr. F. Rüschendorf (*Max-Delbrück Centrum, Berlin*) durchgeführt. Die Sequenzierung von Kandidatengenomen wurde zum Teil kommerziell durch die Firma von LGC's AGOWA genomics, Berlin, ausgeführt, jedoch selber überprüft (Anhang 6.2, Tab. 8, Seite 104).

2.4.10 DNA-Microarray

RNA aus Lymphozyten von CLN3-Patienten und alters- und geschlechtsentsprechende gesunden Kontrollen wurde präpariert und zur Microarray-Analyse in das UKE-eigene Servicelabor (Institut für Klinische Chemie, Dr. T. Streichert) gegeben. Die Expressionsanalyse von 14 500 Genen erfolgte im Affymetrix-System unter Verwendung vom *Gene Chip[®] Human Genome U133 Plus 2.0*.

3 ERGEBNISSE

3.1 Etablierung des Cathepsin D-Tests

Um CLN10 beim Verdacht auf NCL ausschließen zu können, sollten als erstes die Bedingungen eines hochsensitiven Fluoreszenz-basierten Cathepsin D (CTSD)-Assays (Partanen *et al.*, 2003) etabliert werden. Dafür wurden Leber-Homogenate aus Wildtyp- bzw. *CtsD*-defizienten-Mäusen getestet.

Bei Verwendung von 20 µg Gesamtprotein und einer Inkubation mit dem Substrat für 4,5 h (Abb. 5) betrug die spezifische *CtsD*-Aktivität ca. 1250 pmol/h*mg Protein (Wildtyp-Maus). Hingegen war im Leber-Homogenat aus *CtsD*-defizienten Mäusen eine Aktivität von 380 pmol/h*mg Protein messbar. In Gegenwart des spezifischen *CtsD*-Inhibitors, Pepstatin A, wurden vom Substrat ca 160 pmol/h*mg Protein umgesetzt.

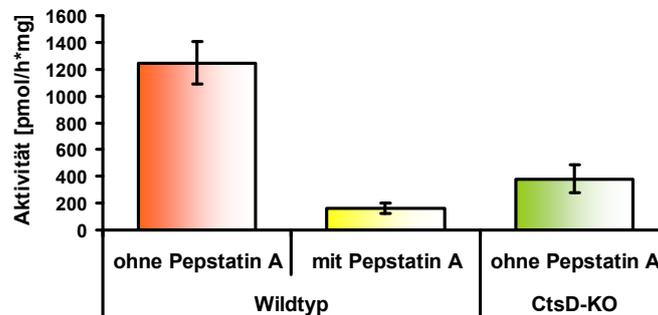


Abb. 5 Spezifische Aktivität von Cathepsin D in Leber-Extrakten von Wildtyp- und *CtsD*-defizienten Mäusen.

In Homogenaten aus Leber von Wildtyp- und *CtsD*-defizienten-Mäusen (*CtsD*-KO) wurde die Enzymaktivität von Cathepsin D bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Aktivität (pmol/h*mg Protein) wurden aus 3 Doppelbestimmungen ermittelt. Die Leberextrakte aus Wildtyp-Mäusen wurden zusätzlich in Gegenwart des spezifischen *CtsD*-Inhibitors, Pepstatin A, inkubiert.

Zur Festlegung der optimalen Proteinmenge, bei der die *CtsD*-Aktivität gemessen werden soll, wurden verschiedene Proteinkonzentrationen (von 5 bis 40 µg) des Leber-Homogenates aus Wildtyp-Mäusen für 5 h mit dem Substrat inkubiert (Abb. 6). Die spezifische *CtsD*-Aktivität sinkt mit der Erhöhung der angesetzten Proteinkonzentration ab. In Gegenwart von Pepstatin A (Daten nicht gezeigt) wurde

3. Ergebnisse

keine spezifische CtsD-Aktivität gemessen (weniger als 300 pmol/h*mg). Um eine optimale spezifische Aktivität zu messen, sollte eine Proteinkonzentration verwendet werden, die in dem linearen Bereich steht. Es wurde demnach 5 µg Protein bei den CtsD-Assay angesetzt.

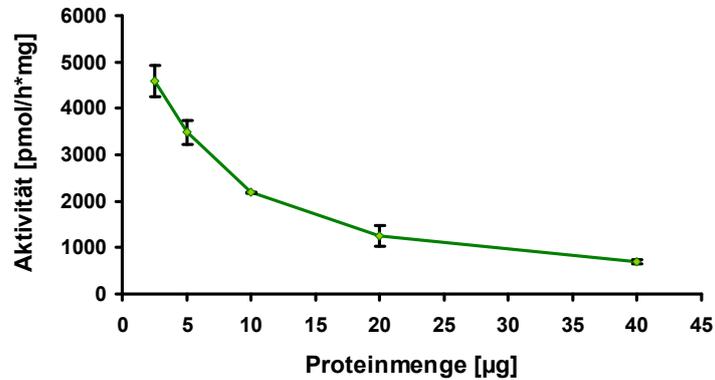


Abb. 6 Proteinmenge-Linearitätsbestimmung der spezifischen Aktivität von Cathepsin D in Leber-Homogenat aus einer Wildtyp-Maus.

In Leber-Homogenat aus einer Wildtyp-Maus wurde die Enzymaktivität von Cathepsin D bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der spezifischen Aktivität (pmol/h*mg Protein) wurden aus einer Doppelbestimmung ermittelt.

Schließlich wurde die Inkubationszeit optimiert. Dafür wurden 5 µg Protein des Leber-Homogenates aus Wildtyp-Mäusen mit dem Substrat für 0,5; 1; 2; 2,5; 5, 10 und 24 h inkubiert (Abb. 7). Die spezifische CtsD-Aktivität sank mit der Inkubationszeit (> 1 h) ab. In Gegenwart von Pepstatin A war eine erniedrigte Aktivität messbar (Daten nicht gezeigt). Um eine optimale spezifische Aktivität zu messen, sollte die Inkubationszeit die in dem linearen Bereich liegt, verwendet werden. Die Proteine und das Substrat sollten demnach 2 bis 3 h bei dem CtsD-Assay zusammen inkubiert werden.

3. Ergebnisse

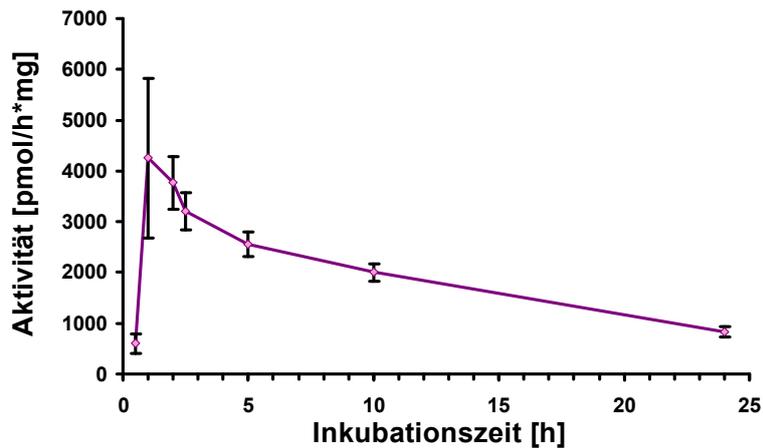


Abb. 7 Zeit-Linearitätsbestimmung der spezifischen Aktivität von Cathepsin D in Leber-Homogenat aus einer Wildtyp-Maus.

In Leber-Homogenat aus einer Wildtyp-Maus wurde die Enzymaktivität von Cathepsin D bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Aktivität (pmol/h*mg Protein) wurden aus einer Dreifachbestimmung ermittelt.

Der Cathepsin D-Assay wurde an Lysaten aus vier verschiedenen humanen Fibroblasten-Zelllinien kontrolliert. Dafür wurden 5 µg Protein von vier Lysaten aus Kontroll-Fibroblasten mit dem Substrat für 5 h inkubiert (Abb. 8). Die spezifische CTSD-Aktivität war in den vier Zelllinien vergleichbar (1500 bis 2500 pmol/h*mg Protein). In Gegenwart von Pepstatin A lag die Aktivität zwischen 130 und 250 pmol/h*mg Protein.

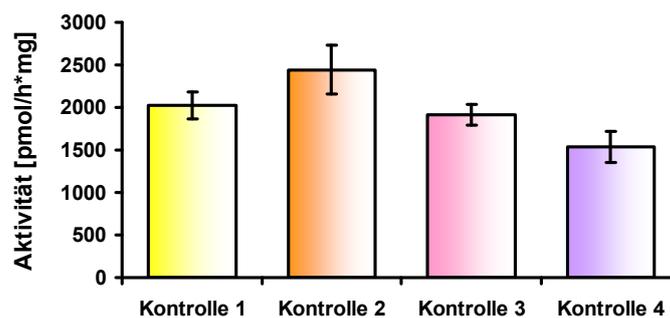


Abb. 8 Spezifische Cathepsin D-Aktivität in vier Fibroblasten-Zelllinien gesunder Kontrollen.

In vier verschiedenen Fibroblasten-Lysate gesunder Kontrollen (5 µg Protein) wurde die Cathepsin D-Aktivität bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der spezifischen Aktivität (pmol/h*mg Protein) wurden aus einer Dreifachbestimmung ermittelt.

3. Ergebnisse

3.2 Identifikation von Genmutationen mittels genetischer Kopplungsanalyse

Im ersten Teil der Arbeit sollte das krankheitsverursachende Gen bei zwei Familien (Familien 1 und 2) mit Hilfe der Kopplungsanalyse identifiziert werden. Aufgrund des Zeitpunktes der Erkrankung und des jeweiligen Krankheitsverlaufs wurden bei diesen beiden Familien eine juvenile bzw. eine spätinfantile NCL vermutet.

Bei der Familie 1 handelt es sich um eine konsanguine Familie türkischer Herkunft mit einem früh verstorbenen, zwei kranken (10 und 12 Jahre alt) und vier gesunden Kindern (Abb. 9).

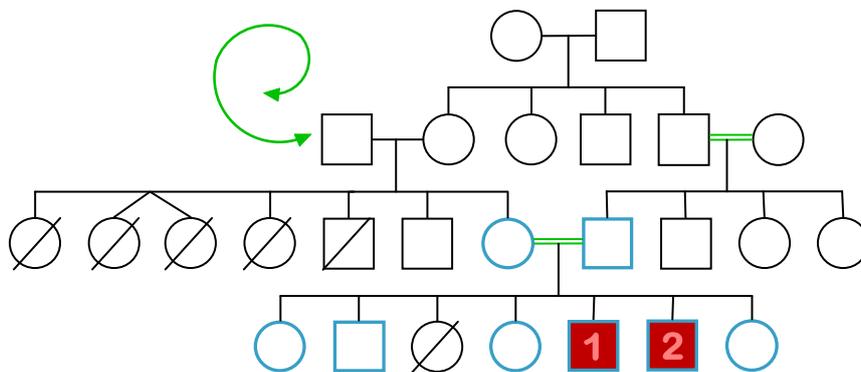


Abb. 9 Stammbaum der Familie 1.

Mit rot sind die zwei betroffenen Patienten mit unklarer NCL angezeigt. Die für die Analyse verfügbaren DNAs sind blau markiert. Die grünen Doppelstriche bzw. Pfeile weisen auf die nahe Verwandtschaft hin. Die durchgestrichenen Symbole weisen auf frühzeitig verstorbene Familienmitglieder hin.

Bei der Familie 2 handelt es sich um eine konsanguine Familie pakistanischer Herkunft mit zwei kranken Patienten und einem gesunden Bruder (Abb. 10).

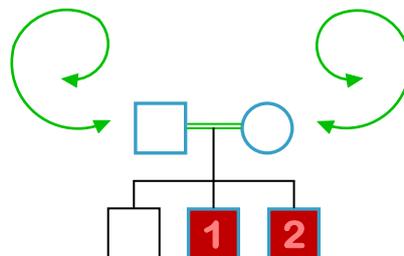


Abb. 10 Stammbaum der Familie 2.

Mit rot sind die zwei betroffenen Patienten angezeigt. Die für die Analyse verfügbaren DNAs sind blau markiert. Die grünen Doppelstriche bzw. Pfeile weisen auf die nahe Verwandtschaft hin.

3. Ergebnisse

Zusätzlich wurde eine dritte konsanguine Familie (Familie 3) afghanischer Herkunft mit zwei kranken und zwei gesunden Kindern mit einem unklaren spätinfantilen NCL analysiert. Jedoch stand nur die DNA der zwei kranken Patienten zur Verfügung und eine genetische Kopplungsanalyse war deshalb bei dieser Familie nicht möglich.

3.2.1 Ausschluss bekannter Gen- und Protein-Defekte

Zunächst wurden Mutationen in Genen (*CLN3*, *CLN6* und *CLN8*), die mit spätinfantilem bzw. juvenilem Krankheitsbeginn bei Patienten asiatischer oder türkischer Herkunft assoziiert sind, durch Sequenzierung ausgeschlossen. Zusätzlich wurden *CLN1* und *CLN2* durch enzymatische Bestimmung der PPT1 und TPP1 im Diagnostiklabor des UKE ausgeschlossen. Da es sich um Familien türkischer (Familie 1), pakistanischer (Familie 2) bzw. afghanischer (Familie 3) Herkunft handelte, wurde das Gen der finnischen Variante, *CLN5*, nicht sequenziert. Das *CLN7*-Gen war zum Zeitpunkt der Patientenanalysen noch nicht bekannt.

Zusätzlich wurde auch die Enzymaktivität von Cathepsin D (Abb. 11) bei den Patienten der jeweiligen Familien gemessen, da eine Defizienz von CTSD auch mit spätinfantilem oder juvenilem Krankheitsbeginn einhergehen kann. In Extrakten aus Fibroblasten von je einem Patient aus Familie 1-3 konnte eine CTSD-Aktivität zwischen 2800 und 4300 pmol/h*mg gemessen werden, was vergleichbar mit der CTSD-Aktivität in Kontrollzellen (ca. 2780 pmol/h*mg) war. In Gegenwart des spezifischen CTSD-Inhibitors, Pepstatin A, wurde vom Substrat zwischen 300-500 pmol/h*mg Protein umgesetzt. Damit konnte die durch CTSD-Defizienz bedingte CLN10-Krankheit bei den Patienten ausgeschlossen werden.

3. Ergebnisse

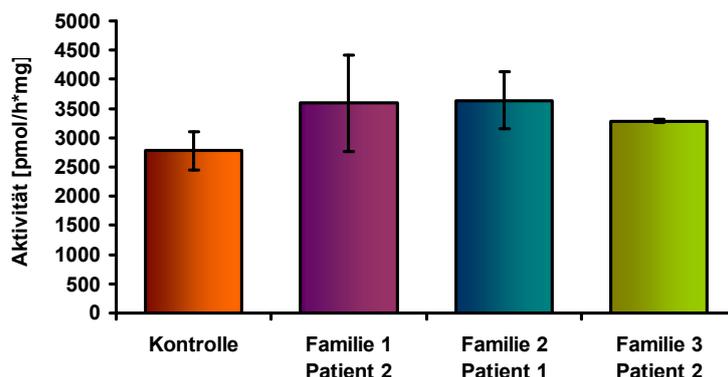


Abb. 11 Spezifische Aktivität von Cathepsin D in Lysaten von Fibroblasten von Patienten aus drei Familien mit unklarer NCL.

In Zelllysaten aus Fibroblasten von Patienten aus Familie 1-3 wurde die Enzymaktivität von Cathepsin D bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der spezifischen Aktivität (pmol/h*mg Protein) des Patienten 2 der Familie 1 bzw. des Patienten 1 der Familie 2 wurden aus zwei Dreifachbestimmungen ermittelt. Der Mittelwert und Standardabweichung der spezifischen Aktivität des Patienten 2 der Familie 3 wurde aus einer Dreifachbestimmung ermittelt. Fibroblastenlysate eines deutschen, gesunden Patienten diente als Kontrolle.

Zusätzlich wurde die Aktivität der β -Hexosaminidase (Abb. 12) als lysosomales Kontrollenzym in den Zellextrakten gemessen. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms entsprach den Werten aus Kontrollzellen (100-166 mU/ml gegen 86-116 mU/ml für die Kontrolle).

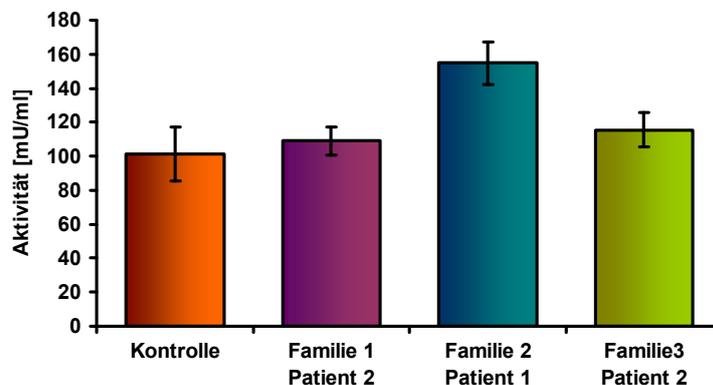


Abb. 12 Spezifische Aktivität von β -Hexosaminidase in Lysaten von Fibroblasten von Patienten aus drei Familien mit unklarer NCL.

In Zelllysaten aus Fibroblasten von Patienten aus Familie 1-3 wurde die Enzymaktivität von β -Hexosaminidase bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der spezifischen Aktivität (pmol/h*mg Protein) des Patienten 2 der Familie 1 bzw. des Patienten 1 der Familie 2 wurden aus zwei Zweifachbestimmungen ermittelt. Der Mittelwert und Standardabweichung der spezifischen Aktivität des Patienten 2 aus Familie 3 wurde aus einer Zweifachbestimmung ermittelt. Fibroblastenlysate eines deutschen, gesunden Patienten diente als Kontrolle.

3. Ergebnisse

Tab. 3 Ausschluss der bekannten Gen- und Protein-Defekte (CLN1, 2, 3, 6, 8 und 10).

	Familie 1	Familie 2	Familie 3	Kontrolle
CLN1 – PPT1	0,78 nmol/min*mg	0,53 nmol/min*mg	0,45 nmol/min*mg	0,46-1,8 nmol/min*mg
CLN2 – TPP1	0,33 nmol/min*mg	0,68 nmol/min*mg	1,34 nmol/min*mg	0,2-1,8 nmol/min*mg
CLN3	Sequenziert	Sequenziert	Sequenziert	
CLN6	Sequenziert	Sequenziert	Sequenziert	
CLN8	Sequenziert	Sequenziert	Sequenziert	
CTSD	3590 pmol/h*mg	3645 pmol/h*mg	3290 pmol/h*mg	2780 pmol/h*mg
β-Hex.	109 mU/ml	155 mU/ml	116 mU/ml	101 mU/ml

In der Arbeit durchgeführte Analysen sind gelb markiert. Grün-markierte Analysen wurden vom Stoffwechsellabor, UKE-Kinderklinik, Hamburg (Dr. Z. Lukacs) durchgeführt. Rosa-markierte Analysen wurden vom Institut für Humangenetik, UKE, Hamburg (Prof. Dr. A. Gal) durchgeführt. Lila-markierte Analysen wurden von Dr. A. Schulz (UKE, Hamburg) durchgeführt.

Somit wurden die bekannten Gen- und Protein-Defekte (CLN1, 2, 3, 6, 8 und 10) als Ursache für die Pathologie der Familien 1, 2 und 3 ausgeschlossen.

3.2.2 Identifikation einer homozygoten Mutation im *Neurabin-I*-Gen

3.2.2.1 Identifikation von vier potentiell homozygoten Genregionen durch genetische Kopplungsanalyse

Die genetische Kopplungsanalyse wurde zuerst bei Familie 1 durchgeführt. Hierzu stand sowohl DNA der zwei Patienten als auch von sechs gesunden Mitgliedern der Familie (Geschwister und Eltern) zur Verfügung. Für die Kopplungsanalyse wurde genomische DNA aus nativem Blut bei den acht Mitgliedern der Familie isoliert und anschließend verdaut, ligiert, amplifiziert, fragmentiert und markiert, bevor es auf dem *Gene Chip® Human Mapping 50K Array Xba 240* hybridisiert wurde. Nach Korrelation der verschiedenen Haplotypen anhand der Verwandtschaft und der Beziehung zwischen Patienten-Proben und gesunden Proben konnten vier Genregionen, verteilt auf den Chromosomen 1, 2 und 7, mit einem LOD-Score über 2 identifiziert werden, die möglicherweise das die Krankheit verursachende Gen enthalten (Abb. 13).

3. Ergebnisse

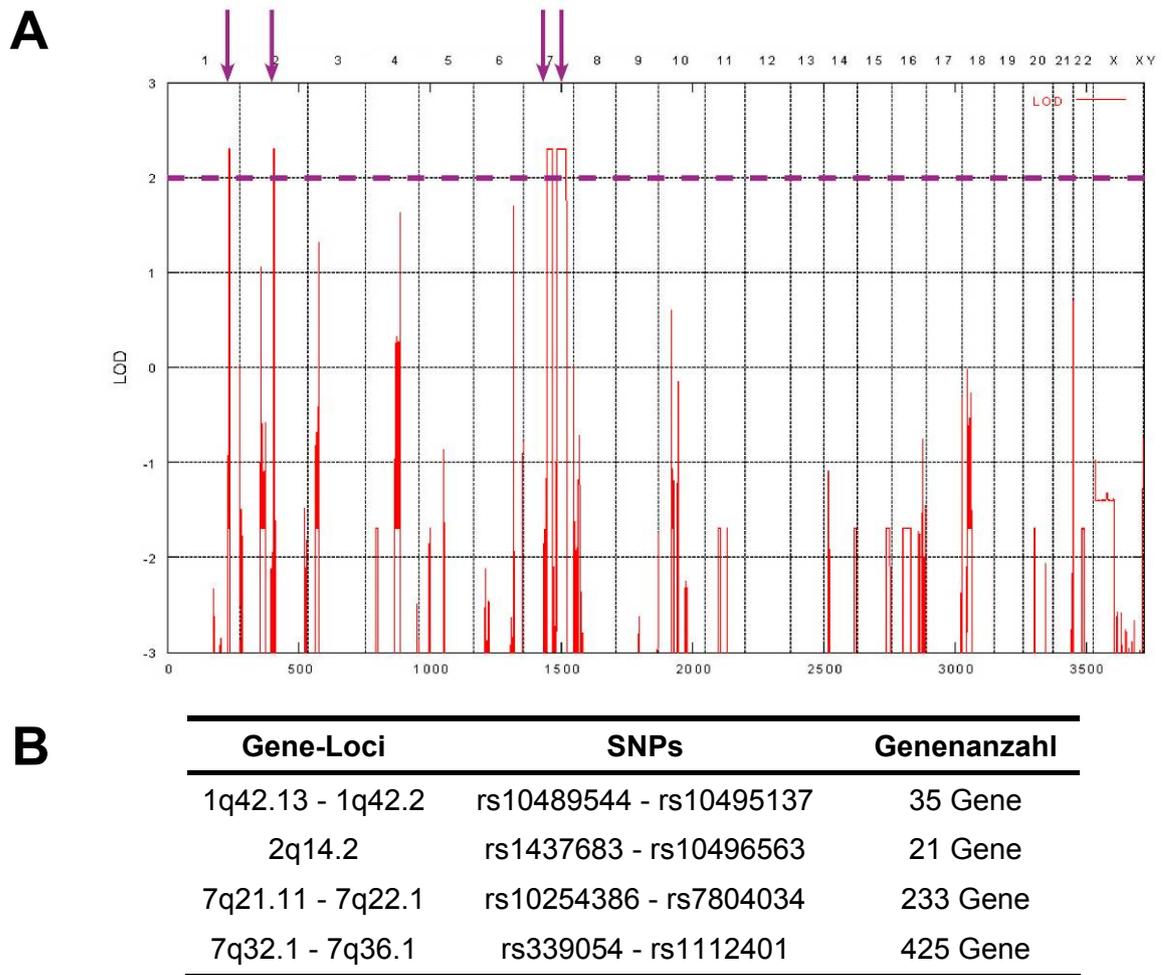


Abb. 13 Genetische Kopplungsanalyse der Familie 1.

A- Vier signifikante Regionen mit einem LOD-Score >2 , auf den Chromosomen 1 und 2, und zwei Regionen auf Chromosom 7 sind gekennzeichnet (Pfeile).

B- Gene-Loci, SNPs-Begrenzung und Anzahl der enthaltene Gene sind zusammengefasst.

Zur Identifikation des betroffenen Gens wurden innerhalb dieser gekoppelten Regionen Kandidatengene durch Sequenzanalyse untersucht.

3.2.2.2 Mutation in *PPP1R9A*

714 Gene befanden sich in den vier Genregionen, die einen LOD-Score über 2 zeigten. Keines der Gene war ein bekanntes NCL-Gen. Ebensov wenig befand sich ein NCL-Kandidatengenen (z.B. *CLCN7*, *CTSB*) unter den Genen. Da es nicht möglich war, alle 714 Gene zu sequenzieren, wurden zunächst Gene aufgrund ihrer Eigenschaften und möglichen Funktionen im Gehirn ausgesucht. Auswahlkriterien waren z.B. lysosomale Proteine, Expression in Neuronen, Funktion bei

3. Ergebnisse

Neurodegeneration oder neuronaler Entwicklung usw. Acht Kandidatengene wurden sequenziert, aber keine Mutation in den kodierenden Sequenzen festgestellt (Anhang 6.2, Seite 104).

In der ersten Region auf Chromosom 7 zwischen den SNPs rs10254386 und rs7804034 (7q21.3) befindet sich das *PPP1R9A*-Gen, das für das „Protein Phosphatase 1, Regulatory (inhibitor) subunit 9A“, auch Neurabin-I (für „neural tissue-specific F-actin-binding protein“) genannt (Nakanishi *et al.*, 1997), kodiert. Bei der Sequenzierung des ersten Exons wurde eine homozygote Punktmutation des Nukleotids 1102 (c.1102G>A) bei den Patienten gefunden. Dieses mutierte Nukleotid wurde bei den Eltern und einem der gesunden Geschwister als heterozygot nachgewiesen, während es bei den anderen Mitgliedern der Familie gar nicht auftauchte (Abb. 14). Diese c.1102G>A Mutation erwies sich also als gute Voraussetzung für das gesuchte Gen.

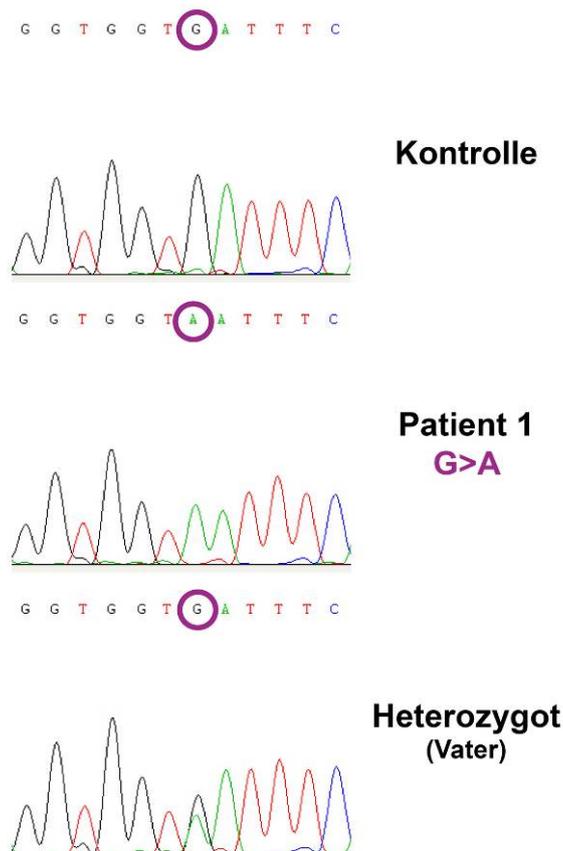


Abb. 14 Sequenzabschnitt des *PPP1R9A*-Exon 1 mit der c.1102G>A Mutation.

Die Sequenzierung des *PPP1R9A*-Gens zeigte eine homozygote Punktmutation des Nukleotids 1102 in Exon 1 (G>A) bei den zwei kranken Patienten (Patient 1 abgebildet) im Vergleich zur Kontrollsequenz (Kontrolle aus gesunder Fibroblasten-DNA abgebildet – GenBank NM_017650.2). Die Eltern (Vater abgebildet) und eins der gesunden Geschwister zeigten eine Heterozygotie G/A für das Nukleotid 1102.

3. Ergebnisse

Das *Neurabin-I*-Gen besteht aus 15 Exonen mit 3297 Nukleotiden und kodiert ein Protein aus 1098 Aminosäuren. Die c.1102G>A Mutation in Exon 1 des *Neurabin-I*-Gens führt zu einem Aminosäure-Austausch von Aspartat zu Asparagin an Position 368 (p.Asp368Asn). Neurabin-I ist ein hochkonserviertes Protein und der Aspartat-Rest an Position 368 ist bei alle Spezies hochkonserviert (Abb. 15).

		Sequenz- Ähnlichkeit
<i>Homo sapiens</i>	EIPSPQSQ LLEDAE ANLVGREAAKQQRKELAGG-DFTSPDASAS----- 377	
<i>Mus musculus</i> (Maus)	HILSPRNEPLEDAE ANVVGSEERAQHKKDLTGG-DLTSPDASAS----- 378	90,6 %
<i>Rattus norvegicus</i> (Ratte)	NTLSRPKEPLEDAE ANVVGSEAEQPQRDLTGGDLTSPDASAS----- 378	90,1 %
<i>Pan troglodytes</i> (Schimpanse)	EIPSPQSQ LLEDAE ANLVGSEAAKQQRKELAGG-DFTSPDASAS----- 377	90 %
<i>Canis lupus familiaris</i> (Hund)	EIPSPQNEPLGDAE ANLVGSEAAHQKKELAGG-DFTSADASGS----- 377	94,4 %
<i>Bos taurus</i> (Rind)	EIPSPQNEPSEDAEARLVESEAAHQRRRELGG-DFTSAEVSFRF----- 377	88,2 %
<i>Gallus gallus</i> (Huhn)	EVLRLRQKERSEHAE G-IADRPEAAEIPRNLVSGDDLVDAAASDAETHYD 398	70,4 %
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	EINSTKALNGSSTPAEVND AAGHLLLEATRVEDTDGHVKEESRR----- 340	57,8 %
	. : . : . : . : *	

Abb. 15 Konservierung des Aspartat-Restes an Position 368 des Neurabin-I in verschiedenen Spezies.

(CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment)

Die Protein-Sequenz des humanen Neurabin-I ist zu 58-94 % identisch mit Neurabin-I-Sequenz von Schimpansen bis zum Huhn. Der Aspartat-Rest (gelb markiert) ist bei allen Spezies hochkonserviert (*).

Neurabin-I ist in den Synapsen der ausgebildeten Neuronen und in den Lamellipodien des Wachstumskegels (spezialisierte Vorderende eines aussprossenden Axons) der sich neu-bildenden Neuronen hoch exprimiert und kann an Actin binden (Nakanishi *et al.*, 1997). Neurabin-I inhibiert die Protein-Phosphatase 1 (PP1) (McAvoy *et al.*, 1999) und spielt eine Rolle bei der Morphogenese der Neurone, deren Migration im Kortex (Causeret *et al.*, 2007) und bei der Morphogenese und Reifung der dendritischen Dornfortsätze (Ryan *et al.*, 2005; Terry-Lorenzo *et al.*, 2005).

3.2.2.3 Bestimmung der Allelfrequenz der Mutation

Um die Allelfrequenz der c.1102G>A Mutation von *Neurabin-I* zu kalkulieren, wurden DNAs aus einer Kontrollpopulation von 92 türkischen Kontroll-DNAs und 20 deutschen Kontroll-DNAs auf diese Mutation hin untersucht. Dafür wurde ein kleiner Teil des Exons 1 zuerst amplifiziert, um dann anschließend sequenziert zu werden. In keinem der 224 Kontrollallele wurde Homozygotie für die Mutation festgestellt. Bei drei türkischen und zwei deutschen Kontrollpersonen wurde eine G>A-Transition an Position 1102 in einem Allel des *Neurabin-I*-Gens festgestellt. Die Frequenz des mutierten Allels lag demnach bei 2,2 %.

3. Ergebnisse

3.2.2.4 Expressionsstudie der p.Asp368Asn-Mutation in Neurabin-I

Um die Auswirkung der p.Asp368Asn-Mutation auf Neurabin-I zu untersuchen, wurde die Mutation in die *Neurabin-I*-cDNA eingeführt, die am 3'-Ende kodierende Sequenzen für einen myc- und einen Flag-Tag enthielt. BHK-Zellen wurden anschließend mit Wildtyp- und mutanten cDNA-Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in An- und Abwesenheit von Lactacystin (10 µM) für 15-20 h inkubiert. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellextrakte wurden anschließend im Western-Blot analysiert (Abb. 16A).

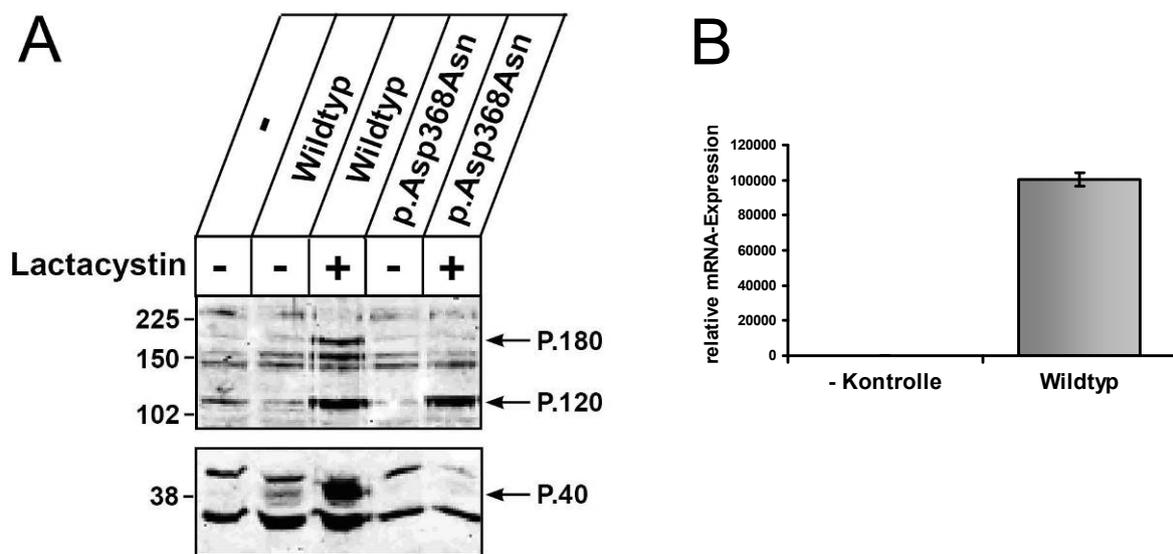


Abb. 16 Expression der Neurabin-I-Mutante in BHK-Zellen.

A- BHK-Zellen, die Wildtyp- oder mutantes Neurabin-I exprimierten, wurden mit oder ohne Lactacystin (10 µM) für 18 h kultiviert. Zellextrakte wurden präpariert und in reduzierendem Solubilisierungspuffer durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Neurabin-I Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte (-) BHK-Zellen.

B- Die RNA aus BHK-Zellen, die Wildtyp-Neurabin-I exprimierten, wurde isoliert und ihre relative Expression mittels Real-Time PCR analysiert. Der Mittelwert (+/- Standardabweichung) ist aus einer fluorometrischen Dreifachbestimmung berechnet. Als Negativkontrolle (- Kontrolle) dienten nicht transfizierte BHK-Zellen.

Humanes sowie murines Neurabin-I haben eine berechnete Molekularmasse von 123 kDa und werden als 180 kDa immunreaktive Proteine nachgewiesen (Burnett *et al.*, 1998). In Western-Blot-analyse Zellextrakte aus BHK-Zellen, die mit der Neurabin-I-Wildtyp-cDNA transfiziert wurden, konnte jedoch nur eine ca. 40 kDa-Bande (P.40) nachgewiesen werden, die in nicht-transfizierten Zellen nicht detektierbar war (Abb. 16A). Dieses Ergebnis wurde mit Verwendung von FLAG-Antikörper bzw. myc-Antikörper wiederholt und bestätigt (Daten nicht gezeigt). Wurden die Zellen jedoch zusätzlich mit dem Proteasomeninhibitor Lactacystin

3. Ergebnisse

behandelt, sind zusätzlich eine 180 kDa und eine 120 kDa-immunreaktive-Bande (P.180 bzw. P.120) nachweisbar. Im Vergleich dazu war bei der Neurabin-I-Mutante einzig die 120 kDa-Bande unter Lactacystin-Behandlung nachweisbar. Die Überexpression von *Neurabin-I* in Wildtyp-transfizierten BHK-Zellen wurde mittels quantitativer Real-Time PCR überprüft und bestätigt (Abb. 16B). Die Daten weisen darauf hin, dass unter den hier beschriebenen Bedingungen das humane Wildtyp- und mutante Neurabin-I in BHK-Zellen sehr instabil ist, und über den proteasomalen Abbauweg degradiert wird.

Zur Überprüfung der Tauglichkeit des Neurabin-I-Antikörpers wurde eine Western-Blot-Analyse in Stammhirn einer Maus durchgeführt (Abb. 17). Dabei wurden das erwartete 180 kDa immunreaktive Protein (P.180) und das 140 kDa Abbauprodukt (P.140) nachgewiesen (Burnett *et al.*, 1998).

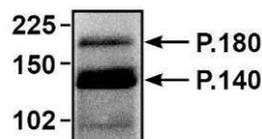


Abb. 17 Expression des endogenen Neurabin-I im Hirnextrakt einer Maus.

Ein Homogenat aus dem Stammhirn einer Maus wurde präpariert und eine Neurabin-I-Western-Blot-Analyse durchgeführt.

3.2.2.5 Intrazelluläre Lokalisation des Neurabin-I

Um zu wissen, ob die Mutation die Lokalisation des Neurabin-I-Proteins beeinflusst oder nicht, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Analyse durchgeführt.

Zuerst wurde die Lokalisation des endogenen Neurabin-I in kultivierten neuronalen Zellen mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 18). Erwartungsgemäß ist Neurabin-I im Zytosol der Zelle mit Actin kolokalisiert. Nur ein kleiner Anteil (weiße Pfeile) kolokalisiert mit Markern des endoplasmatischen Retikulums, PDI. Mit dem *cis*-Golgi-Marker, GM130, wurde hingegen keine Kolokalisation nachgewiesen.

3. Ergebnisse

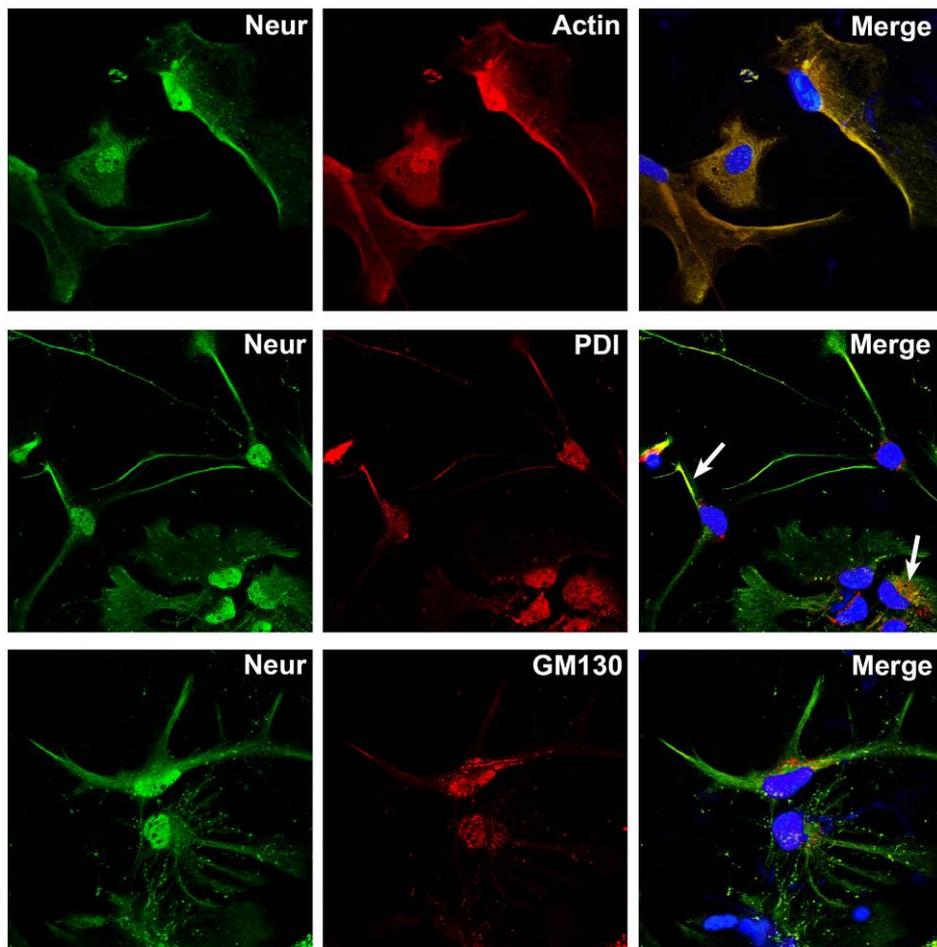


Abb. 18 Lokalisation des endogenen Neurabin-I in kultivierten Maus-Neuronen.

Kultivierte neuronale Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen Neurabin-I (grün), Actin (rot, oben), PDI (rot, mitte) und GM130 (rot, unten) angefärbt. Eine Kolokalisation der Proteine mit Organell-Markerproteinen ist rechts in gelb dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

Dann wurde die Lokalisation von humanem Wildtyp- und p.Asp368Asn-mutantem Neurabin-I untersucht. Dafür wurden BHK-Zellen mit Wildtyp- und mutanten cDNA-Konstrukten transfiziert, nach 24 h mit Lactacystin (10 μ M) für 17 h inkubiert, fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert (Abb. 19). Wie für das endogene Neurabin-I beschrieben, kolokalisiert ein Teil (weiße Pfeile) des überexprimierten Wildtyp-Neurabin-I bzw. der Neurabin-I-Mutante mit PDI, dem Markerprotein für endoplasmatische Retikulum-Strukturen. Keine Kolokalisation von Neurabin-I konnte mit dem *cis*-Golgi-Marker GM130 nachgewiesen werden (Abb. 19).

3. Ergebnisse

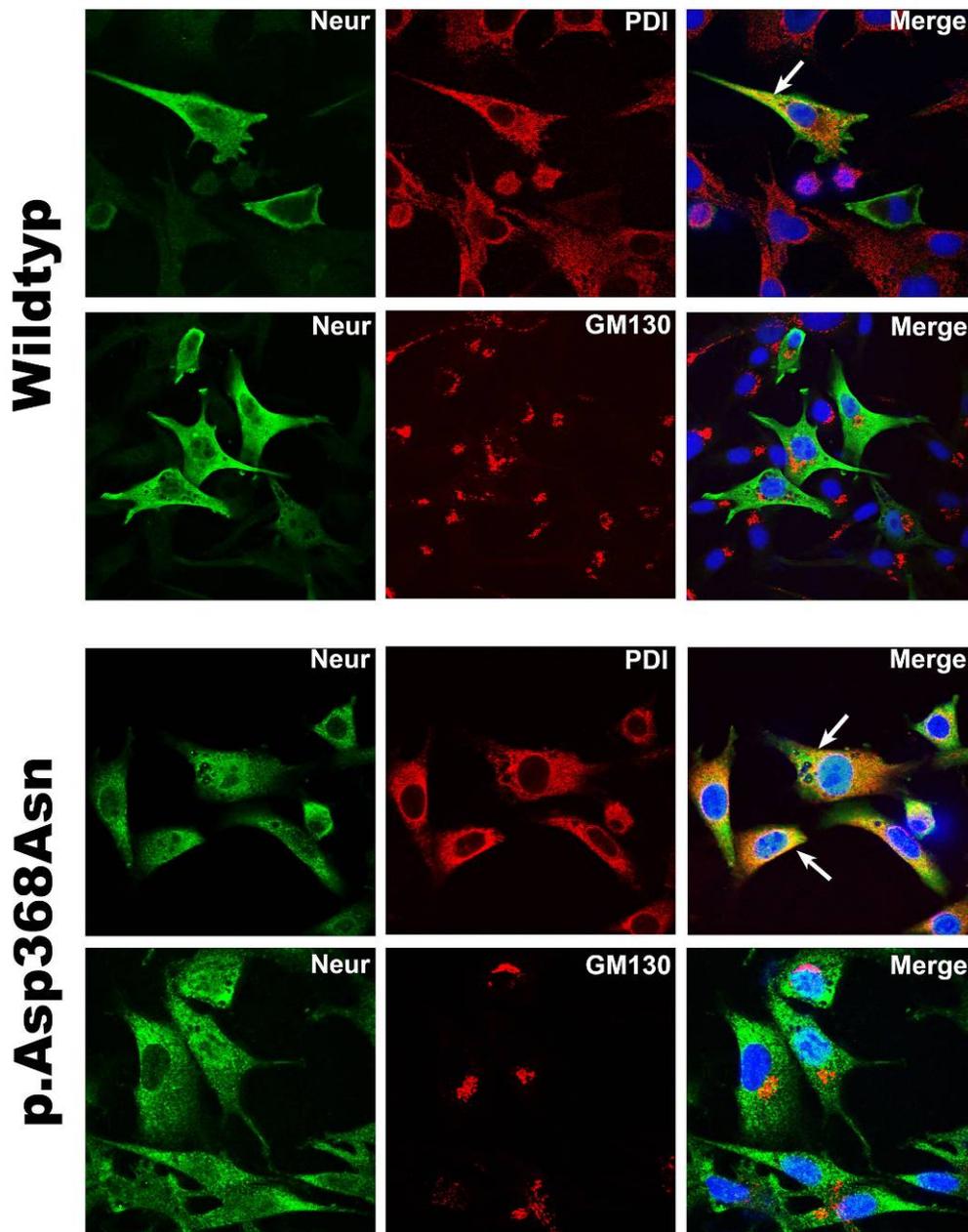


Abb. 19 Lokalisation des humanen Wildtyp- und des p-Asp368Asn-mutanten Neurabin-I in BHK-Zellen.

Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen Neurabin-I (grün), PDI (rot, oben) und GM130 (rot, unten) angefärbt. Eine Kolokalisation der Neurabin-I-Proteine mit Organell-Markerproteinen ist rechts in gelb dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

3. Ergebnisse

3.2.3 Atypische Formen von CLN5

3.2.3.1 Identifizierung einer Mutation in einem bekannten *NCL*-Gen

Die genetische Kopplungsanalyse wurde auch bei Familie 2 aus Pakistan durchgeführt, von der DNAs von zwei kranken Brüdern und ihren gesunden Eltern zur Verfügung standen. Mit Hilfe der *Gene Chip*-Analyse konnten sieben Genregionen mit einem LOD-Score größer 2, verteilt auf den Chromosomen 1, 5, 9, 10, 13 und 14, identifiziert werden, die möglicherweise das betroffene Gen enthalten, das die Krankheit verursachen kann (Abb. 20).

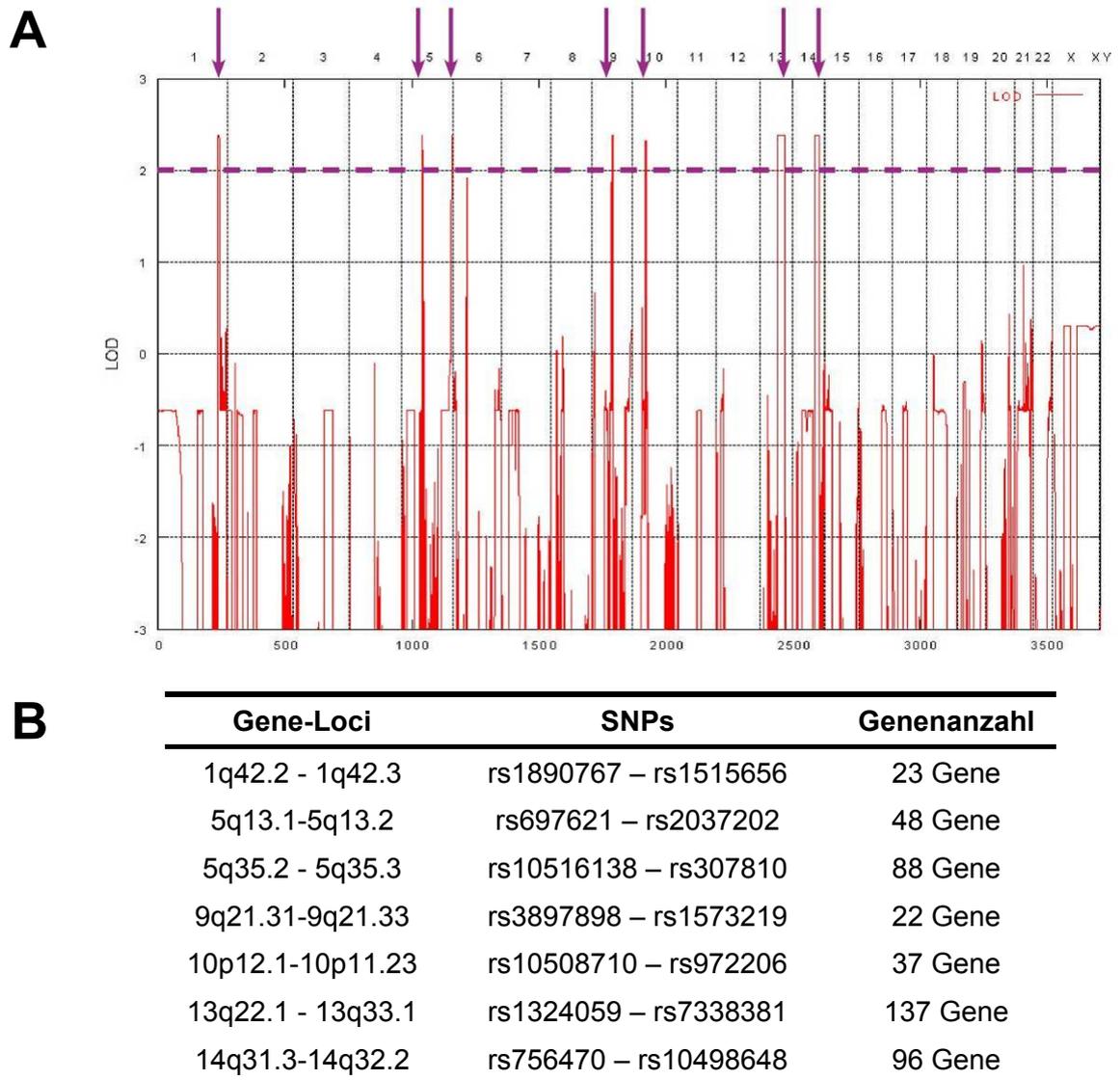


Abb. 20 Genetische Kopplungsanalyse der Familie 2.

A- Sieben signifikante Regionen mit einem LOD-Score >2, auf den Chromosomen 1, 9, 10, 13 und 14, und zwei Regionen auf Chromosom 5 wurden identifiziert (Pfeile).

B- Gene-Loci, SNPs-Begrenzung und Anzahl der enthaltenen Gene sind zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Innerhalb dieser gekoppelten Regionen wurde dann nach Anwesenheit von bekannten NCL- und Kandidaten-Genen gesucht. Eine potentielle Region, in der das krankheitsverursachende Gen möglicherweise liegt, ist auf Chromosom 13 zwischen den SNPs rs1324059 und rs7338381 lokalisiert und enthält u.a. das *CLN5*-Gen (13q22). Bei der Sequenzierung des *CLN5*-Gens wurde im Exon 4 eine homozygote Deletion der Nukleotide 1072 und 1073 (c.1072_1073delTT) bei beiden Patienten gefunden (Abb. 21). Diese Mutation wurde bei den Eltern als heterozygot nachgewiesen.

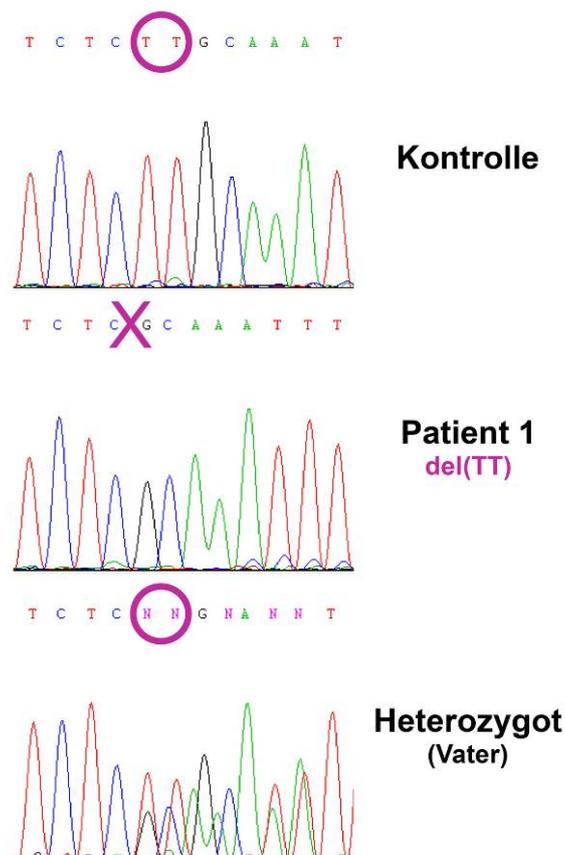


Abb. 21 Sequenzabschnitt des *CLN5*-Exon 4 mit der c.1072_1073delTT-Mutation.

Die Sequenzierung des *CLN5*-Gens zeigte eine homozygote Deletion der Nukleotide 1072 und 1073 in Exon 4 (del(TT)) bei zwei kranken Patienten (Patient 2 abgebildet) im Vergleich zu der normalen Kontrollsequenz (Kontrolle aus gesunder Fibroblasten-DNA abgebildet – GenBank NM_006493.2). Die Eltern (Vater abgebildet) zeigten eine Heterozygotie für die del(TT)-Mutation.

Das *CLN5*-Gen besteht aus 4 Exonen mit 1224 Nukleotiden. Es kodiert ein Protein, welches 407 Aminosäuren enthält. Die c.1072-1073delTT-Mutation in Exon 4 des *CLN5*-Gens hat eine Leserasterverschiebung zur Folge, die zu einer Aminosäureveränderung von Leucin zu Alanin an der Position 358 und einem

3. Ergebnisse

frühzeitigen Stopp-Codon nach vier neuen Aminosäureresten (p.Leu358AlafsX4) führt. Diese Mutation wurde noch nie beschrieben und ist die erste *CLN5*-Mutation, die bei einem Patient aus Asien (Pakistan) gefunden wurde.

3.2.3.2 Identifizierung einer zweiten unbekanntenen Mutation im *CLN5*-Gen

Der Nachweis einer *CLN5*-Mutation in pakistanischen Patienten zeigt, dass die *CLN5*-Krankheit nicht nur in Europa (Finnland (Savukoski *et al.*, 1998), Niederlande (Savukoski *et al.*, 1998), Portugal (Bessa *et al.*, 2006) und Italien (Cannelli *et al.*, 2007) und in Südamerika (Kolumbien (Pineda-Trujillo *et al.*, 2005)), sondern auch in Asien vorkommt. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Patienten asiatischer Herkunft mit unklarer NCL das *CLN5*-Gen auf Mutationen untersucht.

In zwei Patienten einer afghanischen Familie (Familie 3) wurde in Exon 4 des *CLN5*-Gens eine homozygote Mutation des Nukleotids 1137 (c.1137G>T) gefunden (Abb. 22). Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Tryptophan an der Position 379 des *CLN5*-Proteins zu Cystein (p.Trp379Cys). Die Mutation wurde noch nie beschrieben und ist somit die zweite *CLN5*-Mutation bei asiatischen Patienten.

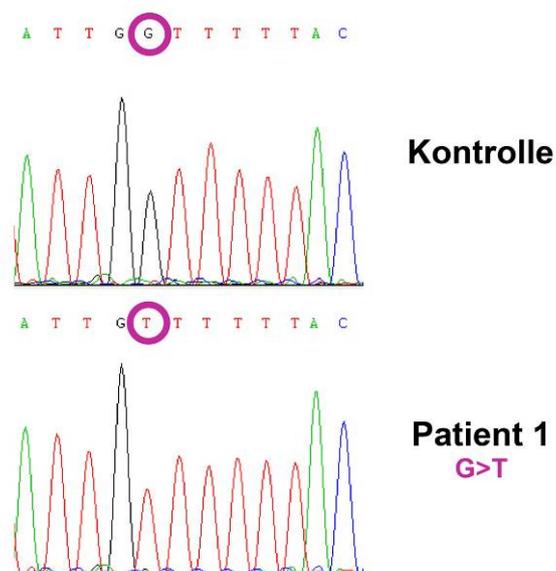


Abb. 22 Sequenzabschnitt des *CLN5*-Exon 4 mit der c.1137G>T-Mutation.

Die Sequenzierung des *CLN5*-Gens zeigte eine homozygote Punktmutation des Nukleotids 1137 in Exon 4 (G>T) bei zwei kranken Patienten (Patient 1 abgebildet) im Vergleich zu der normalen Kontrollsequenz (Kontrolle aus gesunder Fibroblasten-DNA abgebildet – GenBank NM_006493.2).

3. Ergebnisse

3.2.3.3 Expressionsstudie mutanter CLN5-Proteine

Um die Folgen der p.Leu358AlafsX4 und der p.Trp379Cys Mutationen auf das CLN5-Protein zu untersuchen, wurden die Mutationen in die cDNA des *CLN5*-Gens eingeführt, die am 3'-Ende Sequenzen für einen myc- und einen His-Tag enthielt. BHK- und COS7-Zellen wurden anschließend mit Wildtyp- und mutanten cDNA-Konstrukten transient transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Zellextrakte wurden in Ab- oder Anwesenheit von *N*-Glykosidase PNGaseF inkubiert, um alle *N*-gebundene Oligosaccharide zu entfernen. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE konnte mittels Western-Blot erstens der Anteil *N*-gebundener Oligosaccharide zur molaren Masse des CLN5-Proteins bestimmt werden, und zweitens die Masse des deglykosyliertes CLN5-Proteins mit der kalkulierten Molekularmasse verglichen werden (Abb. 23). Es wurden keine CLN5-Proteine mit dem myc-Antikörper nachgewiesen, was möglicherweise bedeutet, dass CLN5 post-translational am C-Terminus proteolytisch modifiziert wird.

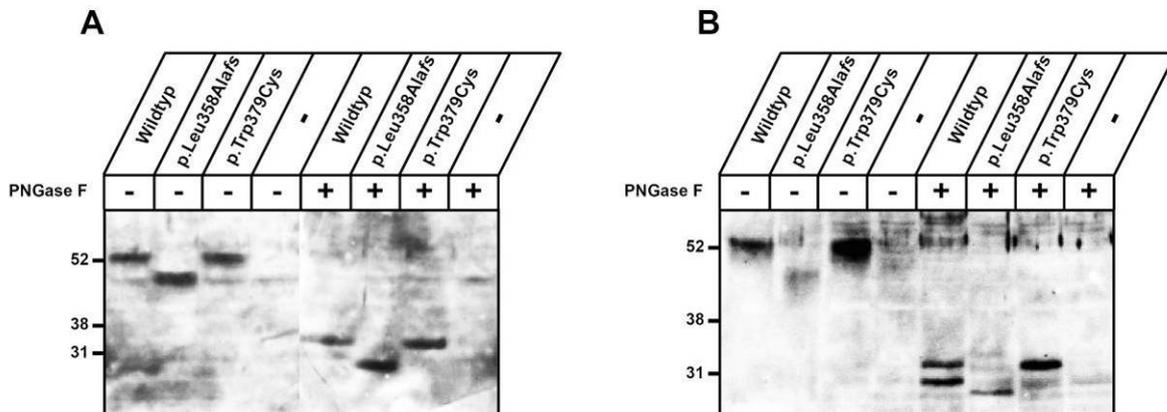


Abb. 23 Expressionsanalyse der CLN5-Mutanten in COS7- (A) und BHK-Zellen (B).

Extrakte von überexprimierenden Zellen wurden mit (+) oder ohne (-) PNGaseF inkubiert. Die Homogenate in reduzierendem Solubilisierungspuffer wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels CLN5-Antikörper Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte (-) Zellen.

Die Western-Blot-Analyse mit CLN5-spezifischem Antikörper zeigt ein 52 kDa-Polypeptid in überexprimierenden BHK- und COS7-Zellen, das nicht in nicht transfizierten Zellen nachweisbar war. Nach der PNGaseF-Behandlung ist die Molekularmasse vom Wildtyp-CLN5 auf 34 kDa reduziert (Abb. 23 A und B). In den mit der CLN5-Mutante p.Leu358AlafsX4 überexprimierenden Zellen wird ein verkürztes Polypeptid von 45 kDa beobachtet, das auf 29 kDa nach Deglykosylierung mit PNGaseF reduziert ist. In den p.Trp379Cys überexprimierenden Zellen ist ein

3. Ergebnisse

52 kDa-Polypeptid zu sehen, das nach PNGaseF-Behandlung auf 34 kDa reduziert ist.

Die Zellextrakte aus COS7-Zellen wurden zusätzlich in der Ab- oder Anwesenheit der Endoglykosidase H inkubiert, die mannosereiche Glykane vom Glykoprotein abspaltet. Die nachfolgende Western-Blot-Analyse (Abb. 24) zeigt Polypeptide mit ähnlicher Molekularmasse wie nach PNGaseF-Behandlung. Es sind also nur „*high-mannose-type*“ Oligosaccharide an Wildtyp- und mutantern CLN5 N-glykosidisch gebunden.

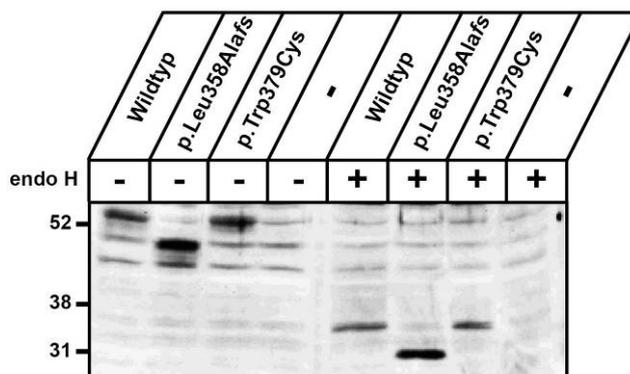


Abb. 24 Endoglykosidase H-Sensitivität von Wildtyp und mutanten CLN5-Proteinen.

Extrakte von überexprimierenden COS7-Zellen wurden mit (+) oder ohne (-) EndoH für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden in reduzierendem Solubilisierungspuffer durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels CLN5 Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienen nicht transfizierte (-) Zellen.

3.2.3.4 Intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp- und mutanten CLN5-Proteine

Um zu untersuchen, ob die beiden Mutationen die Lokalisation und den Transport des CLN5-Proteins beeinflussen, wurden COS7-Zellen mit Wildtyp- bzw. den mutanten CLN5-cDNAs transfiziert, mit Cycloheximid (100 µg/ml) für 1 h behandelt, um eine überexpressionsbedingte Akkumulation der CLN5-Proteine im ER zu verhindern, und mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 25).

Das Wildtyp-CLN5-Protein wies eine komplette Kolokalisation mit dem spät-endosomalen / lysosomalen Marker LAMP1 auf, während es mit den Marker für das ER (PDI), für den *cis*-Golgi (GM130) und die frühen Endosomen (EEA1) nicht kolokalisiert war. P.Leu358AlafsX4- bzw. der p.Trp379Cys-CLN5 überexprimierende Zellen zeigten jedoch eine Kolokalisation mit dem ER-Markerprotein PDI, nicht aber mit Marker für Lysosomen, *cis*-Golgi und frühen Endosomen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Retention der mutierten Proteine im endoplasmatischen Retikulum hin.

3. Ergebnisse

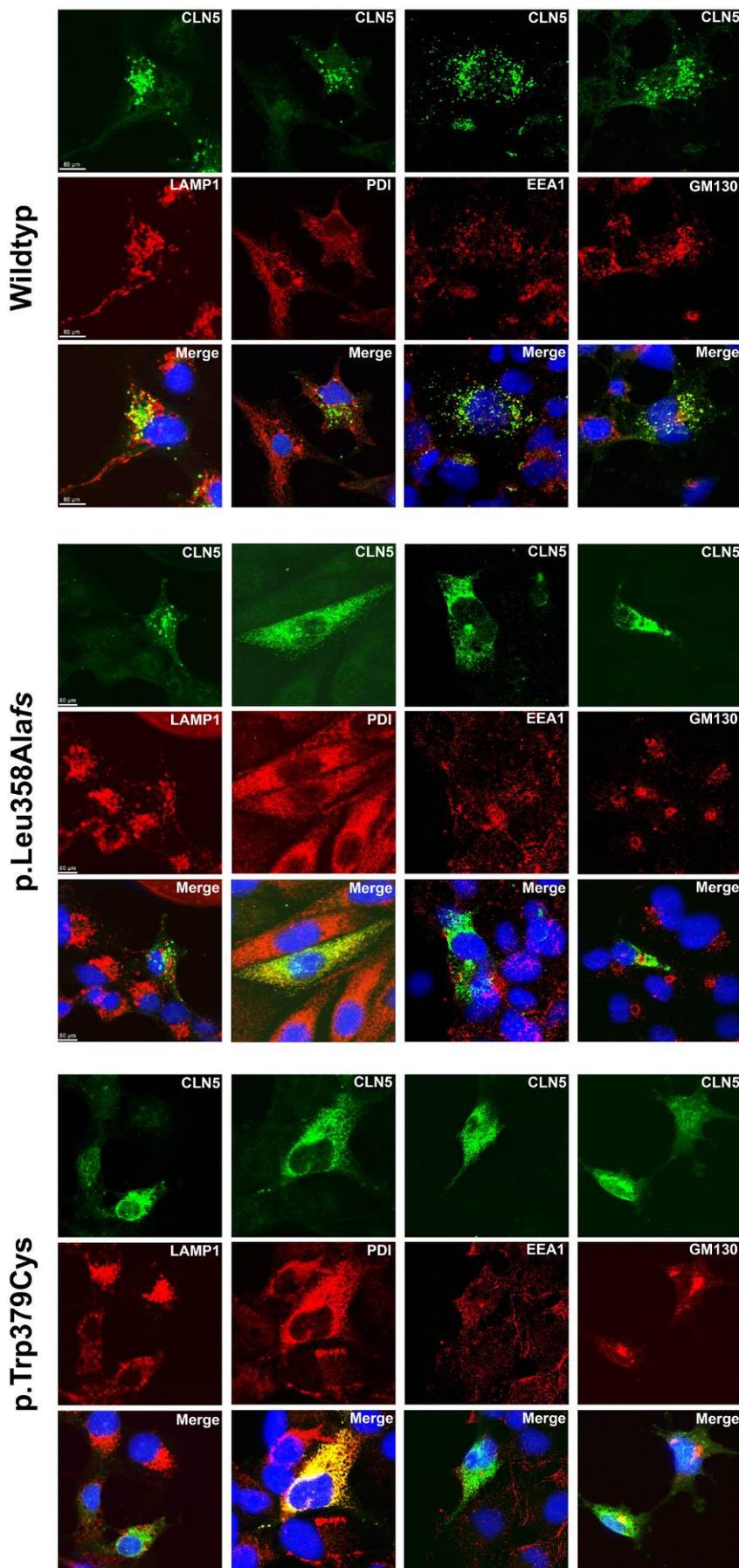


Abb. 25 Lokalisation des mutanten p.Leu358AlafsX4- bzw. p.Trp379Cys-CLN5 in transfizierten COS7-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit Cycloheximid (100 µg/ml) für 1 h behandelt, fixiert und mit Antikörpern gegen CLN5 (grün), LAMP1 (rot, links), PDI (rot, 2. von links), EEA1 (rot, 2. von rechts) und GM130 (rot, rechts) angefärbt. Eine Kolokalisation der Proteine ist in gelb dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI in blau angefärbt.

3.3 Identifikation von „*modifier genes*“ der juvenilen NCL

Die häufigste Mutation bei jNCL ist eine 1,02 kb Deletion des *CLN3*-Gens, die mit einer Häufigkeit von 85 % bei den Patienten vorkommt. Diese Deletion führt zum Verlust der Exone 7 und 8, einer Rasterverschiebung, einem vorzeitigem Stopp-Codon und schließlich zu einem verkürzten Protein (Kitzmüller *et al.*, 2008).

Der Krankheitsverlauf bei *CLN3*-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion variiert sehr stark. Bei einigen Patienten erfolgt das Fortschreiten der Krankheit sehr schnell, bei anderen hingegen langsam. Die Klassifikation der im folgenden untersuchten acht *CLN3*-Patienten basierte auf dem Scoring-System nach Kohlschütter *et al.* (1988). *CLN3*-Patienten 1 bis 4 weisen einen „klassischen“-Krankheitsverlauf auf. *CLN3*-Patienten 5 und 6 weisen hingegen einen „schnellen“-Krankheitsverlauf auf (Abb. 26, rosa). *CLN3*-Patienten 7 und 8 weisen schließlich einen „langsamen“-Krankheitsverlauf auf (Abb. 26, blau).

3. Ergebnisse

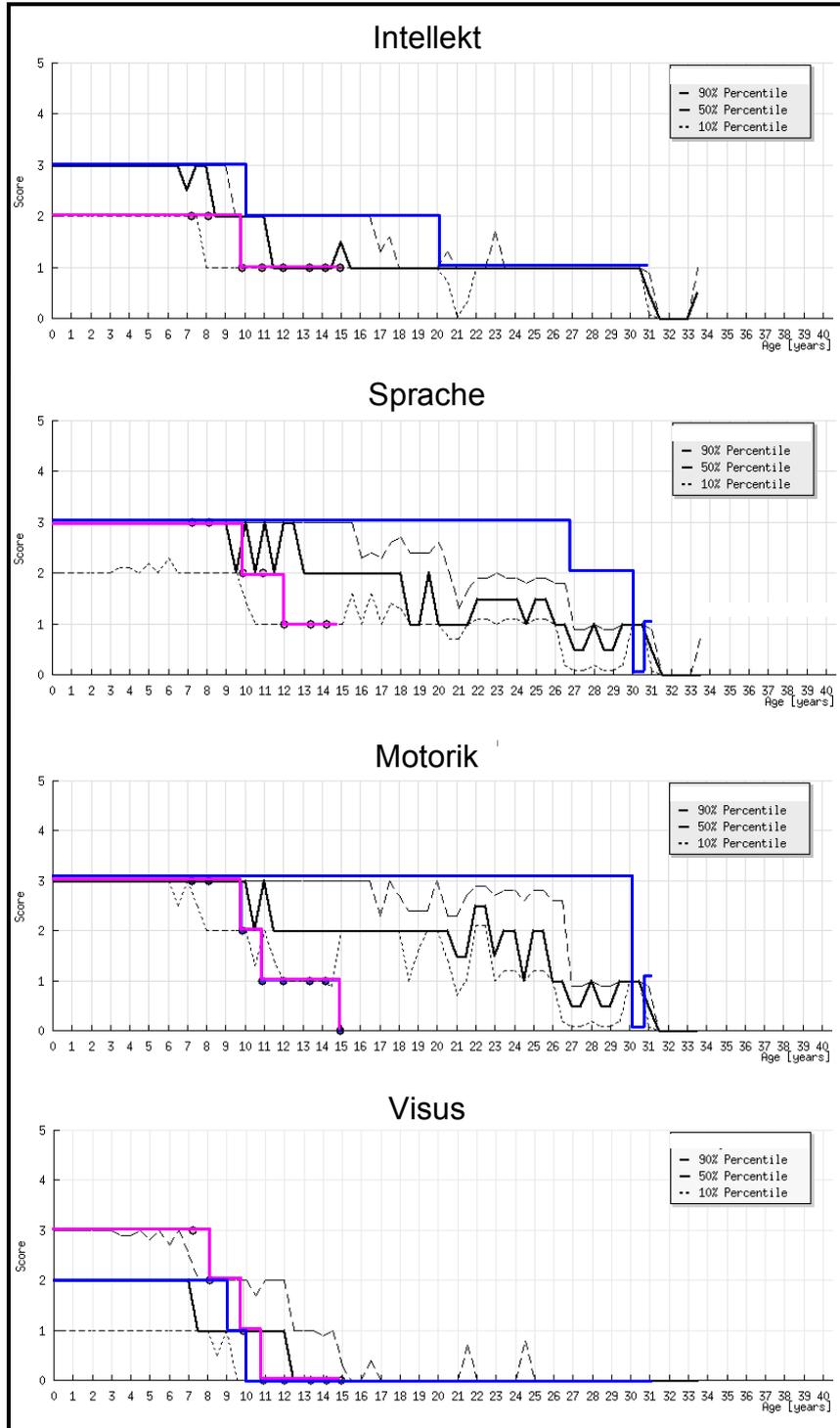


Abb. 26 Altersabhängige Verläufe bei zwei CLN3-Patienten basierend auf dem Hamburger-Scoring-System.

Patient 5 (rosa) zeigt einen „schnellen“ Krankheitsverlauf im Vergleich zum „klassischen“-Krankheitsverlauf (Median, schwarz). Patient 8 (blau) zeigt hingegen einen „langsamen“ Krankheitsverlauf im Vergleich zum „klassischen“ Krankheitsverlauf. Die schwarze punktierte Linie weist auf die 10 % Perzentile des Verlaufs aller Patienten im deutschen NCL-Register, die homozygot für die 1,02 kb-Deletion sind (n=55), hin. Die schwarze gestrichelte Linie weist auf 90 % Perzentile des Verlaufs aller Patienten mit Homozygotie für die 1,02 kb-Deletion hin. Die Scoring-Punkte sind für die verschiedenen Problemkategorien Intellekt, Sprache, Motorik und Visus berechnet, in dem 3 „sehr gut“ und 0 „sehr schlecht“ bedeutet. Je schneller die Scoring-Punkte über das Alter abnehmen, desto schneller verläuft die Krankheit.

3. Ergebnisse

Um zu verstehen, welche anderen Gene eventuell den Verlauf der Erkrankung beeinflussen können, wurde eine Expressionsanalyse mittels DNA-Microarray-Analysen durchgeführt. Dafür wurden Lymphozyten-RNAs von den CLN3-Patienten mit schnellem, langsamem und klassischem Verlauf bzw. von alters- und geschlechtsentsprechenden gesunden Kontrollen (siehe Material-Teil, Seite 23) isoliert und auf dem *GeneChip® Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0* hybridisiert.

Insgesamt wurden 15 Gene-Array-Analysen durchgeführt. Dabei wurde jeweils die Expression von fast 50 000 RNA-Transkripten und Varianten mit 22 verschiedenen Sonden pro Transkript analysiert. Um die Ergebnisse der 15 Proben vergleichen zu können wurden sie anhand der Expression der *housekeeping-genes* GAPDH und β -Actin kalibriert. Es wurden anschließend drei Vergleichsgruppen („klassischer“-Krankheitsverlauf gegen Kontrollen, „schneller“-Krankheitsverlauf gegen Kontrollen und „langsamer“-Krankheitsverlauf“) mit jeweils vier Vergleichen gebildet (Tab. 4). In der folgenden Analyse wurde zunächst die Expression der Gene analysiert, die in mindestens drei der vier Vergleichsgruppen minimal 1,7-fach dysreguliert waren.

Tab. 4 Gebildete Vergleichsgruppen

Klassisch vs. Kontrolle	Schnell vs. Kontrolle	Langsam vs. Kontrolle
CLN3-Patient 1 → Kontrolle-1	CLN3-Patient 5 → Kontrolle-3	CLN3-Patient 7 → Kontrolle-6
CLN3-Patient 2 → Kontrolle-2	CLN3-Patient 5 → Kontrolle-5	CLN3-Patient 7 → Kontrolle-7
CLN3-Patient 3 → Kontrolle-3	CLN3-Patient 6 → Kontrolle-3	CLN3-Patient 8 → Kontrolle-6
CLN3-Patient 4 → Kontrolle-4	CLN3-Patient 6 → Kontrolle-5	CLN3-Patient 8 → Kontrolle-7

3. Ergebnisse

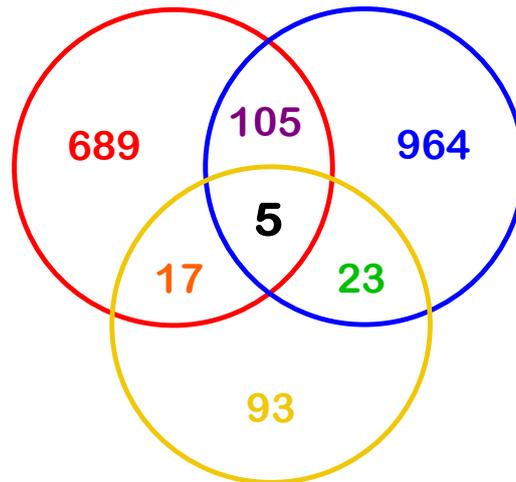


Abb. 27 Verteilung der dysregulierten Gene bei CLN3-Patienten mit der 1,02 kb Deletion

Es wurde in rot der Vergleich zwischen Patienten mit schnellem Verlauf und gesunden Kontrollen, in blau der Vergleich zwischen Patienten mit langsamem Verlauf und gesunden Kontrollen und in gelb der Vergleich zwischen Patienten mit klassischem Verlauf und gesunden Kontrollen aufgeführt. Die Zahlen repräsentieren die in ihrer Expression mehr als 1,7-fach dysregulierten Gene. Die überlappenden Bereiche zeigen die Zahl der Gene an, die bei 2 bzw. 3 der Vergleiche identisch sind.

Die mRNA-Expression von 964 Genen in Lymphozyten bei den Patienten mit langsamem Verlauf ist mindestens 1,7-fach verändert. Davon sind 55 Gene mindestens 4-fach herunterreguliert und 20 Gene mindestens 4-fach hochreguliert im Vergleich zum mRNA-Spiegel in gesunden Kontroll-Lymphozyten. Die mRNA-Expression von 689 Genen ist bei den Patienten mit schnellem Verlauf verändert, davon sind 14 Gene mindestens 4-fach herunterreguliert und 8 Gene mindestens 4-fach hochreguliert im Vergleich zum Expressionsmuster bei gesunden Kontrollen. Eine Auflistung der jeweiligen 20 am stärksten dysregulierten Gene aus der jeweiligen CLN3-Vergleichsgruppe ist im Anhang 6.3 (Seiten 105-107) zu finden.

Die mRNA-Expression von 5 Genen ist bei allen CLN3-Patienten verändert (Tab. 5), was auf allgemeine Marker-Gene für CLN3 hinweisen könnte. Von 105 Genen, deren Expression bei Patienten mit schnellem und mit langsamem Verlauf dysreguliert ist, sind 13 Gene bei Patienten mit schnellem Verlauf hochreguliert, die bei Patienten mit langsamem Verlauf herunterreguliert sind (Tab. 6). Es wurden keine Gene gefunden, die bei Patienten mit schnellem Verlauf herunterreguliert und bei Patienten mit langsamem Verlauf hochreguliert waren.

3. Ergebnisse

Tab. 5 Dysregulierte Gene bei allen CLN3-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Gensymbol	Genname	Dysregulation der mRNA-Expression *		
		Schnell	Klassisch	Langsam
<i>LOC441259</i>	DNA directed RNA polymerase	- 2,22	-1,74	- 2,55
<i>CDC42SE2</i>	CDC42 small effector 2	- 3,18	- 1,83	- 2,46
<i>RGS1</i>	Regulator of G protein signaling 1	+ 1,87	+ 2,46	+ 1,83
<i>DUSP2</i>	Dual specificity phosphatase 2	+ 2,3	+ 2,42	+ 2,42
<i>PARP15</i>	Poly(ADP-ribose) polymerase family member 15	+ 1,46	+ 1,74	+ 1,77

Die Gene, die für weitere Analysen ausgesucht worden sind, sind in orange hervorgehoben.
* Höhe der Dysregulation (fach der mRNA-Menge bei gesunden Kontrollpersonen)

Tab. 6 Gene, die hochreguliert sind, bei CLN3-Patienten mit schnellem Verlauf, und die herunterreguliert sind, bei CLN3-Patienten mit langsamem Verlauf.

Gensymbol	Genname	Dysregulation der mRNA-Expression *	
		Schnell	Langsam
<i>KLF6</i>	Kruppel-like factor 6	+ 2	- 1,87
<i>MARCKS</i>	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	+ 1,97	- 1,74
<i>LOC283663</i>	hypothetical protein LOC283663	+ 1,87	- 1,74
<i>BLK</i>	B lymphoid tyrosine kinase	+ 1,87	- 2,3
<i>FCGR2B</i> /// <i>FCGR2C</i>	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32) /// Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32)	+ 1,87	- 2,14
<i>SPIB</i>	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	+ 1,83	- 6,17
<i>MS4A1</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	+ 1,8	- 2
<i>RAPGEF1</i>	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	+ 1,77	- 1,9
<i>ZNF718</i>	Zinc finger protein 718	+ 2,11	- 26,91
<i>BACE2</i>	beta-site APP-cleaving enzyme 2	+ 2,11	- 2,78
<i>LOC283663</i>	hypothetical protein LOC283663	+ 2	- 1,87
<i>GPR109B</i>	G protein-coupled receptor 109B	+ 1,87	- 3,93
<i>CLLU1</i>	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	+ 1,74	- 4,36

Die Gene, die für weitere Analysen ausgesucht worden sind, sind in orange hervorgehoben.
* Höhe der Dysregulation (fach der mRNA-Menge bei gesunden Kontrollperson)

3. Ergebnisse

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, musste untersucht werden, ob die in den Microarray-Analysen festgestellten erhöhten mRNA-Spiegel dieser Gene in den Lymphozyten sich unter Real-Time PCR verifizieren lassen. Dazu wurden Gene der Listen ausgesucht, die aufgrund ihrer Funktion für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf möglicherweise relevant sein könnten.

Wegen der geringen Menge an RNA-Proben aus Patienten-Lymphozyten und wegen der geringen Anzahl an CLN3-Patienten mit langsamem oder schnellem Krankheitsverlauf konnte die Verifizierung durch Real-Time PCR nicht an Patienten-Proben erfolgen. Alternativ wurde mRNA aus HeLa-Zellen isoliert und verwendet, bei denen CLN3 auf Protein- und mRNA-Ebene stark gesenkt wurde, und als ein Modell für akute Veränderung nach CLN3-Verlust angenommen werden kann (Pohl *et al.*, 2007).

HeLa-Zellen wurden einmal für 24 h und einmal für 48 h mit siRNA-2 gegen die humane CLN3 mRNA oder mit sogenannter scrambled siRNA transfiziert. Die RNA wurde anschließend isoliert, die cDNA durch Reverse-Transkription synthetisiert gefolgt von einer Real-Time PCR mit TaqMan[®]-Primern und -Sonden.

Bei der relativen Quantifizierung handelt es sich um die Bestimmung des Verhältnisses der Menge an RNA/cDNA in den „scrambled“-Proben zu der Menge RNA/cDNA in den „CLN3-*knock-down*“-Proben.

Bei der so genannten $\Delta\Delta_{Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) wird neben der eigentlichen Zielsequenz auch ein Referenzgen amplifiziert. Diese endogenen Kontrollen sollten ubiquitär vorkommen und in einer weitgehend konstanten Menge in den verwendeten Zellen exprimiert werden, da sie den Gesamtgehalt an RNA und dessen Qualität in unterschiedlichen Proben normalisieren sollen. Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit β -Actin verwendet.

Zunächst wurden von den Genen, die bei allen CLN3-Patienten dysreguliert sind, DUSP2 und CDC42SE2 auf Grund ihrer starken Dysregulation ausgesucht und ihre relative mRNA-Expression gemessen.

3. Ergebnisse

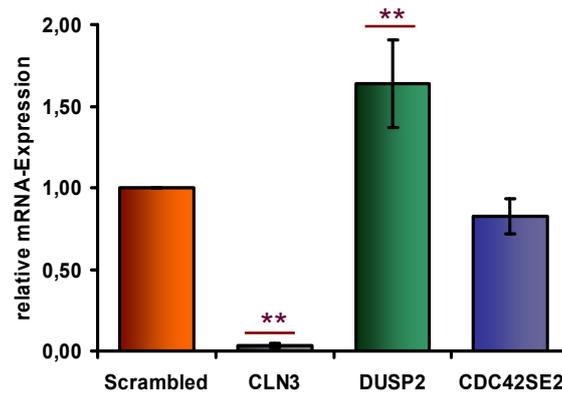


Abb. 28 Relative mRNA-Expression von CLN3, DUSP2 und CDC42SE2 in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden einmal für 24 h und einmal für 48 h mit CLN3 siRNA bzw. scrambled siRNA behandelt. Die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) wurden aus drei unabhängig präparierten Extrakten aus CLN3-siRNA behandelten Zellen und deren fluorometrische Dreifachbestimmung berechnet.

*= p<0,05

In den CLN3-*knock-down*-Zellen ist die DUSP2 mRNA-Expression signifikant 1,4- bis 1,9-fach im Vergleich zu scrambled siRNA-behandelten Zellen erhöht. Die CDC42SE2 mRNA-Expression ist hingegen um 10-30 % im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt. Die CLN3 mRNA-Expression ist auf 5 % von Kontrollzellen herunter reguliert und belegt den Erfolg der siRNA-Behandlung. Die Daten zeigen, dass DUSP2 und CDC42SE2 in CLN3-*knock-down*-Zellen in gleicher Weise dysreguliert sind wie in CLN3-Patienten.

Dann wurden von den Genen, deren mRNA Expression bei Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf hoch und niedrig bei Patienten mit langsamem Verlauf ist, RapGEF1, Spi-B, MARCKS und BACE2 ausgesucht und ihre relative mRNA-Expression gemessen.

3. Ergebnisse

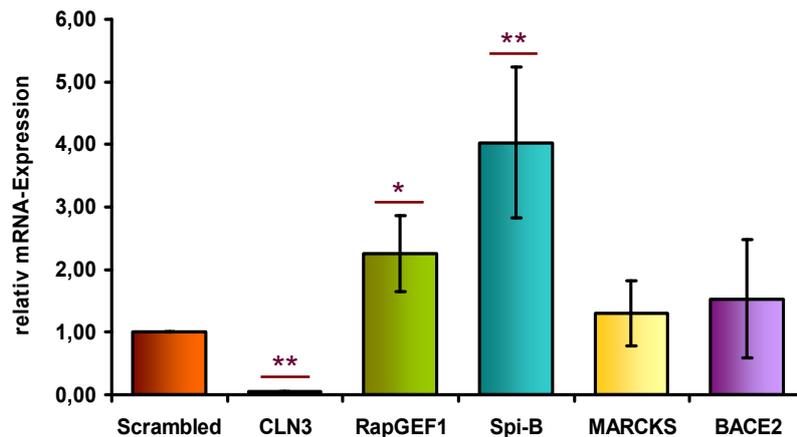


Abb. 29 Relative mRNA-Expression von CLN3, RapGEF1, Spi-B, MARCKS und BACE2 in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden einmal für 24 h und einmal für 48 h mit CLN3 siRNA bzw. scrambled siRNA behandelt. Die Mittelwerte (+/- Standardabweichung) sind aus drei unabhängig präparierten Extrakten aus CLN3-siRNA behandelten Zellen und deren fluorometrischer Dreifachbestimmung berechnet.

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$

In den CLN3-*knock-down*-Zellen sind die RapGEF1 mRNA-Expression 1,6- bis 2,9-fach und die Spi-B mRNA-Expression 2,8- bis 5,2-fach im Vergleich zu Kontrollzellen (*scrambled*) signifikant erhöht. Die MARCKS mRNA-Expression variiert zwischen 0,8- bis 1,8-fach im Vergleich zu Kontrolle. In der hier untersuchten Zahl von siRNA behandelten HeLa-Zellen variiert die BACE2 mRNA-Expression zwischen dem 0,6- bis 2,5-fachen der Kontrollen. Die CLN3 mRNA-Expression ist auf 9 % erniedrigt und spiegelt den Erfolg der siRNA-Behandlung wider.

Anhand der Gene-Array Daten wurde auch die Expression von bekannten NCL-Genen bzw. Genen, die Proteine des Lysosoms und der Lysosom-Biogenese kodieren, näher analysiert (Tab. 7). Bei dieser Analyse wurden die Ausschlusskriterien auf eine minimale 1,1-fach Dysregulation bei mindestens zwei der vier Vergleichsgruppen geändert. Das CLN8-Protein wird mehr als 5,4-fach bei den Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf herunterreguliert, obwohl es bei den Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf leicht (+ 1,2-fach) hochreguliert ist. LAMP1 wird bei Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf leicht (- 1,7-fach) und bei Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf stark (- 3,1-fach) herunterreguliert.

3. Ergebnisse

Tab. 7 Expression von ausgewählten Genen, die für Proteine des Lysosoms kodieren bzw. für Proteine, die für die Biogenese der Lysosome von Bedeutung sind, kodieren.

Gensymbol	Dysregulation der mRNA-Expression *		
	Schnell	Klassisch	Langsam
<i>CLN1/PPT1</i>	+ 1,4	n.d.**	n.d.
<i>CLN2/TPP1</i>	n.d.	+ 1,2	+ 1,8
<i>CLN3</i>	- 1,3	- 1,3	n.d.
<i>CLN5</i>	n.d.	- 1,4	- 2,1
<i>CLN6</i>	- 1,6	n.d.	- 1,9
<i>CLN7/MFSD8</i>	n.d.	n.d.	+ 1,5
<i>CLN8</i>	+ 1,2	n.d.	- 5,4
<i>CLN10/CTSD</i>	+ 1,7	n.d.	- 1,6
<i>CTSB</i>	- 1,1 / + 1,4	- 1,5	- 1,6 / + 1,3
<i>CTSL1</i>	- 1,3	n.d.	- 1,4
<i>CTSF</i>	n.d.	n.d.	+ 1,1
<i>CTSA</i>	- 1,1	+ 1,2	n.d.
<i>CTSC</i>	n.d.	- 1,1	- 1,7 / + 1,1
<i>CTSH</i>	+ 1,7	n.d.	+ 1,1
<i>CTSK</i>	+ 1,7	n.d.	+ 1,9
<i>CTSO</i>	n.d.	- 1,1	- 1,7
<i>CTSS</i>	- 1,1 / + 1,2	n.d.	- 2,2
<i>CTSW</i>	+ 3,5	+ 1,7	n.d.
<i>CSTZ</i>	- 1,2	n.d.	- 1,6
<i>CLCN7</i>	+ 1,4	+ 1,3	+ 1,4
<i>CLCN3</i>	- 1,4	+ 1,1	+ 1,5
<i>OSTM1</i>	- 1,3	- 1,2	- 1,3
<i>PPP1R9A</i>	+ 1,5	n.d.	n.d.
<i>ACP2/LAP</i>	n.d.	- 1,4	n.d.
<i>ACP5/TRAP</i>	+ 1,5	n.d.	+ 1,4
<i>LAMP1</i>	- 1,7	n.d.	- 3,1
<i>LAMP2</i>	+ 1,3	- 1,6	- 1,5
<i>HOOK1</i>	n.d.	+ 1,3	n.d.
<i>M6PR</i>	- 1,3	n.d.	- 1,2

Die Gene, die für weitere Analysen untersucht werden sollten, sind in orange hervorgehoben.

Die Gene, die die gleichen Ausschlusskriterien wie bei den anderen Analysen (mindestens 3 von 4 Vergleiche minimal 1,7-fach dysreguliert) nachweisen, sind mit rot umgerandet.

* Höhe der Dysregulation (fach der mRNA-Menge bei gesunden Kontrollpersonen)

** n.d. nicht dysreguliert

4 DISKUSSION

4.1 Neue Genmutationen führen zu NCL bzw. NCL-ähnlichen Krankheiten

Die neuronalen Ceroid Lipofuscinosen bilden die Gruppe der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen des Kindes- und Jugendalters. Bislang wurden neun Gene identifiziert, die zu NCL führen (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN7, CLN8, CLN10 und CLCN6). Bei mindestens 10 % der Patienten mit klinischem Verdacht auf NCL lassen sich keine Mutationen in den bekannten NCL-Genen nachweisen, was zeigt, dass es noch unbekannte, neue NCL-Gene und Mutationen geben muss.

Die Identifikation neuer NCL-Gene und NCL-Mutationen ist dadurch erschwert, dass eine starke genetische Heterogenität innerhalb der NCL-Untergruppen mit ähnlichem Phänotyp besteht (Siintola *et al.*, 2006a). In diesem Projekt wurden daher gezielt konsanguine Familien mit unklarer NCL untersucht, da hier die Penetranz für ein rezessives krankheitsverursachendes Allel hoch ist (Bennett und Curnow, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden drei konsanguine Familien türkischer, pakistanischer und afghanischer Abstammung mit Patienten untersucht, bei denen der Verdacht auf eine juvenile bzw. spätinfantile NCL bestand. Die Identifizierung des jeweiligen krankheitsverursachenden Gens bei diesen drei Familien wird im Folgenden diskutiert.

4.1.1 Bekannte Gen- und Protein-Defekte sind ausgeschlossen

Anhand eines Diagnostik-Algorithmus werden bei klinischem Verdacht auf NCL je nach Alter bei Beginn der Erkrankung und den klinischen Symptomen verschiedene Formen der NCL-Erkrankungen in Erwägung gezogen (Kohlschütter und Schulz, 2009). Abb. 30 erläutert die diagnostische Strategie bei Verdacht auf NCL, die vom Alter des Kindes bei Krankheitsbeginn abhängt.

4. Diskussion

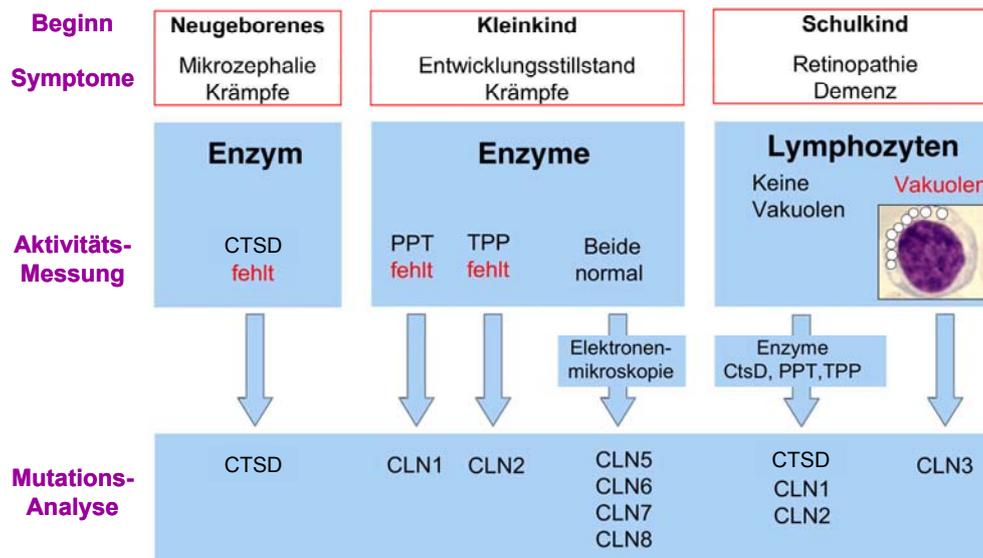


Abb. 30 Diagnostikschritte bei NCL-Verdacht (Kohlschütter und Schulz, 2009).

Wenn die **Anzeichen der Krankheit schon direkt nach der Geburt** wahrgenommen werden, sollte die Aktivität von Cathepsin D in Fibroblasten gemessen werden. Bei fehlender Enzymaktivität wird die Mutationsanalyse des *CTSD*-Gens angeschlossen. Liegt der **Beginn der Krankheit im Kleinkindalter** (1-3 Jahre) sollte die Aktivität der Palmitoylprotein-Thioesterase 1 (PPT1) und der Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) gemessen werden. Dies ist auch in einer Trockenblutprobe möglich (Lukacs *et al.*, 2003). Fehlende Aktivität des Enzyms PPT1 legt die Diagnose infantile NCL (CLN1) nahe. Die fehlende Aktivität von TPP1 weist auf eine spätinfantile NCL (CLN2) hin. Eine Mutationsanalyse der entsprechenden Gene wird angeschlossen. Wenn beide Enzymaktivitäten normal sind, so sollte eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Lymphozyten, Hautbiopsat oder anderen Geweben erfolgen. Falls typisches NCL-Speichermaterial gefunden wird, könnte es sich um eine seltenere NCL-Variante handeln. Je nach Klinik, Herkunft der Patienten und Ultrastruktur des Speichermaterials kommen Defekte im *CLN5*-, *CLN6*-, *CLN7*- oder *CLN8*-Gen in Frage. Diese können durch eine Mutationsanalyse genau diagnostiziert werden. Werden **erste Krankheitserscheinungen mit Beginn des Schulalters** beobachtet, wird zunächst in einem Blutausstrich nach Lymphozytenvakuolen gesucht. Ihr Nachweis sichert die Diagnose einer juvenilen NCL (CLN3), der sich die molekulargenetische Analyse des *CLN3*-Gens anschließen kann. Bei Fehlen einer Mutation im *CLN3*-Gen muss an eine atypische juvenile Form gedacht werden. Gewisse Mutationen der Gene *CLN1*,

4. Diskussion

CLN2 und *CTSD* können auch protrahiert verlaufende Krankheitsbilder mit Beginn im Jugendalter verursachen (Mitchison *et al.*, 1998; van Diggelen *et al.*, 2001; Sleat *et al.*, 2004; Steinfeld *et al.*, 2006). Diese NCL-Formen lassen sich durch Messung der entsprechenden Enzymaktivitäten (s.o.) diagnostizieren. Ferner ist an eine *CLN9*-Variante oder an die Nordische Epilepsie mit Defekt im *CLN8*-Gen zu denken. Auch hierbei ist die elektronenmikroskopische Suche nach charakteristischem Speichermaterial wegweisend.

Die Patienten der türkischen Familie (Familie 1) wiesen eine normale psychomotorische Entwicklung bis zum 5. Lebensjahr auf, bevor sie einen progredienten NCL-ähnlichen Phänotyp mit epileptischen Anfällen, Visusverlust und Ataxie entwickelten. Eine erweiterte Diagnostik führte zum Befund einer fortschreitenden Kleinhirnatrophie und Hirnatrophie in der Kernspintomographie, sowie den eines ausgelöschten Elektretinogramms. Die elektronenmikroskopische Untersuchung einer Hautbiopsie ergab keinen gesicherten Nachweis intralysosomalen Speichermaterials, da die hierfür notwendigen ekkrinen Schweißdrüsen im Präparat fehlten. Aufgrund der Krankheitssymptomatik bestand bei den Patienten dennoch klinisch der Verdacht auf eine spätinfantile NCL-ähnliche neurodegenerative Erkrankung.

Die Patienten der pakistanischen Familie (Familie 2) wiesen eine normale psychomotorische Entwicklung bis zum 5. Lebensjahr auf, bevor sie Ataxie, Probleme der Feinmotorik, Visusverlust und später Epilepsie entwickelten. Diagnostisch wurden zusätzlich eine progrediente cerebrale und cerebelläre Atrophie und ein ausgelöschtes Elektretinogramm festgestellt. Bei der Hautbiopsie wurden intralysosomale Einschlusskörper mit „*Fingerprint*“-Profilen diagnostiziert, die charakteristisch für die *CLN3*-Form der NCL sind (Goebel und Wisniewski, 2004). Aus diesen Gründen bestand bei diesen Patienten der Verdacht auf eine spätinfantile bis frühjuvenile NCL.

Die Patienten der afghanischen Familie (Familie 3) entwickelten ab dem 2. Lebensjahr NCL-ähnliche Symptome wie Ataxie und Abbau der Sprachfähigkeit und ab dem 4. Lebensjahr Epilepsie. Deshalb wurde bei den Patienten eine spätinfantile NCL vermutet.

4. Diskussion

Alle Patienten der Familien 1-3 wurden anhand des Diagnostik-Algorithmus (Abb. 30) untersucht. Da sie einen spätinfantilen / frühjuvenilen Krankheitsbeginn zeigten, wurden zunächst die Gene, die mit spätinfantiler bzw. juveniler NCL in vielen unterschiedlichen Ländern assoziiert sind (Mole *et al.*, 2005), untersucht (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN6*, *CLN8* und *CLN10*). Mutationen in *CLN1*, *CLN2* bzw. *CLN10* führen zur Reduzierung oder sogar zum Verlust der PPT1-, TPP1- bzw. CTSD-Aktivität (Vesa *et al.*, 1995; Wisniewski und Zhong, 2001; Steinfeld *et al.*, 2006). Die spezifische Aktivität dieser Enzyme, sowie die Aktivität des lysosomalen Kontrollenzym β -Hexosaminidase, waren jedoch bei den Patienten der Familien 1-3 vergleichbar mit denen der Kontrollen. Mutationen in den *CLN3*-, *CLN6*- und *CLN8*-Genen konnten ebenfalls durch Sequenzierungen ausgeschlossen werden (Tab. 3). Um den zugrunde liegenden Gendefekt bei den Familien 1-3 zu identifizieren, wurden genetische Kopplungsanalysen durchgeführt.

Bei genetischen Kopplungsanalysen wird die Vererbung der SNP-Marker und somit die Segregation von Allelen innerhalb der Mitglieder einer Familie analysiert. Die Gene, die dicht beieinander auf dem gleichen Chromosom liegen, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit gemeinsamer Vererbung (Mayeux, 2005). Bei einer rezessiv-vererbten Erkrankung wie NCL werden Homozygoten und Heterozygoten der verschiedenen gekoppelten Regionen innerhalb der Familie miteinander korreliert. Die resultierenden Chromosomregionen zeigen dann passende Genotypen zu den jeweiligen Phänotypen der Familienmitglieder. Diese Methode wurde schon erfolgreich bei der Identifikation neuer Gene wie *CLN7* und neuer Genmutationen bei unklarer NCL verwendet (Siintola *et al.*, 2007) und erwies sich daher als vielversprechend für die Identifikation der krankheitsverursachenden Gene in den drei Familien.

4. Diskussion

4.1.2 Mutation im *Neurabin-I*-Gen bei Patienten mit NCL-ähnlicher Krankheit

4.1.2.1 Identifizierung der ersten pathogenetischen Mutation im *Neurabin-I*-Gen

Die genetische Kopplungsanalyse bei Familie 1 zeigte vier gekoppelte Genregionen, verteilt auf die Chromosomen 1, 2 und 7, die passende Homozygotie und Heterozygotie nachwies (Abb. 13). Aufgrund einer parallel durchgeführten SNP-Analyse bei einer zweiten türkischen Familie mit unklarer NCL, konnte die Kopplung auf zwei kleinere Regionen der Chromosomen 1 und 7 reduziert werden. Dadurch konnte auch die ursprüngliche Zahl von 714 Genen auf 46 Kandidatengene reduziert werden. Aus diesen wurde eine Reihenfolge von Genen aufgestellt, die möglicherweise für Proteine kodieren, die sich in den Lysosomen befinden, oder die eine Rolle im Gehirn bzw. in Neuronen bei Apoptose, bei Proteinfaltung im ER, dem Proteintransport usw. spielen könnten. Diese Gene wurden nacheinander sequenziert (Anhang 6.2).

Eines der ausgewählten Kandidatengene war das *PPP1R9A*-Gen. Die Mutationsanalyse zeigte eine homozygote c.1102G>A-Transition bei den Patienten der Familie 1 (Abb. 14). Diese Mutation kam in 1,6 % der untersuchten Kontroll-Allele bei türkischen Familien in heterozygoter Form vor. Da es sich jedoch um einen Austausch der hochkonserviert sauren Asparaginsäure durch die neutrale Aminosäure Asparagin handelt, kann diese Mutation als pathogen angesehen werden und wurde im Folgenden weiter untersucht.

Das *PPP1R9A*-Gen befindet sich auf Chromosom 7q21.3 und kodiert für ein Protein, Neurabin-I, das an Actin in Neuronen bindet und die Protein-Phosphatase 1 (PP1) inhibiert (Nakanishi *et al.*, 1997; McAvoy *et al.*, 1999). Neurabin-I ist ein Zytoskelettprotein aus 1098 Aminosäuren, das viele konservierte Interaktionsdomänen besitzt (Abb. 32). Am N-Terminus des humanen Neurabin-I befindet sich eine F-Actin Bindungsdomäne (Nakanishi *et al.*, 1997) und zwischen den Aminosäuren 505 und 595 eine PSD-95, DlgA, ZO-1-like (PDZ)-Domäne, mit der Neurabin-I mit anderen Proteinen interagieren kann (Saras und Heldin, 1996). Am C-Terminus befinden sich vier coiled-coil Strukturen mit einem „steril- α Motiv“ (SAM),

4. Diskussion

die eine Homodimerisierung bzw. eine Heterodimerisierung mit dem Neurabin-II-Protein, einem anderen PP1-Inhibitor mit ähnlicher Sequenz, ermöglichen (Nakanishi *et al.*, 1997; Satoh *et al.*, 1998; MacMillan *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2002). Die Dimerisierung ermöglicht auch eine Interaktion mit dem *trans*-Golgi Netzwerk Membranprotein TGN38 (Stephens und Banting, 1999). Neurabin-I interagiert mit der katalytischen Untereinheit der PP1 durch das R_{KV}x_F-PP1-Bindemotiv an Position 456-460, wobei dieses Motiv allein für die Bindung an PP1 nicht ausreicht (McAvoy *et al.*, 1999). Die Bedeutung der Neurabinvermittelten Regulation der PP1-Aktivität ist für das Protein *Doublecortin* gezeigt worden. *Doublecortin* ist für die Entwicklung und Differenzierung von Neuronen wichtig. Es wird über PP1 vermittelte Dephosphorylierung aus einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt, und kann positiv von Neurabin-II reguliert werden (Bielas *et al.*, 2007; Abb. 31). Als weitere Substrate der Neurabin-regulierten PP1-Aktivität werden z.B. die AMPA und NMDA-Rezeptoren angesehen (Yan *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000).

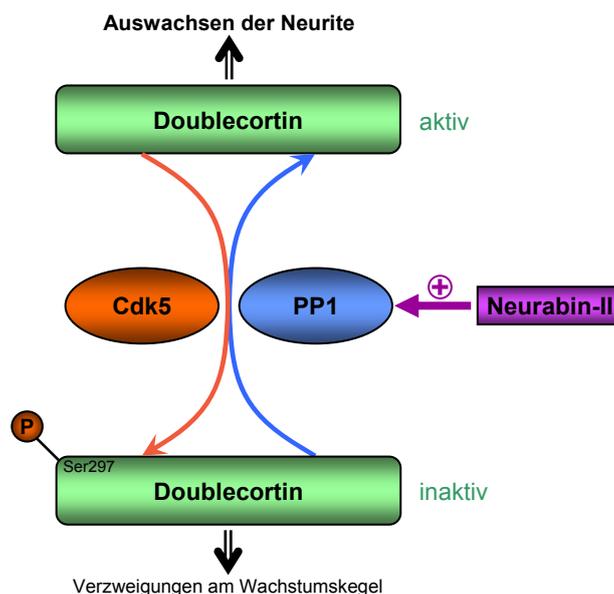


Abb. 31 Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Neurabin-II, PP1 und *Doublecortin*.

Neurabin-II aktiviert (+) die PP1, die dadurch *Doublecortin* dephosphorylieren und aktivieren kann. Durch Cdk5-vermittelte Phosphorylierung am Ser297 wird *Doublecortin* inaktiviert. Aktives *Doublecortin* verändert die Anordnung von Mikrotubuli und favorisiert das Auswachsen von Neuriten. Inaktives *Doublecortin* leitet eine erhöhte Verzweigung am Neuronen-Wachstumskegel ein (Bielas *et al.*, 2007).

Neurabin-I-*knock-out* Mäuse wurden bereits beschrieben und weisen auf eine Defizienz der Kontext-abhängiges Angstgedächtnis hin (Allen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). Dabei wurden jedoch ausschließlich die synaptische Transmission,

4. Diskussion

Plastizität und Verhaltensgedächtnis im Hippokampus von 6 bis 14 Wochen alten Mäusen untersucht (Wu *et al.*, 2008). Charakteristische Merkmale der NCLs wie Akkumulation von Speichermaterial, Degeneration der Retina und des Hirns sollten deshalb bei älteren Neurabin-I-defizienten Mäusen untersucht werden.

Die in der Arbeit gefundene p.Asp368Asn-Mutation befindet sich nicht in einer der Interaktionsdomänen, aber das Asp368 ist in allen Spezies hochkonserviert (Abb. 15).

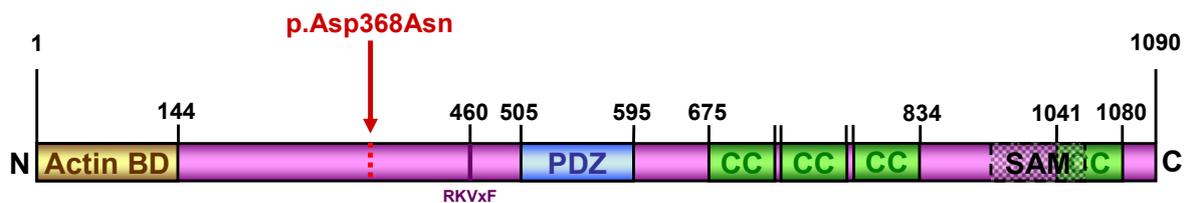


Abb. 32 Schematische Struktur des humanen Neurabin-I-Proteins.

Neurabin-I besitzt eine Actin-Bindungsdomäne (Actin-BD), ein Protein Phosphatase 1-Bindungsmotiv (RKVxF), eine PDZ-Domäne (PDZ) und vier coiled-coil Domänen (CC) mit einem SAM-Motiv (SAM). Die Position der hier identifizierte Mutation Asp368Asn ist eingezeichnet.

4.1.2.2 Expression der Neurabin-I-Mutante p.Asp368Asn

Humanes Neurabin-I hat eine errechnete Molekularmasse von 123 kDa, wurde jedoch noch nicht biochemisch charakterisiert. Frühere Expressionsstudien konzentrierten sich auf Neurabin-I der Ratte, deren Sequenz 90 % Ähnlichkeit zum humanen Neurabin-I aufweist, und ebenfalls eine Molekularmasse von ca. 120 kDa besitzt. Sowohl bei endogenem Ratten-Neurabin-I als auch in Ratten-Neurabin-I-überexprimierenden Zellen werden im Western-Blot immunreaktive Banden von 180 kDa und 140 kDa nachgewiesen, wobei die Expression des 140 kDa-Protein unterschiedlich stark war (Nakanishi *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998). Mit der hier verwendeten Antikörper konnten diese Banden in Proteinextrakten aus Maushirn ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 17). Bei Überexpression des humanen Wildtyp-Neurabin-I in BHK-Zellen ließ sich jedoch nur eine immunreaktive 40 kDa-Bande detektieren, obwohl der relative mRNA-Spiegel von Neurabin-I sehr hoch war (Abb. 16). Eine Lactacystin Behandlung der Neurabin-I-überexprimierenden BHK-Zellen ermöglichte dann den Nachweis der immunreaktiven Neurabin-I-180 kDa- und -120 kDa-Banden zusätzlich zur 40 kDa-Bande (Abb. 16). Lactacystin inhibiert spezifisch drei Peptidase-Aktivitäten (Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnliche

4. Diskussion

Aktivitäten) des Proteasomen und verhindert daher den proteolytischen Abbau von instabilen Protein (Fenteany und Schreiber, 1998). Die Daten lassen vermuten, dass überexprimiertes humanes Neurabin-I in BHK-Zellen instabil ist und durch Proteasomen abgebaut wird.

BHK-Zellen, die die p.Asp368Asn-Neurabin-I-Mutante überexprimieren, weisen nur die 120 kDa-Bande nach Lactacystin-Behandlung auf (Abb. 16). Die Abwesenheit der 40 kDa- und 180 kDa-Banden deuten auf gesteigerte Instabilität der p.Asp368Asn-Neurabin-I-Mutante gegenüber dem Wildtyp-Neurabin-I hin. Die Überexpression der Wildtyp- und mutanten Neurabin-I cDNA in N2a- und HeLa-Zellen führte auch nicht zu einem besseren Expressionsnachweis (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die Reaktivität des verwendeten Antikörpers (anti coiled-coil Neurabin-I) ungeeignet für Western-Blot-Analysen.

Überexprimiertes Neurabin-I-Protein in COS7-Zellen ist mit F-Actin im Zytoplasma kolokalisiert. Wird jedoch ein mutantes Neurabin-I-Protein ohne Actin-Bindedomäne überexprimiert, wird es vor allem an der Zellperipherie gefunden, wo Actin in den sogenannten „Fokale Adhäsion“-Bereichen konzentriert ist (Nakanishi *et al.*, 1997). In Kurzzeitkultivierten Neuronen des Hippocampus der Ratte (24 h-Kultur) ist endogenes Neurabin-I hauptsächlich in den Lamellipodien des Wachstumskegels nachweisbar. Nach 10 Tagen Kultur befindet es sich in den Synapsen (Nakanishi *et al.*, 1997).

Während endogenes Neurabin-I in kultivierten neuronalen Mauszellen erwartungsgemäß im Zytoplasma mit dem Actin-Zytoskelett kolokalisiert (Abb. 18; Nakanishi *et al.*, 1997), konnte das überexprimierte humane Wildtyp-Neurabin-I erst nach Lactacystin-vermittelter Hemmung des Abbaus im Zytoplasma von BHK-Zellen detektiert werden. Außerdem überlagerte die Färbung des Wildtyp-Neurabin-I partiell mit ER-Markern (PDI), die bei der p.Asp368Asn-Neurabin-I-Mutante noch stärker ausgeprägt war (Abb. 19). Ob und an welches ER-Protein Neurabin-I binden kann und ob, wie bei TGN38 (Stephens und Banting, 1999), die coiled-coil Domäne involviert ist, muss weiter untersucht werden.

4. Diskussion

Da überexprimiertes murines Neurabin-I in verschiedenen Zelltypen stabiler zu sein scheint (Nakanishi *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998), sollte außerdem der Asp368 homologe Rest Asp369 in der murinen Neurabin-I-cDNA gegen Asn ausgetauscht, überexprimiert und funktionell analysiert werden.

4.1.2.3 Neurabin-I und seine potentielle Rolle bei Neurodegeneration

Neurabin-I spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität, die wichtig für Lernen und Gedächtnis ist. Die C-terminalen Enden der AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure) und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren können an die PDZ-Domäne von Neurabin-I binden und damit eine PP1-regulierte Aktivierung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren kontrollieren (Kelker *et al.*, 2007; Abb. 33). PP1 wird wiederum von Neurabin-I inhibiert, wenn die Actin-Bindedomäne von Neurabin-I phosphoryliert ist und an Actin bindet (Kelker *et al.*, 2007).

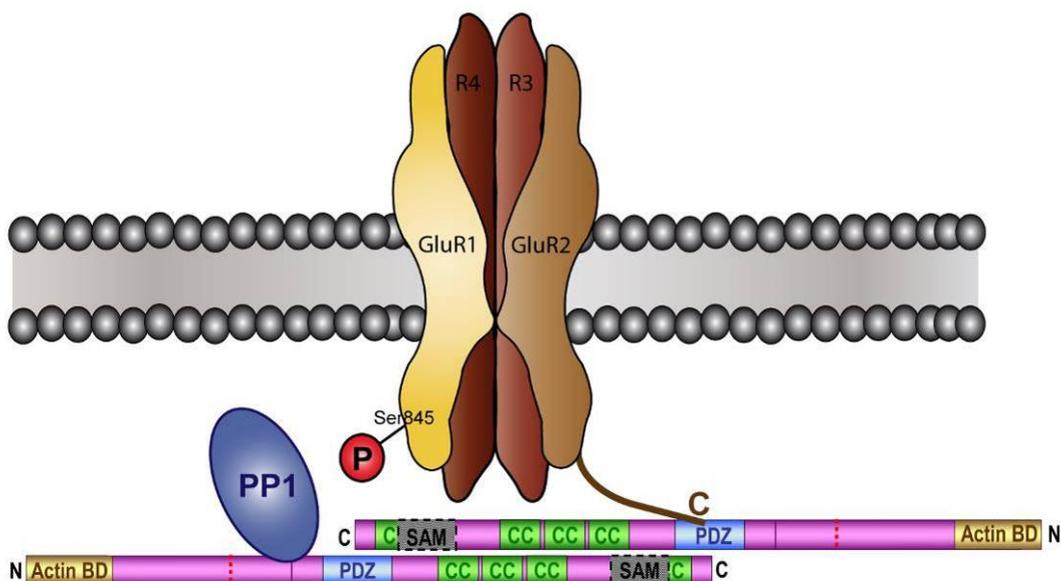


Abb. 33 Schematische Darstellung der Interaktion und Regulation des Phosphorylierungszustandes des AMPA-Rezeptors mit PP1 und Neurabin-I nach Kelker *et al.* (2007).

Die C-terminalen Enden von GluR1 und GluR3 des AMPA-Rezeptors können an die PDZ-Domäne von Neurabin-I binden. Neurabin-I in dimerer Form kann PP1 in der Nähe des phosphorylierten Ser845 von GluR1 bringen.

4. Diskussion

Vorläufige Untersuchungen einer Zusammenarbeit mit einer belgischen Forschergruppe haben gezeigt, dass die p.Asp368Asn-Neurabin-I-Mutante nicht in der Lage ist, die PP1-Aktivität zu inaktivieren, während das Extrakt aus Wildtyp-Neurabin-I-überexprimierenden Zellen die PP1-Aktivität inhibiert (Prof. Mathieu Bollen, persönliche Mitteilung). Ob die p.Asp368Asn-Neurabin-I-Mutante auch vermittelte Regulationsprozesse an AMPA- und NMDA-Rezeptoren kontrollieren kann, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Außerdem sollten in weiteren Familien, vor allem türkischen Familien, mit unklarer NCL-ähnlicher Erkrankung das *Neurabin-I*-Gen sequenziert werden, um mögliche weitere Mutationen zu identifizieren und *Neurabin-I* als neues NCL-verursachendes Gen zu verifizieren.

4.1.3 Atypische CLN5-Formen in asiatischen NCL-Patienten

4.1.3.1 Zwei neue CLN5-Mutationen bei asiatischen Patienten

Die genetische Kopplungsanalyse bei Familie 2 mit unbekannter NCL-Form zeigte sieben gekoppelte Genregionen, die passende Homozygotie und Heterozygotie nachwies (Abb. 20). Die Suche nach bekannten NCL-Genen und Kandidatengenen in diesen Regionen und nachfolgende Mutationsanalyse offenbarten *CLN5* als krankheitsverursachendes Gen.

Patienten mit Mutationen im *CLN5*-Gen wurden initial fast ausschließlich, mit Ausnahme eines Patienten mit Homozygotie für eine p.Asp279Asn Mutation in den Niederlanden (Savukoski *et al.*, 1998), bei finnischen Patienten beschrieben (Ranta *et al.*, 2001). Die häufigste Mutation ist bei 94 % der finnischen Patienten nachweisbar und stellt eine Deletion der Nukleotide 1175 und 1176 (c.1175delAT) im Exon 4 dar, die zu einem Stopp-Codon und einem verkürzten Protein (p.Tyr392X) führt (Savukoski *et al.*, 1998). In den letzten 3,5 Jahren wurden jedoch auch *CLN5*-Patienten außerhalb Finnlands beschrieben. So wurde eine Compound-Heterozygotie für die Mutationen p.Arg112Pro und p.Asp279Asn bei zwei portugiesischen Patienten gefunden (Bessa *et al.*, 2006) und zwei italienische Patienten wiesen eine homozygote p.Tyr258Asn Mutation auf (Cannelli *et al.*, 2007). Sogar in Kolumbien wurde ein *CLN5*-Patient mit p.Arg112His-Mutation beschrieben (Pineda-Trujillo *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die ersten *CLN5*-Patienten vom asiatischen Kontinent identifiziert. Die pakistanischen Patienten der Familie 2 mit der c.1072_1073delTT-Deletion zeigen einen relativ frühjuvenilen Krankheitsbeginn, wie es nur bei den italienischen und kolumbianischen Patienten der Fall war (Pineda-Trujillo *et al.*, 2005; Cannelli *et al.*, 2007). Die afghanischen *CLN5*-Patienten der Familie 3 mit der c.1137G>T-Transversion waren umgekehrt durch einen klassischen spätinfantilen Krankheitsbeginn charakterisiert.

4. Diskussion

4.1.3.2 Glykosylierungsmuster bei CLN5-Wildtyp und -Mutanten

Das *CLN5*-Gen kodiert ein lysosomales Protein aus 407 Aminosäuren mit einer errechneten Molekularmasse von 46,3 kDa. CLN5 besitzt vier Methionin-Reste an Position 1, 30, 50 und 62, die bei *in vitro*-Translationsversuchen als Start-Codon verwendet werden können. Daraus können vier verschiedene CLN5-Polypeptide mit errechneten Molekularmassen von 46,3; 43,4; 41,5; und 40,3 kDa synthetisiert werden (Isosomppi *et al.*, 2002). Expressionsstudien des humanen CLN5 in BHK-Zellen zeigen nach Deglykosylierung ein 38 kDa-Polypeptid, was vermuten lässt, dass das vierte Methionin als Start-Codon verwendet wird (Isosomppi *et al.*, 2002). Es wurde von den Autoren zusätzlich vermutet, dass das N-terminale Signalpeptid des CLN5 proteolytisch abgespaltet wird. Das resultierende CLN5-Protein hätte eine Molekularmasse von 36,6 kDa, wenn das vierte Start-Codon verwendet wurde (Isosomppi *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Daten bestätigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Einführung der Mutation p.Leu358AlafsX4 bzw. p.Trp379Cys in die *CLN5*-cDNA zur Expression von deglykosylierten CLN5-Polypeptiden mit Molekularmassen von 29 bzw. 34 kDa führt (Abb. 23). Da sich C-terminal myc/His markiertes überexprimiertes CLN5-Protein nicht mit myc-Antikörpern nachweisen ließ, kann vermutet werden, dass CLN5 auch am C-Terminus modifiziert wird (Daten nicht gezeigt). Wenn man bei der Mutante p.Leu358AlafsX4 das vierte Methionin als Start-Codon, die Abspaltung des N-Signalpeptids und diese Verkürzung am C-Terminus annimmt, wird ein 30,8 kDa-Polypeptid erwartet. Die Nichtübereinstimmungen zwischen der berechneten Molekularmasse des Wildtyps-/p.Trp379Cys-CLN5 (36,6 kDa) bzw. des p.Leu358AlafsX4-CLN5 (30,8 kDa) und der in der Arbeit beobachteten Molekularmassen (34 kDa bzw. 29 kDa) sind auf die Ungenauigkeit der SDS-PAGE-Analyse oder auf zusätzliche posttranslationale Modifikationen, wie limitierte Proteolyse oder Phosphorylierungen, zurückzuführen.

CLN5 enthält 8 mögliche *N*-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn179, 192, 227, 252, 304, 320, 330 und 401 (Savukoski *et al.*, 1998). Die Behandlung des in BHK-Zellen überexprimierten Wildtyp-CLN5 mit Deglykosylierungsenzymen, PNGaseF und EndoH, zeigte die Anwesenheit von sechs mannosereichen und einer komplexen Oligosaccharidkette (Isosomppi *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit

4. Diskussion

wurden in BHK- und in COS7-Zellen überexprimiertes Wildtyp-CLN5 und mutantes CLN5-Protein mittels PNGaseF vollständig deglykosyliert (Abb. 23). Dies führte zu einer Reduzierung der Molekularmasse um 18 kDa im Wildtyp-/p.Trp379Cys-CLN5 bzw. 16 kDa bei der p.Leu358AlafsX4-CLN5-Mutante. Wenn jede Zuckerkette eine Molekularmasse von ca. 2 kDa hat (Millat *et al.*, 1997), zeigen die Ergebnisse, dass das Asn401 als *N*-Glykosylierungsstelle im CLN5-Protein verwendet wird, und dass diese Stelle bei der Mutante p.Leu358AlafsX4-CLN5 fehlt. Wenn Lysate von COS7-Zellen mit überexprimiertem Wildtyp- oder mutantern CLN5 mit Endoglykosidase H behandelt wurden, waren alle *N*-gebundenen Oligosaccharide EndoH-empfindlich, was auf Abwesenheit komplexer Oligosaccharidketten hindeutet (Abb. 24).

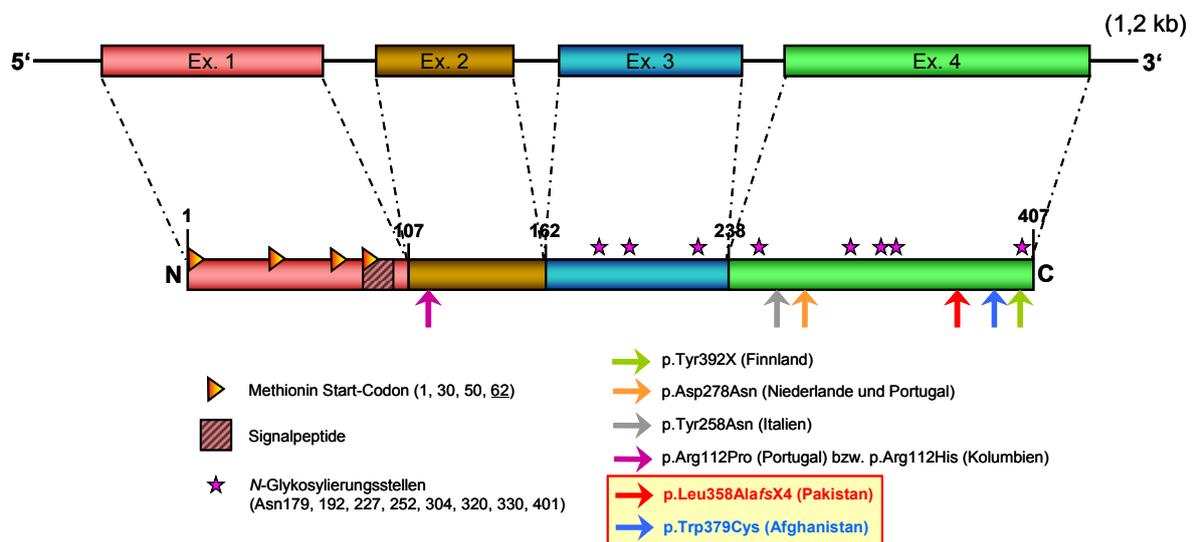


Abb. 34 Schematische Darstellung des CLN5-Proteins.

Das *CLN5*-Gen ist aus 4 Exonen aufgebaut, die 4 putative Met-Start-Codone enthalten, und ein Polypeptid aus 407 Aminosäuren kodieren (Isosomppi *et al.*, 2002). Das putative Signalpeptid bei Benutzung des Met62 als Start-Codon umfasst die Aminosäuren 62-95 (Isosomppi *et al.*, 2002). Die Lokalisation der 8 potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen ist angegeben (Savukoski *et al.*, 1998). Die Lokalisation der vier beschriebenen Mutationen in Patienten aus Finnland, Niederlande, Italien, Portugal und Kolumbien (Savukoski *et al.*, 1998; Pineda-Trujillo *et al.*, 2005; Bessa *et al.*, 2006; Cannelli *et al.*, 2007) sowie der 2 neue Mutationen in asiatischen Familien (Lebrun *et al.*, 2009) sind gekennzeichnet.

4.1.3.3 ER-Retention mutanter CLN5-Polypeptide

CLN5 ist ein lösliches lysosomales Matrixprotein, das Mannose-6-Phosphat-abhängig zu den Lysosomen transportiert wird (Isosomppi *et al.*, 2002; Vesa *et al.*, 2002; Kollmann *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde das Wildtyp CLN5-Protein durch Doppel-Immunofluoreszenz-Mikroskopie in den Lysosomen nachgewiesen, während

4. Diskussion

die beiden Mutanten (p.Leu358AlafsX4-CLN5 und p.Trp379Cys-CLN5) mit dem endoplasmatischen Retikulum-Marker kolokalisiert waren (Abb. 25). Bei der finnischen CLN5-Mutante p.Tyr392X zeigten Expressionsanalysen unterschiedliche, zelltypabhängige Sublokalisationen. In BHK-Zellen kolokalisierte diese CLN5-Mutante mit Golgi bzw. ER-Markerproteinen, während sie sich in COS1-Zellen in den Lysosomen befand (Isosomppi *et al.*, 2002; Vesa *et al.*, 2002). Genauso wurde die p.Asp279Asn-CLN5-Mutante in Lysosomen von COS1-Zellen gefunden (Vesa *et al.*, 2002). Es bedarf weiterer Expressionsanalysen von mutanten CLN5-Proteinen, um die Signalstrukturen zu identifizieren, die für einen erfolgreichen Transport von CLN5 vom ER zum Golgi nötig sind.

Es wurde beschrieben, dass CLN5 mit dem löslichen CLN2-Protein und mit dem membrangebundenen CLN3-Protein interagieren kann (Vesa *et al.*, 2002). Es sollte daher noch untersucht werden, ob die beiden hier untersuchten CLN5-Mutanten p.Leu358AlafsX4-CLN5 und p.Trp379Cys-CLN5 noch an diese NCL-Proteine binden können und ob diese Interaktionen eine Rolle bei dem Transport des CLN5-Proteins bzw. von CLN2 und CLN3 spielen.

Zusammengefasst hat die Identifikation zweier neuer homozygoter Mutationen im *CLN5*-Gen in asiatischen Familien erwiesen, dass CLN5 weltweit und mit einem sehr unterschiedlichen Krankheitsbeginn vorkommen kann. Expressionsanalysen zeigten, dass beide CLN5-Mutanten das ER nicht verlassen konnten, und die Lysosomen nicht erreichten. Die ER-Retention von mutantern, höchst wahrscheinlich falsch gefalteten Protein oder die Anwesenheit von nichtabgebauten Substraten aus retrograden Transport lysosomalen Speichermaterials, können zu ER-Stress führen, was als krankheitsverursachend bei anderen neurodegenerativen lysosomalen Erkrankungen diskutiert wird (Tessitore *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2008). Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden bereits veröffentlicht (Lebrun *et al.*, 2009).

4.2 Identifikation von CLN3-„*modifier genes*“

CLN3 ist in Deutschland die häufigste NCL-Erkrankung (Claussen *et al.*, 1992), bei der eine 1,02 kb Deletion im CLN3-Gen in 85 % der Fälle nachgewiesen wird (Munroe *et al.*, 1997). CLN3-Patienten weisen eine hohe Genotyp-Phänotyp Variabilität auf (Järvelä *et al.*, 1997) und können anhand des Hamburger-Scoring-Systems (Kohlschütter *et al.*, 1988) in drei Krankheitsverlaufsgruppen (klassischer, schneller und langsamer Verlauf) eingeteilt werden (Abb. 26).

„*Modifier genes*“ kodieren Polypeptide, die ihren Effekt vor dem Hintergrund spezieller Ausprägungen anderer Faktoren entfalten (Dipple und McCabe, 2000). Die Identifikation solcher Gene könnte helfen, eine bessere Voraussage des Krankheitsverlaufs, eine sicherere Diagnostik z.B. als „Biomarker“ zu ermöglichen und auch als potentielle Zielstrukturen für pharmakologische Interventionen zu dienen.

Mit Hilfe von acht CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion (vier mit „klassischem“, zwei mit „schnellem“ und zwei mit „langsamen“ Krankheitsverlauf) sollte in diesem zweiten Teil der Arbeit, Gene gefunden werden, die den CLN3-Krankheitsverlauf beeinflussen, bzw. die die CLN3-Krankheit als solche markieren können. Dafür wurden mRNA-Expressionsmuster in frisch isolierten Lymphozyten von CLN3-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht, da eine Verwendung von Hirnmaterial nicht möglich war und Patienten-Lymphozyten charakteristische große Vakuolen mit lysosomalem Speichermaterial aufweisen (Anderson *et al.*, 2005; Mole *et al.*, 2005).

Um die drei Krankheitsverlaufsgruppen miteinander vergleichen zu können, musste die geringe Anzahl der Patienten in der schnellen bzw. langsamen Verlaufsgruppe (je n=2) mit der Anzahl der Patienten in der klassischen Verlaufsgruppe (n=4) ausgeglichen werden. Dafür wurden aus den zwei Gruppen jeder CLN3-Patient mit jeweils gesunden Kontrollen der Gruppe verglichen (Tab. 4). Nur Gene, die in mindestens drei der Vergleiche gleichsinnig dysreguliert waren, wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Infolge dessen ist die Anzahl der dysregulierten Gene größer in der schnellen (689 Gene) bzw. langsamen (964 Gene) Verlaufsgruppe im Vergleich zu der in der klassischen Gruppe (93 Gene) (Abb. 27).

4. Diskussion

Eine *Cln3-knock-out*-Mauslinie (*Cln3^{-/-}*) wurde durch gezielte Unterbrechung des *Cln3*-Genes mittels Insertion einer Neomycin-Kassette an der Stelle der Exone 2 bis 6 und eines größten Teil des Exons 1 hergestellt (Mitchison *et al.*, 1999). Die Mäuse weisen klassische jNCL-Eigenschaften, wie die intralysosomale Speicherung von autofluoreszierendem Material und die Akkumulation von „*Fingerprint*“-Profilen, die u.a. die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase enthalten, auf. Die Symptome entwickeln sich jedoch sehr spät erst ab dem 14. Lebensmonat (Mitchison *et al.*, 1999; Pontikis *et al.*, 2005). Die mRNA-Expression von 2 Genen, die im Array dysreguliert waren, wurde im Gehirn von 21 bzw. 95 Wochen alten *Cln3^{-/-}*-Mäusen untersucht. Dieses CLN3-Modell war jedoch für die Verifizierung der dysregulierten Gene aus dem Microarray humaner Lymphozyten ungeeignet und zeigte zu den unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Cln3^{-/-}* und Wildtyp (Daten nicht gezeigt). *Cln3^{Δex7/8}-knock-in* Mäuse, die die 1,02 kb-Deletion mit Verlust der Exone 7 und 8 aufweisen (Cotman *et al.*, 2002), könnten möglicherweise für die Überprüfung der Array-Daten besser geeignet sein.

Die Validierung der Array-Daten wurde deshalb anhand von *CLN3*-siRNA behandelten HeLa-Zellen, einem nachgewiesenen effektiven Zellsystem zur Analyse akuter CLN3-abhängiger Prozesse (Pohl *et al.*, 2007), durchgeführt. Nach 3 Tagen lag die CLN3-Expression in si-RNA-behandelten Zellen bei 9 % der Expression in Kontrollzellen. Diese reduzierte Expression könnte möglicherweise Prozesse des schnellen Krankheitsverlaufes bei CLN3-Patienten repräsentieren.

4.2.1 *CDC42SE2* und *DUSP2*-Dysregulation bei CLN3-Patienten

Eine signifikante Dysregulation von fünf Genen wurde bei allen drei Vergleichsgruppen nachgewiesen (Tab. 5). Die zwei Gene, die am stärksten herunterreguliert (bis -3,2-fach) bzw. hochreguliert (bis +2,4-fach) waren, wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

4. Diskussion

• **CDC42SE2**

CDC42SE2 kodiert für den „CDC42 *small effector 2*“ (SPEC2), der mit SPEC1 verschiedene CDC42-Signal-Aktivitäten reguliert und koordiniert (Pirone *et al.*, 2000). Dabei wird SPEC2 vor allem für die Regulation der F-Actin-Polymerisierung bei CDC42-induzierter Phagozytose in Makrophagen verantwortlich gemacht (Ching *et al.*, 2007). Cdc42 ist eine Rho-GTPase, die wichtig für den Membrantransport (Kroschewski *et al.*, 1999), Zellteilung (Rincon *et al.*, 2007) und Kinase-Signaltransduktionswege ist, die zur transkriptionellen Aktivierung führen (Johnson, 1999). Außerdem spielt CDC42 eine wichtige Rolle bei der Formation der Filopodien in der Nähe der Lamellipodien bei der Neuronen-Migration und dem Auswachsen von Neuriten (Meyer und Feldman, 2002; Heasman und Ridley, 2008).

Die Expression von *CDC42SE2* ist bei allen hier untersuchten CLN3-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen stark reduziert, während die *CDC42SE2*-Expression in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen nur leicht (10-30 %) herunterreguliert ist. Die Gründe für diese Diskrepanz sind unklar, könnten jedoch in Zelltyp-spezifischen Expressionsunterschieden und Wirkungen des *CDC42SE2*-Signalweges begründet sein.

• **DUSP2**

DUSP2 kodiert für die „Dual Specificity Phosphatase 2“ (DUSP2), auch PAC1 genannt. Dieses Enzym dephosphoryliert und deaktiviert dadurch die „*Extracellular Signal-Regulated*“ Kinasen (ERK) und die p38 (p38/RK/CBP) „*Mitogen Activated Protein*“ (MAP)-Kinasen (Ward *et al.*, 1994; Chu *et al.*, 1996). Darüberhinaus wurde in Mäusen nachgewiesen, dass die PAC1-Expression nach epileptischen Anfällen im Gehirn auch induziert wird. Innerhalb der ersten 3 Stunden nach epileptischen Anfällen ist PAC1 in Neuronen des Hippocampus nachweisbar, während es 2-3 Tage nach epileptische Anfälle mit Mikrogliazellen und sterbenden Neuronen des Hippocampus detektiert wurde, was als Schutz vor Apoptose bzw. Inflammation wirkt (Boschert *et al.*, 1997).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen kann sowohl zur Zell-Differenzierung und -Proliferation (Rajan und McKay, 1998; Learish *et al.*, 2000) als auch zur Apoptose führen (Chen *et al.*, 2009). Sie sind im Gehirn hoch exprimiert und z.B. nach epileptischen Anfällen aktiviert (Gass *et al.*, 1993).

4. Diskussion

DUSP2 ist in allen CLN3-Patienten-Lymphozyten und in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen stark überexprimiert und stellt ein interessantes Zielprotein für weitere Untersuchungen in diesem CLN3-Modell dar.

4.2.2 *MARCKS*, *SPIB*, *RAPGEF1* und *BACE2*

Um zu verstehen, welche Faktoren den Unterschied im Phänotyp zwischen CLN3-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf und CLN3-Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf verursachen könnten, wurden Gene ausgesucht, die bei beiden Vergleichsgruppen dysreguliert waren, jedoch jeweils in die entgegengesetzte Richtung. Es wurden insgesamt 13 Gene gefunden, die eine signifikante Dysregulation der mRNA-Expression (>1,7-fach) aufwiesen. Hierbei war die mRNA-Expression dieser 13 Gene bei Patienten mit schnellem Verlauf hochreguliert und bei Patienten mit langsamem Verlauf herunterreguliert (Tab. 6). Es wurden dabei keine Gene gefunden, die bei Patienten mit schnellem Verlauf signifikant herunterreguliert und bei Patienten mit langsamem Verlauf signifikant hochreguliert waren. Vier von den 13 Genen wurden auf Grund ihrer Funktion in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

• *MARCKS*

MARCKS kodiert ein ubiquitär vorkommendes Protein der „*myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate*“-Familie (*MARCKS*), das zuerst als Substrat der Protein Kinase C identifiziert wurde. *MARCKS* spielt eine Rolle bei der Regulation der Gehirnentwicklung, bei der zellulären Migration und Adhäsion, sowie bei der Endo-, Exo- und Phagozytose und der Neurosekretion. Zusätzlich vermittelt *MARCKS* die Regulation des Actin-Zytoskeletts (Arbuzova *et al.*, 2002).

Die mRNA-Expression von *MARCKS* ist in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf hochreguliert, während sie in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf herunterreguliert ist (Tab. 6, Abb. 29).

4. Diskussion

• ***SPIB***

SPIB kodiert für den Spi-B Transkriptionsfaktor (*Spi-1/PU.1 related*), der eine Rolle bei der Entwicklung plasmazytoider dendritischer Zellen (pDCs) (Schotte *et al.*, 2004) und der transkriptionellen Regulation der T-Lymphozyten-Entwicklung (Anderson, 2006) spielt. Außerdem ist Spi-B in die transkriptionelle Repression von BLIMP1 und XBP-1 involviert, zwei wichtigen Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen (Schmidlin *et al.*, 2008).

Die mRNA-Expression von *SPIB* ist in CLN3-Patienten-Lymphozyten mit schnellem Krankheitsverlauf und in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen stark hochreguliert, während der *SPIB*-mRNA-Spiegel in CLN3-Patienten-Lymphozyten mit langsamem Krankheitsverlauf stark herunterreguliert ist (Tab. 6, Abb. 29).

• ***RAPGEF1***

RapGEF1 kodiert für C3G, einen Guanin-Nukleotid-Ausstausch-Faktor (*GTP-exchange factor*) für kleine GTPasen der Ras-Familie (insbesondere Rap1). C3G spielt eine Rolle bei verschiedenen Signaltransduktionswegen, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren (Knudsen *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994). C3G kann durch verschiedene extrazelluläre Signale wie die Bindung von Crk-Protein (Arai *et al.*, 1999; Uemura und Griffin, 1999; Arai *et al.*, 2001) und die Stimulation von Reelin (Ballif *et al.*, 2004) aktiviert werden. Reelin reguliert die Migration von Neuronen während der Gehirnentwicklung (D'Arcangelo *et al.*, 1995). Reelin phosphoryliert ein Tyrosinrest 504 von C3G und aktiviert dadurch Rap1 in kortikalen Neuronen (Ballif *et al.*, 2004). C3G-defiziente Mäuse sterben vor dem embryonalen Tag 7,5 (Ohba *et al.*, 2001). Mäuse mit erniedrigter C3G-Expression (<1 % mRNA bzw. < 5 % Reelin-Protein von Wildtyp-Mäuse) überleben hingegen und sind sensitiv für Rapgef1 regulierte Migration kortikaler Neurone (Voss *et al.*, 2003; Voss *et al.*, 2008).

Die mRNA-Expression von *RAPGEF1* ist in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf und in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen stark hochreguliert, während sie in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf stark herunterreguliert ist (Tab. 6, Abb. 29).

4. Diskussion

• **BACE2**

BACE1 und *BACE2* kodieren jeweils für ein „ β -site APP (*Amyloid-Precursor-Protein*) cleaving enzyme“, ein Membranprotein der Aspartylprotease-Familie (Hussain *et al.*, 1999). APP wird bei Morbus Alzheimer mittels zweier Enzyme, der β - und γ -Sekretase, zum β -Amyloid-Protein prozessiert, das den Hauptbestandteil der senilen Plaques ausmacht (Steiner und Haass, 2000). *BACE1* spaltet APP am N-terminus der A β -Peptidomäne (zwischen Tyr10 und Glu11) (Liu *et al.*, 2002), während *BACE2* APP in der Nähe der α -Sekretase-Spaltungsstelle innerhalb der A β -Peptidomäne abspaltet (Yan *et al.*, 2001).

Die *BACE2*-Expression ist in Herz, Nieren, Prostata und Plazenta sehr hoch im Vergleich zu anderen Geweben wie z.B. dem Gehirn (Vassar *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 2000). Trotzdem wird *BACE2* in Neuronen des Hippocampus und des frontalen und temporalen Kortexes gefunden (Hussain *et al.*, 2000).

Die Gene *BACE2* und *APP* sind auf dem Chromosom 21 in der „*obligate Down Syndrom*“ Region lokalisiert, einer kleinen Region, die bei Trisomie 21 vererbt sein soll und die charakteristischen Symptome und Eigenschaften des Down Syndroms bedingen sollen (Yan *et al.*, 2001). Daher sind Symptome der Alzheimerkrankheit oft mit dem Down Syndrom assoziiert (Mann, 1989; Petronis, 1999). Außerdem wurden das β -Amyloid-Peptide im Speichermaterial verschiedener Gewebe von CLN3-Patienten nachgewiesen (Hofman *et al.*, 1999).

Die mRNA-Expression von *BACE2* ist in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf hochreguliert, während sie in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf herunterreguliert ist (Tab. 6, Abb. 29).

Die vorgelegten Genlisten dienen dazu, eventuelle Faktoren zu finden, die die Genotyp-Phänotyp-Variabilität von CLN3 beeinflussen können bzw. die den Verlauf der CLN3-Krankheit markieren. Diese Gene können vielleicht helfen, die Funktion von CLN3 besser zu verstehen. Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung dieser Kandidatengene für Pathogenese der CLN3-Krankheit bleiben weiteren Arbeiten vorbehalten und waren nicht Gegenstand dieser Studie.

4.2.3 Dysregulierte Expression lysosomaler und NCL-assoziiierter Gene bei CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion

Für diesen Projektteil wurde die mRNA-Expression von bekannten NCL-Genen bzw. Genen, die Proteine des Lysosoms und der Lysosom-Biogenese kodieren, näher analysiert (Tab. 7). Hierbei war die Signifikanz der Dysregulation nicht so hoch gesetzt worden wie bei den anderen Analysen. Das bedeutet, dass im Gegensatz zu bisherigen Analysen wo eine 1,7-fache Dysregulation bei drei von vier Vergleichsgruppen als signifikante Veränderung eingestuft wurde, wurde hier die Dysregulation auf 1,1-fach bei mindestens zwei von vier Vergleichsgruppen gesetzt. Dabei fiel besonders die 5,4-fach reduzierte *CLN8* mRNA-Expression in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf auf. In Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf wurde leicht erhöhte *CLN8* mRNA-Spiegel festgestellt. Diese Expression sollte in weiteren Analysen anhand Real-Time-PCR an induzierten CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen verifiziert werden.

Die mRNA-Expression von *LAMP1* ist in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem und langsamem Krankheitsverlauf herunterreguliert. Auch in CLN3-down-regulierten HeLa-Zellen ist die *LAMP1*-Expression um 66 % erniedrigt (Pohl *et al.*, 2007). Damit stellt *LAMP1* einem potentiellen Biomarker für CLN3 dar, der detaillierter untersucht werden sollte.

Die mRNA-Expression von *CLN3* war im Lymphozyten von CLN3-Patienten nicht auffällig verändert. Auch in Fibroblasten-Zellen von CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion waren zwei mRNA-Transkripte nachweisbar und es wird angenommen, dass zwei *CLN3*-Polypeptide exprimiert werden können, die die Aminosäuren 1-153 und 1-153 verbunden mit 264-438 enthalten (Kitzmüller *et al.*, 2008). Die in drei Lymphoblasten-Zelllinien von CLN3-Patienten mit 1,02 kb-Deletion gefundene 2 bis 5-fach erniedrigte *CLN3*-mRNA-Expression (Chan *et al.*, 2008) steht dagegen im Widerspruch zu den eigenen vorliegenden Daten und denen von Kitzmüller *et al.* (2008), was aber möglicherweise auf kultivierungsbedingte Expressionsveränderungen zurückzuführen ist.

4. Diskussion

Die vorliegende DNA-Microarray Analyse stellte einen ersten experimentellen Ansatz zur Identifizierung von „*modifier genes*“ dar, die möglicherweise für einen schnellen bzw. langsamen Krankheitsverlauf bei CLN3-Patienten verantwortlich oder beteiligt sind. Natürlich benötigen die „*modifier genes*“ noch weiterführende Untersuchungen bevor ihre biologische Signifikanz klar wird. Dazu gehört als erstes die Validierung einer allgemeinen über Lymphozyten hinausgehenden Bedeutung der entsprechenden Genprodukte. Weiterhin ist die Etablierung experimenteller *in vitro*-Systeme notwendig, um z.B. die C3G-regulierte Rap1-Aktivität zu messen oder die Auswirkung von erhöhter *SPIB*-Expression auf XBP-1 regulierte Gene zu untersuchen. Die Einbeziehung weiterer CLN3-Patienten mit 1,02 kb-Deletion ohne medikamentöse Behandlung mit schnellem oder langsamem Krankheitsverlauf wäre ebenfalls vorteilhaft, um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren. Das hier angewandte CLN3-siRNA behandelte HeLa-Zellkultursystem erscheint besser geeignet als Modell für einen schnellen Krankheitsverlauf als die *CLN3*-ko-Maus. Möglicherweise könnten CLN3-siRNA behandelte kultivierte neuronale Zellen aus Mäusen oder Ratten ein besseres Modellsystem repräsentieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

→ Die neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) bilden die am weitesten verbreitete Gruppe neurodegenerativer lysosomaler Speichererkrankungen des Kindes- und Jugendalters. Auf der Grundlage des Erkrankungsbeginns, der klinischen Symptome und der Genetik wurden elf NCL-Formen charakterisiert (CLN1-CLN10, CLCN6). Bei neun dieser Formen wurden die krankheitsverursachenden Gene identifiziert. Mindestens 10 % aller NCL-Patienten können jedoch bisher genetisch keiner der bekannten NCL-Formen zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Gendefekte bei drei konsanguinen Familien mit unklarer spätinfantiler bzw. juveniler NCL mittels genetischer Kopplungs-, Expressions- und Mutationsanalysen identifiziert.

- In der ersten Familie türkischer Herkunft wiesen zwei Patienten eine spätinfantile NCL-ähnliche Erkrankung auf. Nach Ausschluss bekannter Gen- und Protein-Defekte passend für die klinischen Symptome und das Alter bei Erkrankungsbeginn (CLN1, CLN2, CLN3, CLN6, CLN8 und CLN10), wurde mittels genetischer Kopplungsanalysen und nachfolgende Mutationsanalysen von Kandidatengenen eine homozygote Mutation, c.1102G>A (p.Asp368Asn), im *Neurabin-I*-Gen identifiziert. Neurabin-I ist ein Inhibitor der Protein Phosphatase 1, die u.a. am intrazellulären Transport, Zellteilung und Proteinsynthese beteiligt ist. Sollten die klinischen und anatomischen Veränderungen sowie weiterführende biochemische Untersuchungen lysosomale Dysfunktionen in Neurabin-I-defizienten Zellen bestätigen, würde Neurabin-I den ersten Vertreter eines zytosolischen Proteins repräsentieren, dessen Defekt zur NCL führt.

- In der zweiten Familie pakistanischer Herkunft wiesen zwei Patienten eine frühe juvenile NCL auf. Nach Ausschluss bekannter Gen- und Protein-Defekte wurde mittels genetischer Kopplungsanalysen eine neue homozygote Mutation, c.1072_1073delTT (p.Leu358AlafsX4), im *CLN5*-Gen identifiziert. In der dritten Familie afghanischer Herkunft wiesen zwei Patienten eine spätinfantile NCL auf. Hier wurde ebenfalls eine neue homozygote Mutation, c.1137G>T (p.Trp379Cys), im *CLN5*-Gen identifiziert. Die Patienten dieser zwei Familien stellen die ersten *CLN5*-Patienten dar, die in Asien diagnostiziert wurden. Expressionsanalysen zeigten eine

5. Zusammenfassung

Verkürzung des mutanten p.Leu358AlafsX4 CLN5-Proteins und einen Verlust der N-Glykosylierungsstelle am Asparagin 401. Die Größe und die Glykosylierung des p.Trp379Cys mutanten CLN5-Proteins blieben normal. Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie zeigte, dass das Wildtyp-CLN5-Protein komplett in den Lysosomen lokalisiert ist, während die beide mutanten Proteine im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden, ohne die Lysosomen zu erreichen.

→ Ein Defekt im *CLN3*-Gen führt zur „klassischen“ juvenilen NCL, eine im Schulalter mit Erblindung beginnende Krankheit; später kommen Demenz und weitere psychomotorische Abbauerscheinungen hinzu. Bislang wurden mehr als 40 *CLN3*-Mutationen beschrieben. 85 % der Patienten sind homozygot für eine 1,02 kb Deletion, die zum Verlust der Exone 7 und 8 führt. Trotz gleichen Gendefekts besteht bei vielen *CLN3*-Patienten eine hohe Genotyp-Phänotyp Variabilität. In der vorliegenden Arbeit sollten „*modifier genes*“ identifiziert werden, die den klinischen Verlauf der *CLN3*-Krankheit beeinflussen und möglicherweise als prognostische Faktoren dienen könnten.

Die Genexpression in frisch isolierten Lymphozyten von acht *CLN3*-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion, die einen klassischen (n=4), schnellen (n=2) und langsamen Krankheitsverlauf (n=2) aufweisen, wurde mit der von sieben geschlechts- und altersentsprechenden Kontrollen mittels genomweiter Microarray-Analysen verglichen.

- In Lymphozyten von *CLN3*-Patienten mit langsamem Krankheitsverlauf waren 964 Gene signifikant dysreguliert. 93 Gene waren in Patienten mit klassischem Krankheitsverlauf und 689 Gene in Patienten mit schnellem Krankheitsverlauf gegenüber den Kontrollen verändert.

- Die mRNA-Expression von 5 Genen war bei allen *CLN3*-Patienten dysreguliert. Um zu überprüfen, ob der akute Verlust von *CLN3* einen ähnlichen Effekt auf die Expression dieser Gene im Zell-Modell hat, wurden die mRNA-Spiegel von zwei Kandidatengenen (*CDC42SE2* und *DUSP2*) in, mit *CLN3*-siRNA behandelten Hela-Zellen analysiert. In diesen Zellen war die *CLN3*-Expression um 96% erniedrigt. Die zwei Gene zeigten die gleiche Tendenz der mRNA-Expression wie im DNA-Array: *CDC42SE2* ist 10 % bis 30 % erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle und *DUSP2* ist 1,4-1,9-fach erhöht.

5. Zusammenfassung

- Die mRNA-Spiegel von 13 Genen waren bei Patienten mit schnellem Verlauf erhöht und bei Patienten mit langsamem Verlauf erniedrigt. Diese Daten wurden anhand von 4 Kandidatengen (*Spi-B*, *RapGEF1*, *MARCKS* und *BACE2*) in CLN3-siRNA behandelten HeLa-Zellen überprüft. Alle Gene zeigten eine unterschiedliche, zum Teil signifikante Erhöhung der mRNA-Expression nach CLN3 *knock-down*.

→ Die Daten zeigen, dass die genom-weite genetische Kopplungsanalyse eine geeignete Methode ist, um neue Gendefekte bei klinisch und morphologisch diagnostizierten NCL-Patienten unklarer Genese zu identifizieren. Microarray-Analyse der Lymphozyten aus CLN3-Patienten mit gleicher Mutation aber unterschiedlichem Krankheitsverlauf können erste Anhaltspunkte für die Identifizierung von „*modifier genes*“ und Prognosefaktoren liefern, bedürfen aber extensiver biochemischer Validierung an *in vitro* und *in vivo* Modellsystemen.

6 ANHANG

6.1 Primer und besondere PCR-Programme

6.1.1 *Neurabin-1*

▪ **Teil des Exon 1 mit dem Nukleotid 1102**

NeurEx1MutF 5' – AGC CAA CTG TTA GAA GAT GC – 3'
NeurEx1MutR 5' – ACT GTG CAT GTA CAC ATG GG – 3' T_m 53°C

▪ **Mutagenese (c.1102G>A Mutation)**

NeurMutF 5' – TGC AGG TGG **TA** TTT CAC CTC – 3'
NeurMutR 5' – GAG GTG AAA **TTA** CCA CCT GCA – 3' T_m 53°C

▪ **cDNA Sequenzierung** (nur Vorwärtsprimer)

NeurSeq1 5' – CCT CAG AGA AGA ATG AAG CC – 3'
NeurSeq2 5' – GCT CCC GAA CTG AGG CTG TC – 3'
NeurSeq3 5' – CCA GCA GAG CAA GGA ACC CG – 3'
NeurSeq4 5' – GGA GAG ACA GGC ACT GAG CAG G – 3'
NeurSeq5 5' – GGA ATG GGT GTT GGA GCA GA – 3'
NeurSeq6 5' – CGA TGA CGA GAC AGG AGA AT – 3'
NeurSeq7 5' – GGA AAG AAT GTT GAA GTT GG – 3'
NeurSeq8 5' – GGT GAA GTC TCT AAA GGG GA – 3'
NeurSeq9 5' – CCT AAA ACA CCA GGG CTC TC – 3'
NeurSeq10 5' – GCA TCC CAG GAC CGA GCA GT – 3'

6.1.2 *CLN5*

▪ **cDNA Sequenzierung (nach Teixeira *et al.*, 2003)**

Exon1

CLN5cF1 5' – TGG GAG CCA GAC CAA AGC AC – 3'
CLN5cR1 5' – AGG TGA GCC AGT TGG ACA GAA AG – 3' T_m 55°C

Exon2

CLN5cF2 5' – TTG ACT TCC GTC CAA AAC CTG – 3'
CLN5cR2 5' – CTG TTT CAT TGT CCT GTT TCA CC – 3' T_m 54°C

Exon3

CLN5cF3 5' – GGG ACA TTA GTT CAA GTA GC – 3'
CLN5cR3 5' – TTT CAT AGG TAA AAA CCA ATA – 3' T_m 46°C

Exon4

CLN5cF4 5' – CCC TTC AAA CCA CAT TTG CCA – 3' T_m 58°C

6. Anhang

CLN5cR4 5' – AAT TGA AAC CAA GAT CAC CTA ACT CG – 3'

▪ Teil des Exon 4 mit den Nukleotiden 1072 und 1073

CLN5Ex4MutF 5'– CCT TCA AAC CAC ATT TGC – 3'

CLN5Ex4MutR 5'– TTT CAT AGG TAA AAA CCA ATA TT – 3'

T_m 48°C

▪ Vor-Klonierung (+Myc-Tag und Einführung der c.1072_1073delTT-Mutation)

CLN5-FORnew 5' – CAC CAT GTG CCG GAA CCT GCG C – 3'

CLN5-MYC-REV1 5' – GAT GAG TTT TTG TTC TAA ACC AGA GAG TGT TTT GTT – 3'

CLN5-MYC-REV2 5' – TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC TAA ACC – 3'

CLN5-MUT-REV1 5' – TTT TTG TTC AAA ATT TGC GAG ACT CAA CAG AAA TTC TTT – 3'

CLN5-MUT-REV2 5' – TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC AAA ATT TGC GAG – 3'

➔ 1. PCR

Ansatz

1 µl Plasmid-DNA mit CLN5-cDNA
1 µl (=10 pmol) CLN5-FORnew
1 µl (=10 pmol) CLN5-MYC-REV1
bzw. CLN5-MUT-REV1
4 µl (10 mM je Nukleotid) dNTPs-mix
10 µl (5x) Phusion®-HF Puffer
0,5 µl Phusion®-Polymerase
33 µl d.H₂O

PCR-Programm

Denaturierung: 98°C 30 s
Denaturierung: 98°C 10 s
Annealing: T_m 30 s
Elongation: 72°C 45 s
Elongation: 72°C 10 min

35 x

T_m 64,8°C für WT
 T_m 64,2°C für Mut

➔ 2. PCR

Ansatz

4 µl PCR-Produkt von 1. PCR (Gel-Elution)
1 µl (=10 pmol) CLN5-FORnew
1 µl (=10 pmol) CLN5-MYC-REV2
bzw. CLN5-MUT-REV2
4 µl (10 mM je Nukleotid) dNTPs-mix
10 µl (5x) Phusion®-HF Puffer
0,5 µl Phusion®-Polymerase
33 µl d.H₂O

PCR-Programm

Denaturierung: 98°C 30 s
Denaturierung: 98°C 10 s
Annealing: 65°C 30 s
Elongation: 72°C 45 s
Elongation: 72°C 10 min

35 x

▪ Mutagenese (c.1137G>T Mutation)

CLN5-YMut-f 5' – TTT TGA ATA TTG TTT TTT ACC TAT G – 3'

CLN5-YMut-r 5' – CAT AGG TAA AAA ACA ATA TTC AAA A – 3'

T_m 45°C

6.1.3 CLN6

(nach Teixeira *et al.*, 2003)

Exon1

CLN6F1 5' – CCA GAC AGA GAA GGA AAC GC – 3'

CLN6R1 5' – AGG ACG CCA CAC TCG CAG – 3'

Touch Down 50°C

Exon2

CLN6F2 5' – GCA AAT TCA AGC CAC ACT AAG TG – 3'

T_m 54°C

6. Anhang

CLN6R2	5' – GTG TGT CTC CTC CTG TCC TCA AG – 3'	
Exon3		
CLN6F3	5' – GCT TGA GTC AGG ACA CAG GGC TTA G – 3'	Touch Down 50°C
CLN6R3	5' – TGC CCA GGT GAG CCC ATT CTT C – 3'	
Exon4		
CLN6F4	5' – CAG ACT GTG CTC CTA GGG CTT AC – 3'	T _m 54°C
CLN6R4	5' – AGC AGA GGG TGT CAC ATA CTG TG – 3'	
Exon5		
CLN6F2	5' – ACT GGG AGA AGG GTG GTC AG – 3'	Touch Down 50°C
CLN6R2	5' – TGT GTC CCT GAG CCA GTG AC – 3'	
Exon6		
CLN6F3	5' – ACA CAG CAG GTC CAT TGG C – 3'	T _m 52°C
CLN6R3	5' – TCT GTC CCA CCT TTG ACG C – 3'	
Exon7		
CLN6F4	5' – ACA CAC ACA CAC ACA CAC ACG AAT C – 3'	T _m 56°C
CLN6R4	5' – GTG GCT TAG AGC GGC ATA GTT C – 3'	

→PCR-Programme

Exone 2, 4, 6 und und 7

Denaturierung: 94°C 40 s
Annealing: T_m°C 40 s
Elongation: 72°C 1 min

} 29 x

Exone 1, 3 und 5 (Touch Down)

Denaturierung: 94°C 40 s
Annealing: 70°C 40 s
Elongation: 72°C 1 min

} 40x, mit Annealing immer 1°C niedriger bis 50°C.

6.1.4 Calpain 9

Exon1

Cal9E1F 5' – GCA GAG TGG GCA GAG GG – 3' T_m 54°C
Cal9E1R 5' – GGC TGC TGA ACC TCG G – 3'

Exon2

Cal9E2F 5' – CCC AGC CTT ATC CAG AGC – 3' T_m 54°C
Cal9E2R 5' – TTC AGA GGG AGT GAG GAA GC – 3'

Exon3

Cal9E3F 5' – TCT GAA ACT CCC CAC ATC C – 3' T_m 54°C
Cal9E3R 5' – GCT TTA GCA TGG TTT AGG ACC – 3'

Exon18

Cal9E18F 5' – TTG AGG AGT GAA ACA GTG GC – 3' T_m 52°C

6. Anhang

Cal9E18R 5' – GGA GGG TGA CTG AAG ATG C – 3'

Exon19

Cal9E19F 5' – AGA GTC CCA TCG CCG C – 3'

Cal9E19R 5' – ATG AGC AAG GGA GAG TGA GC – 3'

T_m 54°C

Exon20

Cal9E20F 5' – GTC TCT GTC TTA CCA ACT GTG C – 3'

Cal9E20R 5' – GAA GTC AGG ATT CTG TGC G – 3'

T_m 54°C

6.1.5 TMEM78

Teil 3*

TM3f 5' – AGA AAT GGA GAG GGA GAA TAA ACC – 3'

TM3r 5' – CCC AGC CCA CAG TGA AGC – 3'

T_m 52°C

Teil 4*

TM4f 5' – CTG AGC CGA GTT CTA TGG TGG – 3'

TM4r 5' – GGA GGA GGA GAG GAA GGA GG – 3'

T_m 54°C

* Die TMEM78 gDNA-Sequenz wurde in 4 Stücken aufgeteilt. Teil 1 und Teil 2 wurden von AGOWA durchsequenziert.

6. Anhang

6.2 Überprüfte Kandidatengene in der Familie 1

Tab. 8 Kandidatengene, die durch Mutationsanalysen genomischer DNA aus Patient 2 der Familie 1 mit unbekannter NCL überprüft wurden.

Gensymbol	Genname	Gen-loci	Sequenzierung
AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	7q22.1	AGOWA
BET1	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)	7q21.1-q22	AGOWA
CALU	calumenin	7q32	AGOWA
CAPN9	calpain 9	1q42.11-q42.3	Arbeit** (Exons 1, 2, 3, 19 und 20)
GALNT2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	1q41-q42	AGOWA*
LOC402676	similar to UPF0240 protein C6orf66	7q21.3	AGOWA
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	7q22	AGOWA
TMEM78	Transmembrane protein 78	1q42.13	Arbeit + AGOWA
PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	7q21.3	AGOWA

* AGOWA: die Sequenzierung wurde kommerziell durch die Firma von LGC's AGOWA genomics, Berlin, ausgeführt

** Arbeit: die Sequenzierung erfolgte in der vorliegenden Arbeit.

Mit orange hervorgehoben ist das Gen, in dem die homozygote Mutation c.1102G>A gefunden worden ist.

6. Anhang

6.3 Stark-dysregulierte Gene bei CLN3-Patienten mit homozygoter 1,02 kb-Deletion

Tab. 9 Auflistung der 20 der am stärksten dysregulierten Gene in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit klassischem Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Gensymbol	Genname	Dysregulation der mRNA-Expression *
ALAS2	aminolevulinate, delta-, synthase 2 (sideroblastic/hypochromic anemia)	-12,6
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	5,8
PTPRK	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	5,6
PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	4,9
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	4,8
RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	4,3
KIAA1276	KIAA1276 protein	-4
LOC728613	programmed cell death protein 6-like	3,4
IL1B	interleukin 1, beta	3,4
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	2,9
HBM	hemoglobin, mu	-2,8
---	Transcribed locus, strongly similar to XP_001106923.1 similar to p30 DBC protein [Macaca mulatta]	-2,8
TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	2,6
ANKRD42	Ankyrin repeat domain 42	-2,6
RGS1	regulator of G-protein signaling 1	2,5
CD83	CD83 molecule	2,5
ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)	2,4
DUSP2	dual specificity phosphatase 2	2,4
ARTS-1	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	-2,4
HBB	hemoglobin, beta	-2,4

* Höhe der Dysregulation (fach der mRNA-Menge bei gesunden Kontrollpersonen)

Mit orange hervorgehoben ein Gen, das bei allen CLN3-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant dysreguliert war.

6. Anhang

Tab. 10 Auflistung der 20 am stärksten dysregulierte Gene in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit langsamem Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Gensymbol	Genname	Dysregulation der mRNA-Expression *
HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	343,7
HLA-DQA1	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	-115,4
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	-87,4
ZNF718	Zinc finger protein 718	-26,9
CLLU1	chronic lymphocytic leukemia up-regulated 1	-23
DSC1	desmocollin 1	-22,6
---	Immunoglobulin light chain variable region complementarity determining region (CDR3) mRNA	-18,1
---	MRNA; cDNA DKFZp762I0915 (from clone DKFZp762I0915)	16,3
IGHA1 /// IGHD /// IGHG1 /// IGHM /// IGHV4- 31 /// IL8 /// ZCWPW2	immunoglobulin heavy constant alpha 1 /// immunoglobulin heavy constant delta /// immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker) /// immunoglobulin heavy constant mu /// interleukin 8 /// exocyst complex component 7 /// immunoglobulin heavy variable 4-31 /// zinc finger, CW type with PWWP domain 2	-15,7
IGHG1 /// IGHG2 /// IGHG3 ///	immunoglobulin heavy constant gamma 1, 2, 3 (G1m, G2m, G3m marker)	-15,2
GJB6 /// IGKC /// NTN2L	immunoglobulin kappa constant /// netrin 2-like (chicken) /// gap junction protein, beta 6	-13,9
SYNC1	syncoilin, intermediate filament 1	-13
IGJ	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	-13
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	-12,6
IGHA1 /// IGHA2	immunoglobulin heavy constant alpha 1 /// immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker)	-12,3
HLA-DRB (1, 3, 4, 5)	major histocompatibility complex, class II, DR beta (1, 3, 4, 5)	-11,9
---	CDNA FLJ11831 fis, clone HEMBA1006562	11,1
---	Transcribed locus	-10,9
HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	-10,7
LOC728052	hypothetical protein LOC728052	10,4

* Höhe der Dysregulation (fach der mRNA-Menge bei gesunden Kontrollpersonen)

Mit grün hervorgehoben ist ein Gen, das auch in den 20 am stärksten dysregulierten Genen der Patienten mit schnellen Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden wurde.

6. Anhang

Tab. 11 Auflistung der 20 am stärksten dysregulierten Gene in Lymphozyten von CLN3-Patienten mit schnellem Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Gensymbol	Genname	Dysregulation der mRNA-Expression *
<i>C1orf87</i>	chromosome 1 open reading frame 87	26,9
<i>ZFP57</i>	zinc finger protein 57 homolog (mouse)	21,5
<i>HERC1</i>	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	-14,2
<i>DOCK3</i>	dedicator of cytokinesis 3	12,6
<i>S100B</i>	S100 calcium binding protein B	-10
<i>DSC1</i>	desmocollin 1	-8,3
<i>PRR17</i>	proline rich 17	7,5
<i>FLJ10781</i>	hypothetical protein FLJ10781	7,5
<i>UGT2B17</i>	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	-7,3
<i>DOCK5</i>	dedicator of cytokinesis 5	-7,2
<i>BUB1</i>	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	-7,1
<i>FOLR3</i>	folate receptor 3 (gamma)	7
<i>ASPM</i>	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	-7
<i>TK1</i>	thymidine kinase 1, soluble	-6,6
<i>NCAPG</i>	non-SMC condensin I complex, subunit G	-6,1
<i>GLDC</i>	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	-5,6
<i>RRM2</i>	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	-5,6
<i>PRR16</i>	proline rich 16	5,3
<i>IGFBP3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	5,2
<i>HRASLS2</i>	HRAS-like suppressor 2	5,2

* Höhe der Dysregulation (fach der mRNA-Menge bei gesunden Kontrollpersonen)

Mit grün hervorgehoben ist ein Gen, das auch in den 20 am stärksten dysregulierten Genen der Patienten mit langsamen Verlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden wurde.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O. & Cardon, L.R.** (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* **30**, 97-101.
- Allen, P.B., Zachariou, V., Svenningsson, P., Lepore, A.C., Centonze, D., Costa, C., Rossi, S., Bender, G., Chen, G., Feng, J., Snyder, G.L., Bernardi, G., Nestler, E.J., Yan, Z., Calabresi, P. & Greengard, P.** (2006) Distinct roles for spinophilin and neurabin in dopamine-mediated plasticity. *Neuroscience* **140**, 897-911.
- Anderson, G., Smith, V.V., Malone, M. & Sebire, N.J.** (2005) Blood film examination for vacuolated lymphocytes in the diagnosis of metabolic disorders; retrospective experience of more than 2,500 cases from a single centre. *J Clin Pathol* **58**, 1305-1310.
- Anderson, M.K.** (2006) At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol Rev* **209**, 191-211.
- Arai, A., Nosaka, Y., Kanda, E., Yamamoto, K., Miyasaka, N. & Miura, O.** (2001) Rap1 is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in regulation of beta1 integrin-mediated hematopoietic cell adhesion. *J Biol Chem* **276**, 10453-10462.
- Arai, A., Nosaka, Y., Kohsaka, H., Miyasaka, N. & Miura, O.** (1999) CrkL activates integrin-mediated hematopoietic cell adhesion through the guanine nucleotide exchange factor C3G. *Blood* **93**, 3713-3722.
- Arbuzova, A., Schmitz, A.A. & Vergères, G.** (2002) Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J* **362**, 1-12.
- Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A. & Cooper, J.A.** (2004) Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. *Curr Biol* **14**, 606-610.
- Benes, P., Vetvicka, V. & Fusek, M.** (2008) Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* **68**, 12-28.
- Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M. & Vassar, R.** (2000) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem* **275**, 20647-20651.
- Bennett, S. & Curnow, R.N.** (2001) Consanguinity and the transmission/disequilibrium test for allelic association. *Genet Epidemiol* **21**, 68-77.
- Berchem, G., Glondu, M., Gleizes, M., Brouillet, J.P., Vignon, F., Garcia, M. & Liudet-Coopman, E.** (2002) Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* **21**, 5951-5955.
- Berkovic, S.F., Carpenter, S., Andermann, F., Andermann, E. & Wolfe, L.S.** (1988) Kufs' disease: a critical reappraisal. *Brain* **111** (Pt 1), 27-62.
- Bessa, C., Teixeira, C.A., Mangas, M., Dias, A., Sa Miranda, M.C., Guimaraes, A., Ferreira, J.C., Canas, N., Cabral, P. & Ribeiro, M.G.** (2006) Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency. *Mol Genet Metab* **89**, 245-253.
- Bielas, S.L., Serneo, F.F., Chechlacz, M., Deerinck, T.J., Perkins, G.A., Allen, P.B., Ellisman, M.H. & Gleeson, J.G.** (2007) Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* **129**, 579-591.
- Boschert, U., Muda, M., Camps, M., Dickinson, R. & Arkinstall, S.** (1997) Induction of the dual specificity phosphatase PAC1 in rat brain following seizure activity. *Neuroreport* **8**, 3077-3080.
- Brandt, S. & Jentsch, T.J.** (1995) CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Lett* **377**, 15-20.
- Burnett, P.E., Blackshaw, S., Lai, M.M., Qureshi, I.A., Burnett, A.F., Sabatini, D.M. & Snyder, S.H.** (1998) Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8351-8356.

- Cannelli, N., Nardocci, N., Cassandrini, D., Morbin, M., Aiello, C., Bugiani, M., Criscuolo, L., Zara, F., Striano, P., Granata, T., Bertini, E., Simonati, A. & Santorelli, F.M.** (2007) Revelation of a novel CLN5 mutation in early juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neuropediatrics* **38**, 46-49.
- Cao, Y., Espinola, J.A., Fossale, E., Massey, A.C., Cuervo, A.M., MacDonald, M.E. & Cotman, S.L.** (2006) Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* **281**, 20483-20493.
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C. & Wolf, D.E.** (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8790-8794.
- Causeret, F., Jacobs, T., Terao, M., Heath, O., Hoshino, M. & Nikolić, M.** (2007) Neurabin-I is phosphorylated by Cdk5: implications for neuronal morphogenesis and cortical migration. *Mol Biol Cell* **18**, 4327-4342.
- Chan, C.H., Mitchison, H.M. & Pearce, D.A.** (2008) Transcript and in silico analysis of CLN3 in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis and associated mouse models. *Hum Mol Genet* **17**, 3332-3339.
- Chattopadhyay, S., Ito, M., Cooper, J.D., Brooks, A.I., Curran, T.M., Powers, J.M. & Pearce, D.A.** (2002) An autoantibody inhibitory to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Hum Mol Genet* **11**, 1421-1431.
- Chen, X., Lan, X., Mo, S., Qin, J., Li, W., Liu, P., Han, Y. & Pi, R.** (2009) p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **379**, 944-948.
- Ching, K.H., Kisailus, A.E. & Burbelo, P.D.** (2007) Biochemical characterization of distinct regions of SPEC molecules and their role in phagocytosis. *Exp Cell Res* **313**, 10-21.
- Chu, Y., Solski, P.A., Khosravi-Far, R., Der, C.J. & Kelly, K.** (1996) The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* **271**, 6497-6501.
- Claussen, M., Heim, P., Knispel, J., Goebel, H.H. & Kohlschütter, A.** (1992) Incidence of neuronal ceroid-lipofuscinoses in West Germany: variation of a method for studying autosomal recessive disorders. *Am J Med Genet* **42**, 536-538.
- Cotman, S.L., Vrbanc, V., Lebel, L.A., Lee, R.L., Johnson, K.A., Donahue, L.R., Teed, A.M., Antonellis, K., Bronson, R.T., Lerner, T.J. & MacDonald, M.E.** (2002) Cln3(Deltaex7/8) knock-in mice with the common JNCL mutation exhibit progressive neurologic disease that begins before birth. *Hum Mol Genet* **11**, 2709-2721.
- D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I. & Curran, T.** (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**, 719-723.
- Dipple, K.M. & McCabe, E.R.** (2000) Modifier genes convert "simple" Mendelian disorders to complex traits. *Mol Genet Metab* **71**, 43-50.
- Dyken, P.R.** (1989) The neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Child Neurol* **4**, 165-174.
- Ezaki, J., Takeda-Ezaki, M., Koike, M., Ohsawa, Y., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., Uchiyama, Y., Ueno, T. & Kominami, E.** (2003) Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J Neurochem* **87**, 1296-1308.
- Felbor, U., Kessler, B., Mothes, W., Goebel, H.H., Ploegh, H.L., Bronson, R.T. & Olsen, B.R.** (2002) Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7883-7888.
- Feng, J., Yan, Z., Ferreira, A., Tomizawa, K., Liauw, J.A., Zhuo, M., Allen, P.B., Ouimet, C.C. & Greengard, P.** (2000) Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9287-9292.
- Fenteany, G. & Schreiber, S.L.** (1998) Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* **273**, 8545-8548.

- Frattini, A., Pangrazio, A., Susani, L., Sobacchi, C., Mirolo, M., Abinun, M., Andolina, M., Flanagan, A., Horwitz, E.M., Mihci, E., Notarangelo, L.D., Ramenghi, U., Teti, A., Van Hove, J., Vujic, D., Young, T., Albertini, A., Orchard, P.J., Vezzoni, P. & Villa, A.** (2003) Chloride channel CLCN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res* **18**, 1740-1747.
- Fritchie, K., Siintola, E., Armao, D., Lehesjoki, A.E., Marino, T., Powell, C., Tennison, M., Booker, J.M., Koch, S., Partanen, S., Suzuki, K., Tynnelä, J. & Thorne, L.B.** (2009) Novel mutation and the first prenatal screening of cathepsin D deficiency (CLN10). *Acta Neuropathol* **117**, 201-208.
- Gao, H., Boustany, R.M., Espinola, J.A., Cotman, S.L., Srinidhi, L., Antonellis, K.A., Gillis, T., Qin, X., Liu, S., Donahue, L.R., Bronson, R.T., Faust, J.R., Stout, D., Haines, J.L., Lerner, T.J. & MacDonald, M.E.** (2002) Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse. *Am J Hum Genet* **70**, 324-335.
- Gass, P., Kiessling, M. & Bading, H.** (1993) Regionally selective stimulation of mitogen activated protein (MAP) kinase tyrosine phosphorylation after generalized seizures in the rat brain. *Neurosci Lett* **162**, 39-42.
- Gieselmann, V., Hasilik, A. & von Figura, K.** (1985) Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem* **260**, 3215-3220.
- Goebel, H.H. & Wisniewski, K.E.** (2004) Current state of clinical and morphological features in human NCL. *Brain Pathol* **14**, 61-69.
- Guillas, I., Jiang, J.C., Vionnet, C., Roubaty, C., Uldry, D., Chuard, R., Wang, J., Jazwinski, S.M. & Conzelmann, A.** (2003) Human homologues of LAG1 reconstitute Acyl-CoA-dependent ceramide synthesis in yeast. *J Biol Chem* **278**, 37083-37091.
- Gupta, P., Soyombo, A.A., Atashband, A., Wisniewski, K.E., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Hammer, R.E. & Hofmann, S.L.** (2001) Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13566-13571.
- Haltia, M.** (2003) The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**, 1-13.
- Heasman, S.J. & Ridley, A.J.** (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.
- Heine, C., Koch, B., Storch, S., Kohlschütter, A., Palmer, D.N. & Braulke, T.** (2004) Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A. *J Biol Chem* **279**, 22347-22352.
- Heine, C., Quitsch, A., Storch, S., Martin, Y., Lonka, L., Lehesjoki, A.E., Mole, S.E. & Braulke, T.** (2007) Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Mol Membr Biol* **24**, 74-87.
- Hofman, I., Kohlschütter, A. & Santavuori, P.** (1999) In *The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease)*. Amsterdam: IOS Press (Goebel HH, Mole SE, Lake BD, Eds.), pp 55-76.
- Holland, P., Davies, A.M., Morris, E., Fowler, J., Wellings, R. & Tyrrell, P.N.** (1991) Real-time digital contrast enhancement and magnification in the assessment of acute elbow injuries. *Br J Radiol* **64**, 591-595.
- Holmberg, V., Jalanko, A., Isosomppi, J., Fabritius, A.L., Peltonen, L. & Kopra, O.** (2004) The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain. *Neurobiol Dis* **16**, 29-40.
- Holmberg, V., Lauronen, L., Autti, T., Santavuori, P., Savukoski, M., Uvebrant, P., Hofman, I., Peltonen, L. & Järvelä, I.** (2000) Phenotype-genotype correlation in eight patients with Finnish variant late infantile NCL (CLN5). *Neurology* **55**, 579-581.
- Holopainen, J.M., Saarikoski, J., Kinnunen, P.K. & Järvelä, I.** (2001) Elevated lysosomal pH in neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs). *Eur J Biochem* **268**, 5851-5856.

- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C. & Christie, G.** (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* **14**, 419-427.
- Hussain, I., Powell, D.J., Howlett, D.R., Chapman, G.A., Gilmour, L., Murdock, P.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Schneider, K., Ratcliffe, S.J., Tattersall, D., Testa, T.T., Southan, C., Ryan, D.M., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C. & Christie, G.** (2000) ASP1 (BACE2) cleaves the amyloid precursor protein at the beta-secretase site. *Mol Cell Neurosci* **16**, 609-619.
- Isosomppi, J., Vesa, J., Jalanko, A. & Peltonen, L.** (2002) Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. *Hum Mol Genet* **11**, 885-891.
- Jalanko, A. & Braulke, T.** (2009) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 697-709.
- Järplid, B. & Haltia, M.** (1993) An animal model of the infantile type of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *J Inherit Metab Dis* **16**, 274-277.
- Järvelä, I., Autti, T., Lamminranta, S., Aberg, L., Raininko, R. & Santavuori, P.** (1997) Clinical and magnetic resonance imaging findings in Batten disease: analysis of the major mutation (1.02-kb deletion). *Ann Neurol* **42**, 799-802.
- Johnson, D.I.** (1999) Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 54-105.
- Kasho, V.N., Smirnova, I.N. & Kaback, H.R.** (2006) Sequence alignment and homology threading reveals prokaryotic and eukaryotic proteins similar to lactose permease. *J Mol Biol* **358**, 1060-1070.
- Kasper, D., Planells-Cases, R., Fuhrmann, J.C., Scheel, O., Zeitz, O., Ruether, K., Schmitt, A., Poet, M., Steinfeld, R., Schweizer, M., Kornak, U. & Jentsch, T.J.** (2005) Loss of the chloride channel CIC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *Embo J* **24**, 1079-1091.
- Kelker, M.S., Dancheck, B., Ju, T., Kessler, R.P., Hudak, J., Nairn, A.C. & Peti, W.** (2007) Structural basis for spinophilin-neurabin receptor interaction. *Biochemistry* **46**, 2333-2344.
- Kitzmüller, C., Haines, R.L., Codlin, S., Cutler, D.F. & Mole, S.E.** (2008) A function retained by the common mutant CLN3 protein is responsible for the late onset of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet* **17**, 303-312.
- Knudsen, B.S., Feller, S.M. & Hanafusa, H.** (1994) Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *J Biol Chem* **269**, 32781-32787.
- Kohlschütter, A., Gardiner, R.M. & Goebel, H.H.** (1993) Human forms of neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten disease): consensus on diagnostic criteria, Hamburg 1992. *J Inherit Metab Dis* **16**, 241-244.
- Kohlschütter, A., Goebel, H.H., Schulz, A. & Lukacs, Z.** (2005) Die neuronalen Ceroid-Lipofuscinosen: Demenzerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen. *Dtsch Arztebl* **102**, A 284-288
- Kohlschütter, A., Laabs, R. & Albani, M.** (1988) Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (JNCL): quantitative description of its clinical variability. *Acta Paediatr Scand* **77**, 867-872.
- Kohlschütter, A. & Schulz, A.** (2009) Towards understanding the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Brain Dev* doi:10.1016/j.braindev.2008.12.008.
- Kollmann, K., Mutenda, K.E., Balleininger, M., Eckermann, E., von Figura, K., Schmidt, B. & Lubke, T.** (2005) Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. *Proteomics* **5**, 3966-3978.
- Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G. & Jentsch, T.J.** (2001) Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**, 205-215.
- Kroschewski, R., Hall, A. & Mellman, I.** (1999) Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* **1**, 8-13.

- Kruglyak, L., Daly, M.J., Reeve-Daly, M.P. & Lander, E.S.** (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* **58**, 1347-1363.
- Kyttälä, A., Ihrke, G., Vesa, J., Schell, M.J. & Luzio, J.P.** (2004) Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells. *Mol Biol Cell* **15**, 1313-1323.
- Kyttälä, A., Yliannala, K., Schu, P., Jalanko, A. & Luzio, J.P.** (2005) AP-1 and AP-3 facilitate lysosomal targeting of Batten disease protein CLN3 via its dileucine motif. *J Biol Chem* **280**, 10277-10283.
- Laemmli, U.K., Beguin, F. & Gujer-Kellenberger, G.** (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* **47**, 69-85.
- Lang, A.H., Hirvasniemi, A. & Siivola, J.** (1997) Neurophysiological findings in the northern epilepsy syndrome. *Acta Neurol Scand* **95**, 1-8.
- Learish, R.D., Bruss, M.D. & Haak-Frendscho, M.** (2000) Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks proliferation of neural progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res* **122**, 97-109.
- Lebrun, A.H., Storch, S., Rüschemdorf, F., Schmiedt, M.L., Kyttälä, A., Mole, S.E., Kitzmüller, C., Saar, K., Mewasingh, L.D., Boda, V., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T. & Schulz, A.** (2009) Retention of lysosomal protein CLN5 in the endoplasmic reticulum causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Asian sibship. *Hum Mutat* **30**, E651-661.
- Lim, M.J., Beake, J., Bible, E., Curran, T.M., Ramirez-Montealegre, D., Pearce, D.A. & Cooper, J.D.** (2006) Distinct patterns of serum immunoreactivity as evidence for multiple brain-directed autoantibodies in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* **32**, 469-482.
- Liu, K., Doms, R.W. & Lee, V.M.** (2002) Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A beta production upon BACE overexpression. *Biochemistry* **41**, 3128-3136.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lonka, L., Kyttälä, A., Ranta, S., Jalanko, A. & Lehesjoki, A.E.** (2000) The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet* **9**, 1691-1697.
- Lonka, L., Salonen, T., Siintola, E., Kopra, O., Lehesjoki, A.E. & Jalanko, A.** (2004) Localization of wild-type and mutant neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 proteins in non-neuronal and neuronal cells. *J Neurosci Res* **76**, 862-871.
- Luiro, K., Yliannala, K., Ahtiainen, L., Maunu, H., Jarvela, I., Kyttälä, A. & Jalanko, A.** (2004) Interconnections of CLN3, Hook1 and Rab proteins link Batten disease to defects in the endocytic pathway. *Hum Mol Genet* **13**, 3017-3027.
- Lukacs, Z., Santavuori, P., Keil, A., Steinfeld, R. & Kohlschütter, A.** (2003) Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots. *Clin Chem* **49**, 509-511.
- MacMillan, L.B., Bass, M.A., Cheng, N., Howard, E.F., Tamura, M., Strack, S., Wadzinski, B.E. & Colbran, R.J.** (1999) Brain actin-associated protein phosphatase 1 holoenzymes containing spinophilin, neurabin, and selected catalytic subunit isoforms. *J Biol Chem* **274**, 35845-35854.
- Mann, D.M.** (1989) Cerebral amyloidosis, ageing and Alzheimer's disease; a contribution from studies on Down's syndrome. *Neurobiol Aging* **10**, 397-399; discussion 412-394.
- Mayeux, R.** (2005) Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* **115**, 1404-1407.
- McAvoy, T., Allen, P.B., Obaishi, H., Nakanishi, H., Takai, Y., Greengard, P., Nairn, A.C. & Hemmings, H.C., Jr.** (1999) Regulation of neurabin I interaction with protein phosphatase 1 by phosphorylation. *Biochemistry* **38**, 12943-12949.
- Meyer, G. & Feldman, E.L.** (2002) Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J Neurochem* **83**, 490-503.

- Millat, G., Froissart, R., Maire, I. & Bozon, D.** (1997) Characterization of iduronate sulphatase mutants affecting N-glycosylation sites and the cysteine-84 residue. *Biochem J* **326** (Pt 1), 243-247.
- Mitchison, H.M., Bernard, D.J., Greene, N.D., Cooper, J.D., Junaid, M.A., Pullarkat, R.K., de Vos, N., Breuning, M.H., Owens, J.W., Mobley, W.C., Gardiner, R.M., Lake, B.D., Taschner, P.E. & Nussbaum, R.L.** (1999) Targeted disruption of the *Cln3* gene provides a mouse model for Batten disease. The Batten Mouse Model Consortium [corrected]. *Neurobiol Dis* **6**, 321-334.
- Mitchison, H.M., Hofmann, S.L., Becerra, C.H., Munroe, P.B., Lake, B.D., Crow, Y.J., Stephenson, J.B., Williams, R.E., Hofman, I.L., Taschner, P.E., Martin, J.J., Philippart, M., Andermann, E., Andermann, F., Mole, S.E., Gardiner, R.M. & O'Rawe, A.M.** (1998) Mutations in the palmitoyl-protein thioesterase gene (*PPT*; *CLN1*) causing juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis with granular osmiophilic deposits. *Hum Mol Genet* **7**, 291-297.
- Mole, S.E., Michaux, G., Codlin, S., Wheeler, R.B., Sharp, J.D. & Cutler, D.F.** (2004) *CLN6*, which is associated with a lysosomal storage disease, is an endoplasmic reticulum protein. *Exp Cell Res* **298**, 399-406.
- Mole, S.E., Williams, R.E. & Goebel, H.H.** (2005) Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics* **6**, 107-126.
- Moss, C.X., Villadangos, J.A. & Watts, C.** (2005) Destructive potential of the aspartyl protease cathepsin D in MHC class II-restricted antigen processing. *Eur J Immunol* **35**, 3442-3451.
- Munroe, P.B., Mitchison, H.M., O'Rawe, A.M., Anderson, J.W., Boustany, R.M., Lerner, T.J., Taschner, P.E., de Vos, N., Breuning, M.H., Gardiner, R.M. & Mole, S.E.** (1997) Spectrum of mutations in the Batten disease gene, *CLN3*. *Am J Hum Genet* **61**, 310-316.
- Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A. & Takai, Y.** (1997) Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J Cell Biol* **139**, 951-961.
- Narayan, S.B., Rakheja, D., Tan, L., Pastor, J.V. & Bennett, M.J.** (2006) *CLN3P*, the Batten's disease protein, is a novel palmitoyl-protein Delta-9 desaturase. *Ann Neurol* **60**, 570-577.
- Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B.J., Maki, K., Miyazaki, J. & Matsuda, M.** (2001) Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *Embo J* **20**, 3333-3341.
- Oliver, C.J., Terry-Lorenzo, R.T., Elliott, E., Bloomer, W.A., Li, S., Brautigan, D.L., Colbran, R.J. & Shenolikar, S.** (2002) Targeting protein phosphatase 1 (PP1) to the actin cytoskeleton: the neurabin I/PP1 complex regulates cell morphology. *Mol Cell Biol* **22**, 4690-4701.
- Palmer, D.N., Fearnley, I.M., Walker, J.E., Hall, N.A., Lake, B.D., Wolfe, L.S., Haltia, M., Martinus, R.D. & Jolly, R.D.** (1992) Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Med Genet* **42**, 561-567.
- Partanen, S., Storch, S., Loffler, H.G., Hasilik, A., Tyynelä, J. & Braulke, T.** (2003) A replacement of the active-site aspartic acid residue 293 in mouse cathepsin D affects its intracellular stability, processing and transport in HEK-293 cells. *Biochem J* **369**, 55-62.
- Pearce, D.A. & Sherman, F.** (1998) A yeast model for the study of Batten disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6915-6918.
- Petronis, A.** (1999) Alzheimer's disease and down syndrome: from meiosis to dementia. *Exp Neurol* **158**, 403-413.
- Pineda-Trujillo, N., Cornejo, W., Carrizosa, J., Wheeler, R.B., Munera, S., Valencia, A., Agudelo-Arango, J., Cogollo, A., Anderson, G., Bedoya, G., Mole, S.E. & Ruiz-Linares, A.** (2005) A *CLN5* mutation causing an atypical neuronal ceroid lipofuscinosis of juvenile onset. *Neurology* **64**, 740-742.
- Pirone, D.M., Fukuhara, S., Gutkind, J.S. & Burbelo, P.D.** (2000) *SPECs*, small binding proteins for *Cdc42*. *J Biol Chem* **275**, 22650-22656.

- Poët, M., Kornak, U., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Scheel, O., Hoelter, S., Wurst, W., Schmitt, A., Fuhrmann, J.C., Planells-Cases, R., Mole, S.E., Hübner, C.A. & Jentsch, T.J.** (2006) Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CIC-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13854-13859.
- Pohl, S., Mitchison, H.M., Kohlschütter, A., van Diggelen, O., Braulke, T. & Storch, S.** (2007) Increased expression of lysosomal acid phosphatase in CLN3-defective cells and mouse brain tissue. *J Neurochem* **103**, 2177-2188.
- Pontikis, C.C., Cotman, S.L., MacDonald, M.E. & Cooper, J.D.** (2005) Thalamocortical neuron loss and localized astrocytosis in the Cln3Deltaex7/8 knock-in mouse model of Batten disease. *Neurobiol Dis* **20**, 823-836.
- Puranam, K.L., Guo, W.X., Qian, W.H., Nikbakht, K. & Boustany, R.M.** (1999) CLN3 defines a novel antiapoptotic pathway operative in neurodegeneration and mediated by ceramide. *Mol Genet Metab* **66**, 294-308.
- Rajan, P. & McKay, R.D.** (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**, 3620-3629.
- Ramirez-Montealegre, D. & Pearce, D.A.** (2005) Defective lysosomal arginine transport in juvenile Batten disease. *Hum Mol Genet* **14**, 3759-3773.
- Ranta, S. & Lehesjoki, A.E.** (2000) Northern epilepsy, a new member of the NCL family. *Neurol Sci* **21**, S43-47.
- Ranta, S., Savukoski, M., Santavuori, P. & Haltia, M.** (2001) Studies of homogenous populations: CLN5 and CLN8. *Adv Genet* **45**, 123-140.
- Ranta, S., Topcu, M., Tegelberg, S., Tan, H., Ustubutun, A., Saatci, I., Dufke, A., Enders, H., Pohl, K., Alembik, Y., Mitchell, W.A., Mole, S.E. & Lehesjoki, A.E.** (2004) Variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis in a subset of Turkish patients is allelic to Northern epilepsy. *Hum Mutat* **23**, 300-305.
- Ranta, S., Zhang, Y., Ross, B., Lonka, L., Takkunen, E., Messer, A., Sharp, J., Wheeler, R., Kusumi, K., Mole, S., Liu, W., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Hirvasniemi, A., de la Chapelle, A., Gilliam, T.C. & Lehesjoki, A.E.** (1999) The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and mnd mutant mice are associated with mutations in CLN8. *Nat Genet* **23**, 233-236.
- Rincon, S., Coll, P.M. & Perez, P.** (2007) Spatial regulation of Cdc42 during cytokinesis. *Cell Cycle* **6**, 1687-1691.
- Rüschendorf, F. & Nürnberg, P.** (2005) ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics* **21**, 2123-2125.
- Ryan, X.P., Alldritt, J., Svenningsson, P., Allen, P.B., Wu, G.Y., Nairn, A.C. & Greengard, P.** (2005) The Rho-specific GEF Lfc interacts with neurabin and spinophilin to regulate dendritic spine morphology. *Neuron* **47**, 85-100.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Santavuori, P., Rapola, J., Nuutila, A., Raininko, R., Lappi, M., Launes, J., Herva, R. & Sainio, K.** (1991) The spectrum of Jansky-Bielschowsky disease. *Neuropediatrics* **22**, 92-96.
- Santavuori, P., Rapola, J., Sainio, K. & Raitta, C.** (1982) A variant of Jansky-Bielschowsky disease. *Neuropediatrics* **13**, 135-141.
- Saras, J. & Heldin, C.H.** (1996) PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* **21**, 455-458.
- Satoh, A., Nakanishi, H., Obaishi, H., Wada, M., Takahashi, K., Satoh, K., Hirao, K., Nishioka, H., Hata, Y., Mizoguchi, A. & Takai, Y.** (1998) Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J Biol Chem* **273**, 3470-3475.

- Savukoski, M., Klockars, T., Holmberg, V., Santavuori, P., Lander, E.S. & Peltonen, L.** (1998) CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nat Genet* **19**, 286-288.
- Scheel, O., Zdebik, A.A., Lourdel, S. & Jentsch, T.J.** (2005) Voltage-dependent electrogenic chloride/proton exchange by endosomal CLC proteins. *Nature* **436**, 424-427.
- Schmidlin, H., Diehl, S.A., Nagasawa, M., Scheeren, F.A., Schotte, R., Uittenbogaart, C.H., Spits, H. & Blom, B.** (2008) Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. *Blood* **112**, 1804-1812.
- Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H. & Blom, B.** (2004) The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med* **200**, 1503-1509.
- Schulz, A., Dhar, S., Rylova, S., Dbaibo, G., Alroy, J., Hagel, C., Artacho, I., Kohlschütter, A., Lin, S. & Boustany, R.M.** (2004) Impaired cell adhesion and apoptosis in a novel CLN9 Batten disease variant. *Ann Neurol* **56**, 342-350.
- Schulz, A., Mousallem, T., Venkataramani, M., Persaud-Sawin, D.A., Zucker, A., Luberto, C., Bielawska, A., Bielawski, J., Holthuis, J.C., Jazwinski, S.M., Kozhaya, L., Dbaibo, G.S. & Boustany, R.M.** (2006) The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase. *J Biol Chem* **281**, 2784-2794.
- Sharp, J.D., Wheeler, R.B., Parker, K.A., Gardiner, R.M., Williams, R.E. & Mole, S.E.** (2003) Spectrum of CLN6 mutations in variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mutat* **22**, 35-42.
- Siintola, E., Lehesjoki, A.E. & Mole, S.E.** (2006a) Molecular genetics of the NCLs -- status and perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 857-864.
- Siintola, E., Partanen, S., Stromme, P., Haapanen, A., Haltia, M., Maehlen, J., Lehesjoki, A.E. & Tyynelä, J.** (2006b) Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* **129**, 1438-1445.
- Siintola, E., Topcu, M., Aula, N., Lohi, H., Minassian, B.A., Paterson, A.D., Liu, X.Q., Wilson, C., Lahtinen, U., Anttonen, A.K. & Lehesjoki, A.E.** (2007) The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *Am J Hum Genet* **81**, 136-146.
- Siintola, E., Topcu, M., Kohlschütter, A., Salonen, T., Joensuu, T., Anttonen, A.K. & Lehesjoki, A.E.** (2005) Two novel CLN6 mutations in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis patients of Turkish origin. *Clin Genet* **68**, 167-173.
- Sleat, D.E., Wang, Y., Sohar, I., Lackland, H., Li, Y., Li, H., Zheng, H. & Lobel, P.** (2006) Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics* **5**, 1942-1956.
- Sleat, D.E., Wiseman, J.A., El-Banna, M., Price, S.M., Verot, L., Shen, M.M., Tint, G.S., Vanier, M.T., Walkley, S.U. & Lobel, P.** (2004) Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5886-5891.
- Steiner, H. & Haass, C.** (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 217-224.
- Steinfeld, R., Reinhardt, K., Schreiber, K., Hillebrand, M., Kraetzner, R., Bruck, W., Saftig, P. & Gartner, J.** (2006) Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. *Am J Hum Genet* **78**, 988-998.
- Stephens, D.J. & Banting, G.** (1999) Direct interaction of the trans-Golgi network membrane protein, TGN38, with the F-actin binding protein, neurabin. *J Biol Chem* **274**, 30080-30086.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., Bösl, M.R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R. & Jentsch, T.J.** (2001) Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **29**, 185-196.
- Storch, S., Pohl, S. & Braulke, T.** (2004) A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmic domain of the batten disease-related CLN3 protein are required for efficient lysosomal targeting. *J Biol Chem* **279**, 53625-53634.

- Storch, S., Pohl, S., Quitsch, A., Falley, K. & Braulke, T.** (2007) C-terminal prenylation of the CLN3 membrane glycoprotein is required for efficient endosomal sorting to lysosomes. *Traffic* **8**, 431-444.
- Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K. & et al.** (1994) C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3443-3447.
- Tang, C.H., Lee, J.W., Galvez, M.G., Robillard, L., Mole, S.E. & Chapman, H.A.** (2006) Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Mol Cell Biol* **26**, 2309-2316.
- Taschner, P.E., de Vos, N. & Breuning, M.H.** (1997) Cross-species homology of the CLN3 gene. *Neuropediatrics* **28**, 18-20.
- Teixeira, C.A., Espinola, J., Huo, L., Kohlschütter, J., Persaud Sawin, D.A., Minassian, B., Bessa, C.J., Guimaraes, A., Stephan, D.A., Sa Miranda, M.C., MacDonald, M.E., Ribeiro, M.G. & Boustany, R.M.** (2003) Novel mutations in the CLN6 gene causing a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mutat* **21**, 502-508.
- Terry-Lorenzo, R.T., Roadcap, D.W., Otsuka, T., Blanpied, T.A., Zamorano, P.L., Garner, C.C., Shenolikar, S. & Ehlers, M.D.** (2005) Neurabin/protein phosphatase-1 complex regulates dendritic spine morphogenesis and maturation. *Mol Biol Cell* **16**, 2349-2362.
- Tessitore, A., del P.M.M., Sano, R., Ma, Y., Mann, L., Ingrassia, A., Laywell, E.D., Steindler, D.A., Hendershot, L.M. & d'Azzo, A.** (2004) GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Mol Cell* **15**, 753-766.
- The International Batten Disease Consortium** (1995) Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. *Cell* **82**, 949-957.
- Topcu, M., Tan, H., Yalnizoglu, D., Usubutun, A., Saatci, I., Aynaci, M., Anlar, B., Topaloglu, H., Turanli, G., Kose, G. & Aysun, S.** (2004) Evaluation of 36 patients from Turkey with neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical, neurophysiological, neuroradiological and histopathologic studies. *Turk J Pediatr* **46**, 1-10.
- Tyynelä, J., Palmer, D.N., Baumann, M. & Haltia, M.** (1993) Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *FEBS Lett* **330**, 8-12.
- Uemura, N. & Griffin, J.D.** (1999) The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration. *J Biol Chem* **274**, 37525-37532.
- van Diggelen, O.P., Thobois, S., Tilikete, C., Zobot, M.T., Keulemans, J.L., van Bunderen, P.A., Taschner, P.E., Losekoot, M. & Voznyi, Y.V.** (2001) Adult neuronal ceroid lipofuscinosis with palmitoyl-protein thioesterase deficiency: first adult-onset patients of a childhood disease. *Ann Neurol* **50**, 269-272.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. & Citron, M.** (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-741.
- Vesa, J., Chin, M.H., Oelgeschäger, K., Isosomppi, J., DellAngelica, E.C., Jalanko, A. & Peltonen, L.** (2002) Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol Biol Cell* **13**, 2410-2420.
- Vesa, J., Hellsten, E., Verkruyse, L.A., Camp, L.A., Rapola, J., Santavuori, P., Hofmann, S.L. & Peltonen, L.** (1995) Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* **376**, 584-587.
- Voss, A.K., Britto, J.M., Dixon, M.P., Sheikh, B.N., Collin, C., Tan, S.S. & Thomas, T.** (2008) C3G regulates cortical neuron migration, preplate splitting and radial glial cell attachment. *Development* **135**, 2139-2149.
- Voss, A.K., Gruss, P. & Thomas, T.** (2003) The guanine nucleotide exchange factor C3G is necessary for the formation of focal adhesions and vascular maturation. *Development* **130**, 355-367.

- Waguespack, S.G., Hui, S.L., Dimeglio, L.A. & Econs, M.J.** (2007) Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 771-778.
- Ward, Y., Gupta, S., Jensen, P., Wartmann, M., Davis, R.J. & Kelly, K.** (1994) Control of MAP kinase activation by the mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. *Nature* **367**, 651-654.
- Wei, H., Kim, S.J., Zhang, Z., Tsai, P.C., Wisniewski, K.E. & Mukherjee, A.B.** (2008) ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum Mol Genet* **17**, 469-477.
- Weimer, J.M., Custer, A.W., Benedict, J.W., Alexander, N.A., Kingsley, E., Federoff, H.J., Cooper, J.D. & Pearce, D.A.** (2006) Visual deficits in a mouse model of Batten disease are the result of optic nerve degeneration and loss of dorsal lateral geniculate thalamic neurons. *Neurobiol Dis* **22**, 284-293.
- Wheeler, R.B., Sharp, J.D., Schultz, R.A., Joslin, J.M., Williams, R.E. & Mole, S.E.** (2002) The gene mutated in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6) and in nclf mutant mice encodes a novel predicted transmembrane protein. *Am J Hum Genet* **70**, 537-542.
- Winter, E. & Ponting, C.P.** (2002) TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains? *Trends Biochem Sci* **27**, 381-383.
- Wisniewski, K.E. & Zhong, N.** (2001) Batten Disease: Diagnosis, Treatment and Research. *Academic Press, San Diego*, pp. 1-243.
- Wu, L.J., Ren, M., Wang, H., Kim, S.S., Cao, X. & Zhuo, M.** (2008) Neurabin contributes to hippocampal long-term potentiation and contextual fear memory. *PLoS ONE* **3**, e1407.
- Yan, R., Munzner, J.B., Shuck, M.E. & Bienkowski, M.J.** (2001) BACE2 functions as an alternative alpha-secretase in cells. *J Biol Chem* **276**, 34019-34027.
- Yan, Z., Hsieh-Wilson, L., Feng, J., Tomizawa, K., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Nairn, A.C. & Greengard, P.** (1999) Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat Neurosci* **2**, 13-17.
- Yoshikawa, M., Uchida, S., Ezaki, J., Rai, T., Hayama, A., Kobayashi, K., Kida, Y., Noda, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Marumo, F., Kominami, E. & Sasaki, S.** (2002) CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells* **7**, 597-605.
- Zhang, Z., Lee, Y.C., Kim, S.J., Choi, M.S., Tsai, P.C., Xu, Y., Xiao, Y.J., Zhang, P., Heffer, A. & Mukherjee, A.B.** (2006) Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency mediates the activation of the unfolded protein response and neuronal apoptosis in INCL. *Hum Mol Genet* **15**, 337-346.

8 PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE

Publikation

Lebrun, A.H., Storch, S., Rüschemdorf, F., Schmiedt, M.L., Kyttälä, A., Mole, S.E., Kitzmüller, C., Saar, K., Mewasingh, L.D., Boda, V., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T. & Schulz, A. (2009) Retention of lysosomal protein CLN5 in the endoplasmic reticulum causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Asian sibship. *Hum Mutat* **30**, E651-661.

Tagungsbeiträge

Lebrun, A.H., Storch, S., Kyttälä, A., Mole, S.E., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T. & Schulz, A. (Februar 2009). Retention of Lysosomal Protein CLN5 in the Endoplasmic Reticulum Causes Neuronal Ceroid Lipofuscinosis in Asian Sibship (Vortrag). *World Symposium on Lysosomal Storage Diseases in San Diego, USA*.

Lebrun, A.H., Storch, S., Kyttälä, A., Mole, S.E., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T. & Schulz, A. (Februar 2009). Retention of Lysosomal Protein CLN5 in the Endoplasmic Reticulum Causes Neuronal Ceroid Lipofuscinosis in Asian Sibship (Vortrag). *Pädiatrische Forschungstagung in Göttingen*.

Lebrun, A.H., Storch, S., Kyttälä, A., Mole, S.E., Kohlschütter, A., Kruse, B., Ullrich, K., Braulke, T. & Schulz, A. (April 2009). Retention of Lysosomal Protein CLN5 in the Endoplasmic Reticulum Causes Neuronal Ceroid Lipofuscinosis in Asian Sibship (Poster). *35. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie in Graz, Österreich*.

Lebrun, A.H., Storch, S., Rüschemdorf, F., Schmiedt, M.L., Kyttälä, A., Mole, S.E., Kitzmüller, C., Saar, K., Mewasingh, L.D., Boda, V., Kohlschütter, A., Ullrich, K., Braulke, T. & Schulz, A. (Juni 2009) Retention of lysosomal protein CLN5 in the endoplasmic reticulum causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Asian sibship (Poster). *12th International Congress on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCL) in Hamburg*.

Lebrun, A.H., Storch, S., Pohl, S., Khosrawi, P., Braulke, T., Streichert, A., Kohlschütter, A. & Schulz, A. (Juni 2009) Identification of modifier genes which influence the clinical course of CLN3 disease (Vortrag). *12th International Congress on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCL) in Hamburg*.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bedanken,

bei Dr. Angela Schulz für ihre Betreuung, Zeit, Geduld und Unterstützung.

bei Prof. Dr. Thomas Braulke für die Betreuung und zahlreichen Ideen.

bei Dr. Dirk Warnecke für die Begutachtung dieser Arbeit.

bei Prof. Dr. Alfried Kohlschütter für seine Unterstützung, Vertrauen und motivierenden Worte.

bei Dr. Katrin Saar und Dr. Franz Rüschenndorf für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung des *gene mappings* in Berlin.

bei Sabine Schnau und Nächstenliebe e.V. für einen Teil der finanziellen Unterstützung.

bei den Patienten und ihren Familien für die Bereitschaft der Forschung zu helfen.

bei den gesamten Laborleuten für die gute Zusammenarbeit und besonders für ihre Geduld, Hilfe und Ratschläge Inke, Stephan, Britta, Sandra, Chris, Katrin M., Annika, Giovanna, Stephanie und Marisa.

bei meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung und Anwesenheit trotz Entfernung.

ganz besonderes bei Betty, Janine, Klaus, Nizam, Patrick, Piri, Ralf und Vinciane, die mich mit ihren Gesprächen und Ablenkungen immer aufmuntern konnten.

und zum Schluss bei Morgan für seine Geduld und vor allem seine Anwesenheit.