

**Untersuchung zur Pathogenese der Neuronalen Ceroid
Lipofuszinosen am Menschen und an den Tiermodellen
Ovis aries (LINNEAUS 1758) und *Mus musculus*
(LINNEAUS 1758): CLN6 und Cathepsin D-Defizienz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt von
Claudia Heine
aus Stadthagen

beim Fachbereich Biologie
der
Universität Hamburg

Hamburg 2003

Gutachter: Prof. Dr. Braulke
Prof. Dr. Schäfer

Tag der mündlichen Prüfung/Disputation: 04.04.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Synthese und Transport lysosomaler Proteine.....	5
1.2	Lysosomale Speichererkrankungen.....	8
1.3	Neuronale Ceroid Lipofuszinosen.....	9
1.3.1	Spät infantile Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinose: CLN6.....	14
1.3.2	Cathepsin D-Defizienz.....	16
2	Zielsetzung.....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Material.....	20
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	20
3.1.2	Radioaktive Substanzen.....	21
3.1.3	Geräte.....	21
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.5	Kits.....	23
3.1.6	Plasmide und DNA-Standards.....	23
3.1.7	Enzyme und Nukleotide.....	24
3.1.8	Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards.....	24
3.1.9	Bakterienstamm.....	24
3.1.10	Patienten, Tiermodelle und Zellen.....	25
3.1.11	Puffer, Medien und Lösungen.....	26
3.1.11.1	Medien zur Aufzucht von Bakterien.....	26
3.1.11.2	Zellkulturlösungen.....	26
3.1.12	Antikörper.....	27
3.1.12.1	Primärantikörper.....	27
3.1.12.2	Sekundärantikörper.....	28
3.2	Methoden.....	29
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.1.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	29
3.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	29
3.2.1.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	29
3.2.1.4	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	29
3.2.1.4.1	Transformation chemokompetenter Zellen.....	29
3.2.1.4.2	Anlegen einer Glycerolkultur.....	30
3.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	30
3.2.1.5.1	Schnelle Isolierung kleiner Mengen.....	30
3.2.1.5.2	Isolierung größerer Mengen.....	31
3.2.1.5.3	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung.....	31
3.2.1.6	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	31
3.2.1.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	32
3.2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
3.2.1.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	33
3.2.1.10	RNA-Isolation.....	33
3.2.1.10.1	RNA aus kultivierten Zellen.....	33
3.2.1.10.2	RNA aus Gewebe.....	33
3.2.1.11	Real time PCR.....	34
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	35
3.2.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	35
3.2.2.2	Trypsinieren von Zellen.....	35
3.2.2.3	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen.....	35
3.2.2.4	Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen.....	36
3.2.2.5	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse.....	36
3.2.2.6	Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]-Methionin.....	37
3.2.2.7	Immunpräzipitation von Cathepsin D.....	37
3.2.2.8	Immunpräzipitation von myc-getagtem CLN6.....	38
3.2.3	Biochemische Methoden.....	38
3.2.3.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	38
3.2.3.2	Bestimmung der Lipidoxidation.....	38
3.2.3.3	Färbung von Proteinen.....	38

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.3.1	Anfärbung mit Coomassie-Blue.....	38
3.2.3.3.2	Silberfärbung	38
3.2.3.3.3	Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie.....	39
3.2.3.4	Messung von Enzymaktivitäten.....	39
3.2.3.4.1	Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität	39
3.2.3.4.2	Messung der MnSOD-Aktivität	39
3.2.3.5	Westernblotanalyse.....	40
3.2.3.6	$[\alpha^{32}\text{P}]$ -GTP-Overlay-Blot	41
3.2.3.7	$[\text{}^{125}\text{J}]$ -Arylsulfatase A-Overlay	41
3.2.3.8	Subzelluläre Fraktionierung	42
3.2.3.8.1	Mitochondrien/Lysosomen-Fraktionen	42
3.2.3.8.2	Fraktionierung mittels Saccharosegradienten.....	42
3.2.3.8.3	Herstellung von Gehirngewebehomogenaten und Isolierung des Speichermaterials.....	43
3.2.3.8.4	Herstellung von Membranfraktionen und Trypsin- Verdau aus transfizierten BHK-Zellen	44
3.2.3.9	Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese.....	44
3.2.3.10	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen.....	45
3.2.3.11	Immunhistochemie.....	45
3.2.3.12	Jodierung von Arylsulfatase A.....	46
3.2.3.13	$[\text{}^{125}\text{J}]$ -Arylsulfatase A-Endozytoseassay	47
3.2.3.14	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	47
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese	49
4.2	Proteinanalyse von kultivierten CLN6-Fibroblasten und Geweben.....	52
4.2.1	Vergleich der Proteinmuster von Kontrollen und CLN6/OCL6-Fraktionen.....	52
4.2.2	Charakterisierung der Erhöhung des MnSOD	60
4.2.3	Lokalisation von MnSOD in Gehirngewebe und Fibroblasten	63
4.2.4	Weitere veränderte Proteine in CLN6-Fibroblasten	69
4.2.5	Funktionelle Analyse der Lysosomen in OCL6- Fibroblasten.....	70
4.2.6	Expression des CLN6-Genproduktes	74
4.3	Cathepsin D-Defizienz, eine neue Form der NCL.....	80
4.3.1	Biochemische Charakterisierung subzellulärer Fraktionen aus Gehirnen Cathepsin D-defizienter Mäuse	80
4.3.2	2D-Elektrophorese von lysosomalen Fraktionen aus Kontroll- und CtsD-defizienten-Mäusen.....	83
5	Diskussion.....	88
5.1	Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie.....	88
5.2	Spät infantile Variante der NCL (CLN6).....	90
5.2.1	Anstieg der MnSOD-Expression	91
5.2.2	α 2-Macroglobulin.....	94
5.2.3	Rolle von CLN6 für die Aufrechterhaltung lysosomaler Funktionen.....	97
5.2.4	CLN6p.....	98
5.3	Cathepsin D-Defizienz, eine neue Form der NCL.....	100
5.3.1	Heterotrimeres G ₂ -Protein	101
5.3.2	Kleine, monomere G-Proteine der Ras-Superfamilie	103
6	Zusammenfassung.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	107
8	Abkürzungsverzeichnis	127
9	ANHANG.....	129
9.1	Primer.....	129
9.2	Bereits vorgestellte Ergebnisse	130

1 EINLEITUNG

1.1 Synthese und Transport lysosomaler Proteine

Lysosomen sind 0,25 – 0,5 µm große, membranumschlossene Zellorganellen, die mit zahlreichen sauren Hydrolasen angefüllt sind und dem Abbau zelleigener und zellfremder Makromoleküle, wie z.B. Proteine, komplexe Kohlenhydratverbindungen, Lipide und Nucleinsäuren, dienen. Diese Verbindungen werden entweder über Endozytose aus dem Extrazellulärraum, über den Biosyntheseweg oder durch Verschmelzung mit Autophagosomen zum Lysosom transportiert und dort in ihre Bausteine zerlegt und wiederverwertet. Innerhalb der Lysosomen herrscht ein saures Milieu, das durch ATP-getriebene Protonenpumpen aufrechterhalten wird und dem pH-Optimum der lysosomalen Enzyme entspricht. Die Funktion der lysosomalen Membranen besteht folglich in der Aufrechterhaltung des pH-Gradienten, dem selektiven Transport von Abbauprodukten ins Zytosol und dem Schutz der luminalen Membranproteindomänen vor Degradation. Neben der Biogenese neuer Lysosomen während der Zellteilung ist eine kontinuierliche Substitution lysosomaler Enzyme und Membranproteine zur Aufrechterhaltung der Integrität bereits bestehender Lysosomen erforderlich (Braulke et al., 1996; Kornfeld & Mellman, 1989).

Die Transportwege und Sortierungsmechanismen löslicher lysosomaler Proteine sind am besten untersucht. Lösliche lysosomale Proteine werden am endoplasmatischen Retikulum (ER) mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die zur Steuerung der Translokation durch die ER-Membran erforderlich ist. Nach Abspaltung der Signalsequenz durch eine Signalpeptidase, werden Dolicholphosphat-aktivierte Oligosaccharide kotranslational auf spezifische Asparaginreste der Sequenz Asn-X-Thr/Ser (X steht für eine beliebige Aminosäure) übertragen. Nach Prozessierung der Oligosaccharidketten werden die lysosomalen Proteine in Transportvesikel abgeschnürt, die mit dem *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparates verschmelzen. Im Golgi erfolgt eine weitere Prozessierung der Oligosaccharidketten vom „high mannose type“ zum komplexen

Typ (Kornfeld & Mellman, 1989; von Figura & Hasilik, 1986). Ein entscheidender Schritt bei der Prozessierung von Zuckerketten löslicher lysosomaler Enzyme ist die Bildung von Phosphomannosyl-Resten an Oligosaccharidketten vom „high mannose type“ (Kornfeld & Mellman 1989).

Die Phosphomannosyl-Reste ermöglichen die Segregation der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme von der sekretorische Route durch Bindung an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) im *trans*-Golgi-Netzwerk (tGN). Die Ligand-Rezeptorkomplexe werden in Clathrin-beschichtete Vesikel verpackt, die nach Verlust der Clathrinhülle mit dem endosomalen Kompartiment fusionieren, wo es aufgrund des sauren pH zur Dissoziation der Ligand-Rezeptor-Komplexe kommt. Die MPR rezirkulieren zum tGN und stehen für neue Transportrunden zur Verfügung (Le Borgne & Hoflack, 1998b), und die M6P-haltigen Enzyme gelangen auf noch unbekannte Weise in die Lysosomen. Ein variabler Teil, ca. 5-20 %, der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme binden nicht im tGN an MPRs und werden sezerniert. Diese inaktiven Enzymvorstufen können über MPRs an der Plasmamembran der gleichen oder benachbarter Zellen gebunden, internalisiert und über den Endozytoseweg den Lysosomen zugeführt werden.

Es sind zwei MPR identifiziert worden, die sich in ihrer molaren Masse von 300 kDa und 46 kDa (MPR300 bzw. MPR46), ihren Liganden, Oligomerisierungsgrad und Signalstrukturen voneinander unterscheiden. MPR300 und MPR46 sind Typ I-Transmembranproteine, wobei die luminalen Domänen die Ligand-Bindungsstelle und die zytoplasmatischen Domänen Signalstrukturen enthalten (Conibear & Pearse, 1994; Dintzis & Pfeffer, 1990; Dintzis et al., 1994), die für den korrekten intrazellulären Transport der MPR notwendig sind. Als Signalstrukturen wurden bisher Dileucin-Motive für die Sortierung zu den Lysosomen (Johnson & Kornfeld, 1992a; Johnson & Kornfeld, 1992b), saure Cluster (Doray et al., 2002), diaromatische Aminosäuresequenzen (Phe18 und Trp19 im MPR46) für das Recycling zum tGN (Schweizer et al., 1997), basische Aminosäuresequenzen (Rohrer et al., 1995) Tyrosin-haltige Motive für Internalisierung und das Recycling (Canfield et al., 1991; Schulze-Garg et al., 1993), Phosphorylierungen (Breuer et al., 1997; Le Borgne et al., 1993) und Palmitoylierungen (Schweizer et al., 1996) identifiziert, die wiederum für Interaktionen mit zytosolischen Proteinen der Adaptorfamilie (AP-1 bis -4) (Storch & Braulke, 2001), „Golgi-localized, γ ear containing, ARF-binding proteins“ (GGAs)

(Robinson & Bonifacino, 2001), TIP35, TIP35M, TIP91M (Rosorius et al., 1993), TIP47 (Diaz & Pfeffer, 1998, Carroll et al., 2001) und PACS-1 (Wan et al., 1998) wichtig sind.

In einigen Zelltypen und Geweben existiert ein Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transportweg zu den Lysosomen (Glickman & Kornfeld, 1993), was durch Untersuchungen an MPR-defizienten Mäusen bestätigt wurde (Dittmer et al., 1999).

Die Mechanismen und Signale, die lysosomale Membranproteine zu ihrem Bestimmungsort bringen, sind weniger gut charakterisiert. Die Untersuchungen werden hauptsächlich an 5 Proteinen durchgeführt, die den Hauptanteil der lysosomalen Membranproteine ausmachen: die lysosomalen assoziierten Membranproteine 1 und 2 (Lamp1 und 2), die lysosomalen integralen Membranproteine 1 und 2 (Limp1 und 2) und die lysosomale saure Phosphatase (LAP). Ein gemeinsames Charakteristikum ist der hohe Glykosylierungsgrad. Lamp1 und 2 sind Typ 1-Transmembranproteine mit einer molaren Masse von etwa 90-120 kDa, die sich stark in ihrer Aminosäuresequenz und Struktur ähneln und 16-18 N-gebundene und 6-10 O-gebundene Kohlenhydratketten in der luminalen Domäne besitzen, die sie möglicherweise vor der intralysosomalen Degradation schützen (Granger et al, 1990). In der zytoplasmatischen Domäne enthalten Lamp1 und 2 ein Tyrosin-haltiges Sortierungssignal, das für den lysosomalen Transport notwendig ist (Guanieri et al., 1993; Höning & Hunziker, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß Lamp1 und 2 nicht wie lösliche lysosomale Proteine über Bindung an MPR in Clathrin-beschichteten Vesikel, sondern in unterschiedlich zusammengesetzten Vesikeln und über eine andere Transportroute in die Lysosomen gelangen (Karlsson & Carlsson, 1998). Limp1 und 2 sind dagegen Typ 3-Transmembranproteine mit einer molaren Masse von 35-55 kDa bzw. 60-85 kDa, die 4 bzw. 2 Transmembrandomänen enthalten. Der Transport von Lamp1, 2 und Limp2 vom tGN zu den Lysosomen ist abhängig von AP-3 (Dell'Angelica et al., 1998; Le Borgne et al., 1998a). Limp2 enthält ein Dileucin-Signal, das den Transport zu den Lysosomen vermittelt (Dell'Angelica et al., 1999; Höning et al., 1998; Le Borgne et al., 1998a). Die LAP ist als Vorläuferprotein ein Typ 1-Transmembranprotein, dessen luminal Domäne jedoch nach Transport zu den Endosomen/Lysosomen abgespalten wird. Bei der entstandenen reifen Form der LAP handelt es sich dann um ein lösliches

lysosomales Protein. Auch das LAP-Vorläuferprotein enthält ein Tyrosin-Motiv, das die korrekte Sortierung der LAP gewährleistet. Es wird angenommen, daß LAP zunächst zur Plasmamembran und von dort über AP-2-abhängige Endozytose in die Lysosomen gelangt (Braun et al., 1989).

1.2 Lysosomale Speichererkrankungen

Der Abbau von Makromolekülen erfolgt sequentiell durch das Zusammenspiel verschiedenster lysosomaler Hydrolasen, die spezifische Aminosäuresequenzen, Zuckerreste (z.B. Mannose oder Fucose) in bestimmten Konformationen (z.B. α - oder β -glykosidisch) oder posttranslationale Modifikationen (z.B. Sulfat-, Phosphatgruppen) spalten. Der genetisch bedingte Ausfall nur eines Enzyms führt dann zur Speicherung von nicht oder nur teilweise abgebautem Material, da auch alle weiteren Abbaureaktionen nicht mehr stattfinden können. Diese Erkrankungen werden dann unter der Bezeichnung lysosomale Speichererkrankungen zusammengefaßt (Gieselmann, 1995).

Die Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen umfaßt mehr als 50 Krankheiten, die zur Zeit nach dem betroffenen Abbauweg und Art der sich anhäufenden Substanzen in Mucopolysaccharidosen, Glykogenosen, Lipidosen und Neuronale Ceroid Lipofuszinosen (NCL) unterteilt werden. Speichererkrankungen, die den Nukleinsäureabbau betreffen, sind noch nicht beschrieben worden.

Lysosomale Speichererkrankungen können theoretisch durch eine Vielzahl genetischer Defekte entstehen, die a) die mRNA-Prozessierung, b) die katalytische Aktivität des Enzyms, c) die Synthese bzw. den frühzeitigen Abbau des Enzyms im ER, d) die fehlende Ausbildung von Mannose-6-Phosphatresten, e) die Aktivatorproteine, f) Defekte im MPR, g) eine ungenügende Azidifizierung im endosomalen Kompartiment und h) Defekte in Proteinen der vesikulären Transportmaschinerie betreffen.

Kürzlich wurde die erste Krankheit, Danon Disease, beschrieben, die sich auf Mutationen (Nishino et al., 2000) bzw. Abwesenheit (Tanaka et al., 2000) des lysosomalen Membranproteins Lamp2 zurückführen läßt. Es kommt zu einer Akkumulation von autophagozytotischen Vakuolen und Speicherung von Glykogen. Die Patienten versterben oft in der zweiten bis dritten Lebensdekade.

Für einige lysosomale Speichererkrankungen konnten Therapiemöglichkeiten entwickelt werden. Für Patienten mit Morbus Gaucher, dem ein Defekt in der β -Glucosidase zugrunde liegt (Beutler, 1997) und für Patienten mit Morbus Fabry (Defizienz der α -Galactosidase A) stehen Enzymersatztherapien zur Verfügung (Schiffmann et al., 2001). Weiterhin werden bei Beteiligung des ZNS Knochenmarktransplantationen als Therapie diskutiert, die sich in einigen Fällen wie z.B. bei der „Krabbe disease“ (Defekt in der β -Galactocerebrosidase) schon als erfolgreich erwiesen haben, obwohl *in vivo*- und *in vitro*-Studien keinen lysosomalen Enzymtransfer von Makrophagen bzw. Mikroglia auf Hirnzellen nachweisen konnten (Muschol et al., 2002; Tsai et al., 1992). Gentherapeutische Ansätze, v.a. für lysosomale Speicherkrankheiten, die auch das ZNS betreffen, befinden sich noch in der experimentellen Entwicklungsphase.

1.3 Neuronale Ceroid Lipofuszinosen

Die Gruppe der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL), auch als „Batten disease“ bezeichnet, stellen die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter dar. Die Gesamthäufigkeit dieser autosomal rezessiv vererbten Erkrankungen liegt bei 1:12.500 Geburten. Der erste klinische Fall der NCL wurde von Stengel schon 1826 beschrieben (Stengel, 1826). Die Bezeichnung Neuronale Ceroid Lipofuszinose wurde aufgrund des vorwiegend in den Neuronen auftretenden Speichermaterials eingeführt. Dabei handelt es sich um histochemisch anfärbbares, autofluoreszierendes Speichermaterial, das Ähnlichkeiten zur Ultrastruktur der Lipopigmente Ceroid und Lipofuszin hat (Zeman & Dyken, 1969). Klinisch zeigen die Patienten eine fortschreitende Neurodegeneration, die zur Gehirnatrophie, Erblindung, Demenz, Krampfanfällen, motorischen Störungen und schließlich zum vorzeitigen Tod führt.

Es wurden verschiedene Formen der NCL entdeckt, die aufgrund des Erkrankungsbeginns, der klinischen Symptome und der Ultrastruktur des Speichermaterials (Fingerprint-Form, curvilinear, granuläre osmiophile Ablagerungen = GRODS) ursprünglich in 4 Haupt- und 6 Untergruppen eingeteilt wurden (Dyken, 1989). Später wurden noch 3 weitere Untergruppen hinzugefügt (Tab. 1).

Tabelle 1: Einteilung der verschiedenen NCL-Formen; verändert nach Boldrini et al., 2001.

NCL-Form	Dynamik	Erkrankungsbeginn	Symptome/Befall	Speicher-material
<i>Hauptgruppen</i>				
Batten-Spielmeyer-Vogt	chronisch	juvenil	Sehvermögen, Verhalten, Demenz	Fingerprint, curvilinear
Bielschowsky-Jansky	akut	spät infantil	Krämpfe, Sehvermögen, Psychomotorik	curvilinear, Fingerprint
Kufs	subakut, chronisch	adult	Krämpfe, Demenz, Motorik	granulär, Fingerprint
Harberg-Santavuori-Haltia	akut	infantil	Psychomotorik, Sehvermögen,	granulär
<i>Untergruppen</i>				
Norman-Wood	statisch	kongenital	Krämpfe	curvilinear
Zeman-Dyken	akut	adult	Krämpfe, Sehvermögen, Psychomotorik	Fingerprint, curvilinear
Bielschowsky-Variante	subakut-akut	Kindheit	Sehvermögen, Psychomotorik	Fingerprint, curvilinear
Edathodu-Dyken	chronisch	Kindheit	Autismus	Fingerprint
Infantil mit Autismus	chronisch	infantil	Autismus	granulär, Fingerprint
Juvenil mit Ataxie	chronisch	juvenil	Ataxie, Spasmen	Fingerprint
Lake-Canavagh	-	früh juvenil	Sehvermögen, Psychomotorik	?
Finnische Variante	-	spät infantil	Sehvermögen, Psychomotorik	curvilinear, Fingerprint
Indische Variante	-	spät infantil	Sehvermögen, Psychomotorik	?

Genetische und biochemische Studien haben zu einer neuen Einteilung der NCL-Formen aufgrund des betroffenen Genlokus geführt (Tab. 2), die mit CLN1 bis CLN8 bezeichnet werden (Gardiner, 2000; Mole & Gardiner, 1999).

Biochemische Analysen haben ergeben, daß die Hauptproteinkomponente des Speichermaterials bei nahezu allen NCL-Formen aus der c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (sub c), ein kleines, hochkonserviertes, hydrophobes Protein von 7,5 kDa, besteht (Hall et al., 1991; Palmer et al., 1989).

Tabelle 2: Molekulargenetische Einteilung der NCL-Formen nach Genloki; verändert nach Boldrini et al., 2001.

NCL-Form	Gen-name	Genlokus	Genprodukt
Infantile NCL (Harberg-Santavuori-Haltia)	CLN1	1p32	Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1)
Spät infantile NCL (Bielschowsky)	CLN2	11p15	Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1)
Juvenile NCL (Batten)	CLN3	16p12	Transmembranprotein
Adulte NCL (Kufs)	CLN4	unbekannt	unbekannt
Spät infantile NCL (Finnische Variante)	CLN5	13q31-32	Transmembranprotein
Spät infantile NCL (Indische und Tschechische Variante)	CLN6	15q23	Transmembranprotein
Spät infantile NCL (Türkische Variante)	CLN7	unbekannt	unbekannt
Northern Epilepsy	CLN8	8p23	Transmembranprotein

Die Speicherung der sub c ist die Folge des verminderten Abbaus und ist weder auf eine gesteigerte Synthese des Proteins (Ezaki et al., 1995; Kominami et al., 1992), noch auf eine veränderte Struktur der sub c in Patientenzellen zurückzuführen (Ezaki et al., 1996). Es wird angenommen, daß die mitochondriale sub c durch Autophagozytose in die Lysosomen gelangt, wo sie nicht abgebaut werden kann (Faust et al., 1994). Morphologische Studien an *mnd*-Mäusen, ein Modell für CLN8, zeigten, daß das Speichermaterial der Neuronen in

Autophagosomen gelangt (Pardo et al., 1994). Nur bei CLN1 kommt es im Gegensatz zu allen anderen NCL-Formen zur Akkumulation der Sphingolipid Aktivator Proteine A und D (Saposin A und D), bei denen es sich ebenfalls um kleine hydrophobe Glykoproteine handelt (Fürst & Sandhoff, 1992; Tyynela et al., 1993).

Im folgenden werden die NCL-Formen CLN1-5, CLN7 und 8 in Kürze und CLN6 im Detail besprochen.

Bei der **CLN1**-Form der NCL mit infantilem Erkrankungsbeginn ist die lösliche lysosomale Palmitoyl Protein Thioesterase 1 (PPT1) mutiert, dessen Funktion in der Hydrolyse von Fettsäuren (C₁₄-C₁₈) an Cysteinresten posttranslational modifizierter Proteine z.B. von palmitoylierten Ha-Ras und neurospezifischen Peptiden besteht (Cho et al., 2000). PPT1 enthält M6P-Reste und wird über den MPR-abhängigen Weg in die Lysosomen transportiert (Camp et al., 1994; Hellsten et al., 1996; Verkruyse & Hofmann, 1996). CLN1 stellt den schwersten Typ der NCL dar, bei dem das Speichermaterial als GRODS erscheint. Die ersten Symptome zeigen sich bei den Patienten im Alter von etwa 5 Monaten in einer geringen Kopfwachstumsrate. Nur etwa 30 % aller Kinder lernen, allein zu laufen.

Bei **CLN2** liegen Defekte in dem löslichen lysosomalen Enzym Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) vor (Vines & Warburton, 1999). Der Erkrankungsbeginn liegt bei den Patienten zwischen 2 und 5 Jahren. TPP1 spaltet Tripeptide vom N-Terminus zu degradierender Proteine im Lysosom ab (Vines & Warburton, 1998). Sub c wurde als *in vitro*-Substrat der TPP1 beschrieben (Ezaki et al., 2000; Ezaki et al., 1999; Lin et al., 2001). TPP1 ist eine Serin-Protease, die als Vorläuferprotein von 67 kDa synthetisiert wird und bei saurem pH autokatalytisch zu einem 46 kDa Protein prozessiert und damit aktiviert wird (Lin et al., 2001).

CLN3-Patienten weisen Mutationen in einem 43 kDa hydrophoben Protein mit 5 bis 11 möglichen Transmembrandomänen auf, das auch als Battenin bezeichnet wird (Janes et al., 1996) und dessen Funktion bislang noch ungeklärt ist. Als erste Symptome treten bei CLN3-Patienten im Alter von 4-10 Jahren visuelle Probleme auf. Battenin wurde in Neuronen in synaptischen Vesikeln und Synaptosomen nachgewiesen, woraus eine Rolle bei der Neurotransmission abgeleitet wurde (Haskell et al., 2000; Jarvela et al., 1999). Eine Vielzahl von Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden durchgeführt, die, in Ermangelung guter Antikörper, Battenin in den verschiedensten Zellorganellen detektieren. Die überzeugendsten

Daten sprechen jedoch für eine lysosomale Lokalisation (Haskell et al., 2000; Jarvela et al., 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Überexpression von CLN3 in nicht differenzierten neuronalen NT2-Vorläuferzellen zu einer Steigerung der Proliferationsrate dieser Zellen und zu einer Verringerung der durch Chemikalien (z.B. Etoposine, Vincristine und Staurosporine) induzierten Apoptose führt (Persaud-Sawin et al., 2002; Puranam et al., 1999). Battenin weist Homologien zum Hefeprotein BTN1 auf, das zu 39 % identisch und zu 59 % ähnliche Aminosäurereste besitzt (Pearce & Sherman, 1997). Bei BTN1 handelt es sich um eine vakuoläre H⁺-ATPase, so daß ähnliche Funktionen auch von Battenin angenommen wurden (Pearce et al., 1999).

Bei der adulten NCL-Form liegen Defekte im **CLN4**-Gen vor. Bislang konnte jedoch das betroffene Gen nicht identifiziert werden.

Mutationen im **CLN5** stellen die sogenannte Finnische Variante der NCL dar. Die ersten Beeinträchtigungen des Sehvermögens treten im Alter von 3-6 Jahren auf. *CLN5* kodiert ein Protein mit zwei putativen, die lysosomale Membran durchspannenden Domänen (Savukoski et al., 1998). Nach transienter Transfektion von COS-1-Zellen mit der CLN5 cDNA wird ein 60 kDa Glykoprotein synthetisiert. Die zellfreie Translation der CLN5 cDNA führt zur Synthese von vier verschiedenen Polypeptiden, die auf die Benutzung verschiedener Methioninreste als Translationsstartsignal zurückgeführt werden. Weiterhin konnte durch Koimmunpräzipitation gezeigt werden, daß CLN5p mit CLN2p und CLN3p/Battenin interagiert, nicht aber mit CLN1p (Isosomppi et al., 2002; Vesa et al., 2002).

Einer Türkischen Variante der NCL liegt ein Defekt im **CLN7**-Gen zugrunde. Bislang konnte jedoch weder der Genlokus noch das betroffene Protein identifiziert werden. Da das *CLN7*-Gen auf einem chromosomalen Bereich eingegrenzt wurde, in dem auch das *CLN8*-Gen liegt, wurde diskutiert, ob es sich bei *CLN7* und *CLN8* um identische Gene handelt. Die CLN7-Patienten zeigen einen schwereren Phänotyp mit einem früheren Erkrankungsbeginn (Mitchell et al., 2001) und weisen Speichermaterial in der Form von curvilinearen Körpern und Fingerprint-Mustern auf.

Die **CLN8**-Form der NCL wird auch als „Northern Epilepsy“ bezeichnet oder als Epilepsie mit progressiver mentaler Retardierung (EPMR). Die Patienten zeigen die ersten Symptome wie Krampfanfälle und fortschreitende mentale Retardierung

im Alter von 5-10 Jahren und weisen Speichermaterial auf, das sub c in der Form von curvilinearen und granulären Einschlüssen enthält (Herva et al, 2000). Das *CLN8*-Gen wurde 1999 identifiziert (Ranta et al, 1999) und kodiert ein Transmembranprotein von 33 kDa unbekannter Funktion, das im ER und partiell im ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) lokalisiert ist (Lonka et al., 2000). Ein natürlich entstandenes Mausmodell, die sog. Motorneuron-Degeneration- (*mind*)-Maus (Bronson et al., 1993; Messer & Flaherty, 1986; Ranta et al., 1999), zeigt eine homozygote 1bp-Insertion im *CLN8*-Homolog, die zu einem Frameshift mit vorzeitigem Stopcodon und somit zur Verkürzung des *CLN8*-Proteins führt. Der Mausphänotyp unterscheidet sich jedoch beträchtlich von dem der Patienten, was möglicherweise durch die Unterschiede der auftretenden Mutationen erklärt werden kann.

1.3.1 Spät infantile Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinose: CLN6

Bei der spät infantilen Variante der NCL treten Defekte im *CLN6* auf. *CLN6*-Patienten zeigen Speicherung der sub c in einer curvilinearen und Fingerprint-Form. Der Erkrankungsbeginn, charakterisiert durch progressiven Sehverlust bis zur Erblindung, liegt zwischen 5 und 7 Jahren. Der Tod tritt in der zweiten Lebensdekade ein (Pena et al., 2001). *CLN6* ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert. Kürzlich wurde das als FLJ20561 benannte Gen als *CLN6* identifiziert (Gao et al. 2002; Wheeler et al., 2002). *CLN6* verteilt sich mit 7 Exonen über eine genomische Region von ca. 22 kb mit einem offenen Leserahmen von 936 bp. *CLN6* kodiert ein integrales Membranprotein von 311 Aminosäuren mit 6 bis 7 Transmembrandomänen. Das *CLN6*-Protein (*CLN6p*) zeigt keinerlei Homologien zu bislang bekannten Proteinen. Die Aminosäuresequenz ist stark konserviert. Die humane und murine Aminosäuresequenz sind zu 90 % identisch mit der größten Varianz in den N-terminalen 38 Aminosäuren. *CLN6* wird ubiquitär exprimiert; Transkripte von 2,4 kb und 3,7 kb wurden in allen Geweben detektiert. Zusätzlich wurden in Skelettmuskelgewebe noch zwei weitere Transkripte von 1,1 kb und 5,9 kb nachgewiesen (Gao et al., 2002; Wheeler et al., 2002).

In insgesamt 15 betroffenen Familien aus Griechenland, Costa Rica, Pakistan, Indien und Portugal konnten unerwartet viele Mutationen gefunden werden

(Tab. 3), zu denen Missense-, Nonsense-Mutationen, Deletionen und Insertionen gehören. Diese Mutationen haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des CLN6p. Beispielsweise wurde bei einem portugiesischen Patienten (J.M.) eine 3 bp-Deletion in Exon 4 gefunden, die zur Entfernung des Aminosäurerestes Isoleucin 154 führte. Ein Patient aus Costa Rica war dagegen homozygot für eine Missense-Mutation in Exon 4, die zu einem Austausch des Aminosäurerestes Glycin 123 gegen Aspartat führte (Tab. 3).

Tabelle 3: Mutationen in CLN6.

Mutationen von verschiedenen Patienten, die an der spät infantilen Variante der NCL erkrankt sind. Verändert nach Wheeler et al., 2002.

Vorkommen der Mutation (Nukleotid)	Familien	Form der Mutation	Veränderung der AS-Sequenz	Exon
<u>Griechenland</u>				
6delG (homozygot)	1	1 bp-Deletion	Frameshift nach E2, 29 zusätzliche AS	1
<u>Costa Rica</u>				
unbekannt (heterozygot)	1			
214G? T (homozygot)	6	Nonsense	E72X	3
368G? A (homozygot)	1	Missense	G123D	4
<u>Pakistan</u>				
unbekannt (heterozygot)	1			
316insC (homozygot)	2	1 bp-Insertion	Frameshift nach P105, 25 zusätzliche AS	4
<u>Indien</u>				
395_397delCT (homozygot)	1	2 bp-Deletion	Frameshift nach D131, 17 zusätzliche AS	4
<u>Portugal</u>				
unbekannt (heterozygot)	1			
460_462delATC (homozygot)	1	3 bp-Deletion	I154del	4

Es wurden Mäuse und Schafe identifiziert, die natürliche Mutationen in *CLN6* mit ähnlichen Symptomen und Krankheitsverläufen aufweisen wie *CLN6*-Patienten. Das *CLN6*-Homolog der Maus liegt auf Chromosom 9 und ist synthenisch zum

humanen *CLN6* (Bronson et al., 1998). Das murine *CLN6*-Homolog codiert ein Polypeptid aus 308 Aminosäuren. Bei den sogenannten *nclf*-Mäusen liegt eine 1 bp Insertion im Exon 4 vor, die zu einem Frameshift nach dem Aminosäurerest P102 und zu einem vorzeitigen Translationsstop nach weiteren 61 neuen Aminosäureresten führt (Gao et al., 2002).

Die *nclf*-Maus entwickelt sich normal bis zum Alter von 8 Monaten. Danach treten zunächst schwache Lähmungserscheinungen an den Hinterbeinen auf, die sich zu einer kompletten Lähmung ausweiten und schließlich zum verfrühten Tod führen.

Weiterhin kommt es bei diesen Mäusen zu Krampfanfällen und zur Retinadegeneration. Speichermaterial in curvilinearer und Fingerprint-Form wurde schon 11 Tage nach der Geburt in allen Gehirnregionen detektiert und im Alter von 6 Monaten ließ sich eine gesteigerte Menge an hypertrophen Astrozyten im cerebralen Cortex, Hippocampus, Thalamus und im Gehirnstamm beobachten.

Zum anderen liegen noch zwei weitere gut beschriebene natürliche Tiermodelle vor: das Southhamshire-Schaf aus Neuseeland und das Merino-Schaf aus Australien, die auch als OCL6 bezeichnet werden (Cook et al., 2002; Jolly et al., 1989). Bei beiden Rassen sind zuerst Verhaltensänderungen im Alter von 4-12 Monaten zu beobachten. Es folgen visuelle Probleme bis zur Erblindung und motorische Defizite (Mayhew et al., 1985). Sub c wird in Form von Multilamellen und Fingerprint-Mustern gespeichert. Neurodegeneration ist in den meisten Cortexschichten nachweisbar, ebenso eine fortschreitende Astrozytose (Cook et al., 2002; Jolly et al., 1999; Palmer et al., 1992; Palmer et al., 1989). Die chromosomale Lokalisation des in beiden Schafen betroffenen Gens konnte auf die Region 7q13-15 eingegrenzt werden, die synthenisch zur humanen Region 15q23 ist (Bronson et al., 1998; Broom & Zhou, 2001; Broom et al., 1998).

1.3.2 Cathepsin D-Defizienz

Eine weitere, bisher nur in Tieren gefundene Form der NCL ist die „congenital ovine NCL“ (CONCL), bei der die lysosomale Aspartylprotease Cathepsin D (CtsD) betroffen ist. CONCL wurde in einer Herde von „White Swedish Landrace“ Schafen in Nord-Schweden entdeckt (Järplid & Haltia, 1993). Die neugeborenen Lämmer haben einen sehr schweren Phänotyp; sie sterben innerhalb eines Tages nach der Geburt. Im Vergleich zu Kontrollen ist das Gehirngewicht auf die Hälfte

reduziert und die Dicke des cerebralen Cortex ist drastisch verringert. In der weißen Substanz des Cerebrum und Cerebellums war kaum noch Myelin nachweisbar. In den tiefen Schichten des cerebralen Cortex wurden Neurodegeneration, Astrozytose und Infiltrierung durch Makrophagen beobachtet. Andere Organe wie z.B. Herz, Leber, Niere und Darm waren unauffällig. Die Neuronen des cerebralen Cortex zeigten die größte Menge an autofluoreszierendem, granulärem Speichermaterial (GRODS), dessen Hauptkomponente aus Saposin A und D besteht. Die Mutation des Aspartatrestes 295 im aktiven Zentrum des CtsD führte zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Westernblotanalysen haben ergeben, daß der „steady state-Level“ von CtsD jedoch in CONCL-Gehirngewebe höher war als in den Kontrollen (Tyynela et al., 2000).

CtsD ist ein Glykoprotein, das M6P-Reste an N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidseitenketten trägt, die für den MPR-spezifischen intrazellulären Transport notwendig sind (Kornfeld & Mellman, 1989). CtsD wird als inaktives Präproprotein von 53 kDa (human), 51 kDa (ovine) und 45 kDa (murine) synthetisiert und partiell sezerniert. Auf dem Weg zu den Lysosomen wird CtsD speziesabhängig zu seiner aktiven Form proteolytisch prozessiert (Fujita et al., 1991; Gieselmann, 1985). Neben der Proteolyse im Lysosom werden CtsD auch nicht-enzymatische Eigenschaften wie z.B. Stimulation der Zellproliferation (Vignon F, 1986), Inhibition der Tumorapoptose (Berchem et al., 2002) und Induktion der Apoptose durch oxidativen Stress (Kagedal et al., 2001) zugeschrieben.

CtsD-defiziente Mäuse entwickeln sich in den ersten 14 Tagen nach der Geburt normal (Saftig et al., 1995). Danach stagniert die Gewichtszunahme und die Tiere zeigen eine Reduktion in ihren spontanen Bewegungen und Fluchtreaktionen, einen unregelmäßigen Gang. Die Mäuse leiden an Krampfanfällen und erblinden ab dem 20. Lebenstag. Der Tod tritt bei den Tieren zwischen Tag 25 und 27 ein. Die immunhistochemischen Analysen ergaben, daß Neuronen lysosomale Einschlüsse in granulärer und Fingerprint-Form zeigen, die für sub c, Cathepsin B (CtsB) und die β -Untereinheit der ATP-Synthase immunoreaktiv sind. Biochemisch ließ sich die Erhöhung der Aktivität und Proteinkonzentration des CtsB bestätigen. Außerdem war die Aktivität der lysosomalen Tripeptidylpeptidase 1, wie auch bei CONCL-Schafen (Tyynela et al., 2000), erhöht. Diese Beobachtungen zeigen, daß

Genmutationen bzw. die Defizienz des CtsD als eine neue Form der NCL einzuordnen ist (Koike et al., 2000). Beim Menschen konnte die Defizienz der CtsD-Aktivität als Ursache für eine Form der NCL jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

2 ZIELSETZUNG

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL) stellen mit einer Inzidenz von 1:12.500 die häufigste neurodegenerative Erkrankung im Kindesalter dar. NCL sind durch lysosomale Einschlüsse in den meisten Körperzellen charakterisiert, wobei sich die elektronenmikroskopische Ultrastruktur des Speichermaterials bei den verschiedenen Formen der NCL (CLN1-8) unterscheidet. Bislang ist noch völlig unbekannt, weshalb es bei Mutationen in den Genen *CLN1-8* zu den Neuronen-spezifischen Symptomen kommt, die zu Neurodegeneration, Erblindung, Krampfanfällen und progressiver mentaler Degeneration führen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen Untersuchungen an kultivierten Zellen und Hirnmaterial von CLN6-Patienten bzw. CLN6- und Cathepsin D (CtsD)-defizienten Tiermodellen. Das CLN6 Genprodukt ist ein Transmembranprotein unbekannter Funktion und CtsD eine lysosomale Aspartylprotease mit unbekannter endogener Substratspezifität.

Um den Pathomechanismus von CLN6 und der CtsD-Defizienz besser zu verstehen, sollten Proteinmuster lysosomaler Fraktionen durch Zweidimensionale-Gelelektrophorese analysiert und veränderte Proteine durch Massenspektrometrie sowie durch biochemische und immunologische Nachweisverfahren identifiziert werden. Parallel dazu sollte die Topologie, die intrazelluläre Lokalisation und proteinchemischen Eigenschaften des CLN6-Proteins und seine Rolle beim Transport lysosomaler Enzyme näher untersucht werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, analysenrein verwendet. Die nicht angegebenen Reagenzien wurden entweder von Merck, GIBCO/BRL, Pierce, Sigma, Amersham Pharmacia oder BioRad bezogen.

Acrylamid 30 % / Bisacrylamid 0,8 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose für DNA-Gelelektrophorese	GIBCO/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	BioRad, München
BSA (bovine serum albumin)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie R, Serva Blue	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz (EDTA)	Merck, Darmstadt
ECL-Reagenz (Super Signal)	Pierce Rockford, IL, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat (LiAc)	Merck, Darmstadt
Lipofectamin 2000	GIBCO/BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, München

Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Protein A Agarose	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg

3.1.2 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin, 1.000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹²⁵ J]-Natriumjodid, trägerfrei in NaOH-Lösung pH 7-11, 100 mCi/ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Guanosine-5 [α ³² P]-triphosphat	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.3 Geräte

ABI-Sequenator 337	Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, USA
Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
DNA-Sequenzierer Typ Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Dounce-Homogenisator	Wheaton, Millville, USA
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau, Werkstatt der Universität Göttingen
Drygalski-Spatel	Schütt Labortechnik, Göttingen
Eismaschine AF 10	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad, München
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hofer Scientific Instruments, USA
Filmentwicklungsmaschine Modell Gevomatic 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gammastrahlenzähler, 1470 Wizard™	Wallac, Finnland
Gefrierschrank -80 °C	New Brunswick, Edison
Geltrockner, Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Homogenisator Typ Tissue Tearor, Model 985-370	Biospec Products, France
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Sc., Edison
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
<u>Mikroskope:</u>	
Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Zusatzausstattung für das Axiovert 100:	
DP 50-Kamera	Olympus, Hamburg
Software: Analysis Soft Imaging System	
Fluoreszenzfilter für das Axiovert 100:	
Fluorochrom: Anregungsfilter:	Farbteiler: Emissionsfilter:
FITC, Cy2 BP 450-490	FT 510 LP 515-565
Texas-Rot, Cy3 BP 546	FT 580 LP 590
Mikrowellenherd	Bosch
Multipette, Combitips	Eppendorf, Hamburg
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefer Scientific Instruments, USA
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Netzgerät EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Schütt, Göttingen
PH-Meter Knick 647	Eppendorf Hamburg
Photometer, Model RS 232 C	Heraeus Osterode
Sterilbank HS 12	Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter Minisart NML	Air Liquide, Frankreich
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Dremel, USA
Tissue Tearer	Bachofer, Reutlingen
UV-Handlampe (312 nm und 254 nm)	Branson Ultrasonic SA, Carouge-Geneve, USA
Ultraschall-Desintegrator Sonifier W-450	Vacuubrand, Wertheim
Vakuum Konzentrator	
Model Speed Vac SPD 111V	
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich
Wasserbad Typ HOR 7225	Köttermann, Häningsen
<u>Zentrifugen:</u>	
Minifuge GL	Heraeus, Osterode
Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417	Eppendorf Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf Hamburg
Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA
Ultrazentrifuge Sorvall Discovery M120	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
Ultrazentrifuge Sorvall Du Pont OTD SOB	
<u>Rotoren für die Minifuge:</u>	
F-45-30-11	Heraeus, Osterode
F-45-24-11	Heraeus, Osterode
<u>Rotoren für die Sorvall-Zentrifugen:</u>	
SS-34	Eppendorf Hamburg
SLA-3000	Eppendorf Hamburg
<u>Rotoren für die Ultrazentrifugen:</u>	
S 100 AT4, S55S, SW55	Kendro Laboratory Products, Newtown, Connecticut USA

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

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

3.1.5 Kits

QIAquickgel Extraction	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden
QIA Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIA Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Nucleospin II	Macherey-Nagel, Düren
LightCycler-FastStart DNA Master	Roche Diagnostics, Mannheim
SYBR Green I	
RT-PCR-Kit	Perkin Elmer, Cetus, Norwalk, USA
Vectastain Elite ABC-Reagent-Kit	Vector, Burlingame, CA, USA
Quick change	Stratagene, La Jolla, USA

3.1.6 Plasmide und DNA-Standards

pCDNA3.1 A (-) myc/His	Invitrogen, Leek, Niederlande
pCDNA3.1GFP/A(-)	Vektor wurde von Dr. S. Storch, Kinderklinik, Hamburg, zur Verfügung gestellt
DNA-Ladder	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.7 Enzyme und Nukleotide

DNase I	Merck, Darmstadt
Dpn1	New England BioLabs, Bad Schwalbach
dNTP-Set, ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Merck, Darmstadt
<i>Pfu-Turbo</i> TM -Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Phosphatase, alkalisch	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs, Bad Schwalbach
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.8 Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

Jodacetamid (JAA)	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rainbow TM -coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IEF-Standard	BioRad, München
2D-SDS-PAGE-Standard	BioRad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg

3.1.9 Bakterienstamm

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Genotyp: F' <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ ,mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , (Na ¹ '), <i>relA1</i> , D(<i>lacZYA-argF</i>) _{U169} , (j80 <i>lacZDM15</i>)
---	---

3.1.10 Patienten, Tiermodelle und Zellen

Name	Beschreibung	Referenz
BHK-21	Baby Hamster Nierenfibroblasten	(Clarke et al., 1970)
M.T.-Fibroblasten	Humane Kontrollfibroblasten aus Hautbiopsie; Alter bei Biopsie 17 Monate; Geschlecht weiblich; deutscher Patient	
J.M.-Fibroblasten	Humane CLN6-Fibroblasten aus Hautbiopsie; Alter bei Biopsie unbekannt; Geschlecht männlich; portugiesischer Patient, zur Verfügung gestellt von A. Kohlschütter, Universität Hamburg	
M.P.-Fibroblasten	Humane CLN6-Fibroblasten aus Hautbiopsie; Alter bei Biopsie 5 Jahre; Geschlecht männlich; tschechischer Patient	
M.S.-Fibroblasten	Humane CLN6-Fibroblasten aus Hautbiopsie; Alter bei Biopsie unbekannt; Geschlecht weiblich; tschechische Patientin	
M.G.-Fibroblasten	Humane CLN2-Fibroblasten aus Hautbiopsie; Alter bei Biopsie 8,5 Jahre; Geschlecht weiblich; deutsche Patientin, zur Verfügung gestellt von A. Kohlschütter, Universität Hamburg	
J.E.-Fibroblasten	Humane CLN3-Fibroblasten aus Hautbiopsie, Alter bei Biopsie 12 Jahre, Geschlecht männlich, zur Verfügung gestellt von J. Tynelä, Universität Helsinki	
C.C.-Fibroblasten	Humane CLN3-Fibroblasten aus Hautbiopsie, Alter bei Biopsie unbekannt, zur Verfügung gestellt von J. Tynelä, Universität Helsinki	
CLN6-Cortex	8-jähriger Patient aus Tschechien	(Elleder et al., 1997)
Kontroll-Cortex	Zur Verfügung gestellt von M. Elleder, Universität Prag	(Elleder et al., 1997)
CLN5 für Immunhistochemie	22-jähriger Patient, Zur Verfügung gestellt von J. Tynelä, Universität Helsinki	
CLN6 für Immunhistochemie	Zur Verfügung gestellt von J. Tynelä, Universität Helsinki	
Kontrolle für Immunhistochemie	Zur Verfügung gestellt von J. Tynelä, Universität Helsinki	

Name	Beschreibung	Referenz
CtsD-defiziente Mäuse	Gehirn wurde am Tag 23 nach der Geburt entnommen, Gehirn wurde ohne Cerebellum verwendet	(Saftig et al., 1995)
Kontroll-Mäuse	Entstanden durch die Verpaarung von CtsD-heterozygoten Mäusen	
OCL6-Merino-Schafe	13-17 Monate alt	(Cook et al., 2002)
Kontroll-Merino-Schafe	13-17 Monate alt	(Cook et al., 2002)
OCL6-Material	Hautfibroblasten, Gehirn und Leber von 18 Monate alten OCL6-Southhampshire-Schafen	(Palmer et al., 1992)
Kontroll-Schafs-Material	Hautfibroblasten, Gehirn und Leber von 18 Monate alten gesunden Southhampshire-Schafen	(Palmer et al., 1992)

3.1.11 Puffer, Medien und Lösungen

3.1.11.1 Medien zur Aufzucht von Bakterien

Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Medien für die Aufzucht von Bakterien wurden gemäß den Instruktionen der „Current Protocols in Molecular Biology“ (2000) , Harvard Medical School angesetzt.

3.1.11.2 Zellkulturlösungen

Dulbeccos (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Optimem-1	GIBCO/BRL, Eggenstein
DMEM ohne Methionin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Glutamax	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS für Zellkultur	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10.000 U)	Seromed/Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.12 Antikörper

3.1.12.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung		
			WB	IF	IPP
Human MnSOD	K	Upstate Biotechnology, NY	1:500	1:200	-
Ratte GPD	K	(Weitzel et al., 2001)	1:1000	-	-
sub c	K		1:1000	-	-
Human COX	M/mab	Molecular Probes, Leiden, Niederlande	1:500	1:5	-
Human PDI	M	StressGen	-	1:800	-
Human Lamp1	M/mab	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:1000	1:500	-
Human α_2 - Macroglobulin	M/mab	Upstate Biotechnology, NY	1:500	-	-
Human MPR300	K	aus Laborbeständen	1:500	-	-
Maus CtsD	K	(Claussen et al., 1997)	1:750	-	1:500
GFP	M	Clontech, Palo Alto, USA	1:500	-	-
myc	K	Santa Cruz Biotechnology	1:500	1:50	1:250
myc	M/mab	Developmental Studies Hybridoma Bank	-	1:50	-
His	K	Dianova, Hamburg	1:500	-	-
G α (Z)	K	Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg	1:150	-	-
Rab 7	K	Dr. G. Mieskes	1:500	-	-
Nitrotyrosine	M/mab	Upstate Biotechnology, NY	1:100	-	-
Präimmunserum			-	-	1:1000

K: Kaninchen, M: Maus, Z: Ziege, mab: Monoklonaler Antikörper, IF: Immunfluoreszenz, IPP: Immunpräzipitation, WB: Westernblot

3.1.12.2 Sekundärantikörper

Schaf anti Maus IgG, HRP-gekoppelt; 1:5.000 im WB	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt; 1:10.000 im WB	Dianova, Hamburg
Schaf anti Maus IgG, Cy3-gekoppelt; 1:2.000 in IF	Dianova, Hamburg
Schaf anti Maus IgG, FITC-gekoppelt; 1:100 in IF	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt; 1:2.000 in IF	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Antikörper, HRP-gekoppelt; 1:5.000 in WB	Dianova, Hamburg

IF: Immunfluoreszenz, WB: Westernblot

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die NaAc-Konzentration auf 0,3 M eingestellt und mit 2 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte 20 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min und bei 14.000 rpm gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen TE-Puffer bzw. Aqua bidest. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und 31 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotiden.

3.2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Für Restriktionsspaltungen wurden die vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Reaktionsbedingungen in einem Gesamtvolumen von 20 μl beachtet.

3.2.1.4 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

1.1.1.1.1 Transformation chemokompetenter Zellen

Chemokompetente DH5 α -E. coli-Bakterien (100 μl) Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor oder einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis wurden 0,4 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 120 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformations-

ansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium (inkl. 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glycerolkulturen verwendet.

3.2.1.4.2 Anlegen einer Glycerolkultur

Vorkulturen mit einer OD₆₀₀ größer als 1 wurden mit 0,25 Volumen an 80 % Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus einer Glycerolkultur kann direkt eine Vorkultur angeimpft werden.

3.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.2.1.5.1 Schnelle Isolierung kleiner Mengen

Puffer P1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
Puffer P2	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3	3 M	NaAc pH 4,8

Zur Isolierung kleiner DNA-Mengen wurde das Verfahren nach Birnboim & Doly, 1979 angewendet.

Drei ml LB-Medium (inkl. 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert, durch Zugabe von 0,3 ml Puffer P2 aufgeschlossen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,3 ml Puffer P3 renaturiert. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 0,66 ml 2-Propanol bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl TE-Puffer bzw. Wasser aufgenommen.

Alternativ wurde die DNA mit Hilfe des Qiaprep Spin Mini-Plasmid Kits aus einer Bakteriensuspension von 1,5 ml, die über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert

worden war, gewonnen. Dabei wurden die Angaben des Herstellers berücksichtigt. Die isolierte DNA wurde in Wasser gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.1.5.2 Isolierung größerer Mengen

Größere Mengen bakterieller DNA wurden mittels des Plasmid-Midi-Kits gewonnen, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden.

3.2.1.5.3 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung

Lysispuffer	100 mM	Tris/HCl pH 7,4
	5 mM	EDTA
	200 mM	NaCl
SDS-Lösung	10 %	SDS
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	in Lysispuffer
Solubilizer	100 mM	Tris/HCl pH 7,4
	5 mM	EDTA

Um den Genotyp von Mäusen zu bestimmen, wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert. Dazu wurden die Schwanzspitzen über Nacht in 500 μl Lysispuffer, 10 μl SDS-Lösung und 40 μl Proteinase K-Lösung unter Schütteln bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde dem Überstand 500 μl Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurde die genomische DNA als weißer Faden sichtbar, der dann mit einer Glasöse entnommen und daran getrocknet werden konnte. Die trockene DNA wurde in 100 μl Solubilizer aufgenommen und 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst. Von dieser DNA wurde dann 1 μl für eine PCR eingesetzt.

3.2.1.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Die Proben wurden mit Ficoll-Marker (0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol; 15 % Ficoll) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. 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 einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

3.2.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick-Spin-Gel-Extraction Kits nach Anweisung des Herstellers aus der Agarose extrahiert. Gleichzeitig wurde hierbei die DNA konzentriert.

3.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion

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

Die PCR basiert auf drei Schritten, die für jede DNA-Synthese nötig sind:

- Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
- Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge (Annealing)
- Synthese der DNA ausgehend von den gebundenen Primern (Extension)

Durch die Verwendung der *Taq*-Polymerase können mehrere Zyklen dieser Schritte durchlaufen werden, da dieses Enzym auch die extremen Denaturierungstemperaturen von 96 °C ohne Aktivitätsverlust übersteht. Das gewünschte Fragment wird exponentiell amplifiziert, da neu synthetisierte DNA-Fragmente im nächsten Zyklus als Template verwendet werden. Faktoren, die den Erfolg der PCR beeinflussen können, sind die Auswahl und Konzentration der Oligonukleotid-Primer, die Qualität des Templates, die Pufferbedingungen und die Zeiten und Temperaturen der Zyklusschritte.

Als Template wurde DNA verwendet, die mittels der DNA-Präparations-Kits der Firma Qiagen isoliert worden war. Das dNTP-Set wurde auf 10 mM je Nukleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

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

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonukleotid-Primer angesetzt.

3.2.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde im zentralen Servicelabor der Universitätsklinik Eppendorf durchgeführt. Es wurde die *Taq*-Cycle-Sequencing Methode angewandt, die auf der Methode nach Sanger et al., 1977 beruht. Statt radioaktiv markierter wurden jedoch Fluorochrom-gekoppelte Didesoxy-Nukleotide (Premix von Applied Biosystems) eingesetzt. Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

DNA	Premix	Primer	ad H ₂ O
1 µg	8 µl	15 pmol	20 µl

Es wurden 25 Reaktionszyklen in einem Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durchgeführt, wobei folgendes Protokoll befolgt wurde:

Denaturierung	Annealing	Extension
10'' 96 °C	5'' 50 °C	4' 60 °C

Nach Abschluß der Reaktion wurde die Probe auf 4 °C abgekühlt.

3.2.1.10 RNA-Isolation

3.2.1.10.1 RNA aus kultivierten Zellen

Die Aufarbeitung von total RNA aus kultivierten humanen Fibroblasten wurde mit dem Nucleospin II Kit nach den Instruktionen des Herstellers vorgenommen.

1.1.1.1.2 RNA aus Gewebe

Gewebe-Guanidine-Lsg.	5 M	Guanidine-Thiocyanat
	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
Sarcosyl-Lsg.	20 % (w/v)	Sarcosyl
Cäsiumchlorid-Lsg.	5,7 M	Caesiumchlorid
		in 100 mM EDTA pH 8,0
Resuspensionspuffer	5 mM	EDTA
	0,5 % (w/v)	Sarcosyl
	5 %	β-Mercaptoethanol

Frisches oder bei – 80 °C gelagertes Gewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert. Nach Zugabe von 950 µl Gewebe-Guanidine-Lösung und 50 µl β-Mercaptoethanol wurde das Gewebe durch 20 Züge mit einer G24-Nadel homogenisiert und anschließend 10 min bei 12.000 x g und 12 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 µl Sarcosyllösung versetzt und 2 min bei 65 °C inkubiert. Auf 500 µl Cäsiumchloridlösung wurde der Überstand überschichtet und 20 h bei 113.000 x g und 22 °C im Swing-out-Rotor S55S zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 400 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) kurz gemischt und 30 s zentrifugiert. Der oberen Phase wurde 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt, wieder kurz vermengt und 30 s zentrifugiert. Aus der oberen Phase wurde die RNA gefällt (siehe 3.2.1.1). Das RNA-Pellet wurde in 50 µl A. dest. aufgenommen und anschließend noch einer DNase-Behandlung nach den Anweisungen des Herstellers unterzogen. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die RNA wiederholt durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (s.o.).

3.2.1.11 Real time PCR

Zunächst wurde die aus Geweben oder kultivierten Zellen isolierte RNA durch die Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA als Template für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt. Es wurde ein Kit der Firma Perkin Elmer verwendet.

RT-Reaktion	2 µl	10 x Puffer
	2 µl	25 mM MgCl ₂
	je 1 µl	10 mM dNTPs
	0.5 µl	50 µM Oligo d(T)-Primer
	0.5 µl	Rnasin
	0.5 µl	MuLV Reverse Transkriptase
	1 µg	template RNA
	ad A. dest 20 µl	

Anschließend folgte eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern für MnSOD, SOD1 und β-Actin (siehe Anhang) nach den Anweisungen des Herstellers. Schon während der PCR-Reaktion wird das fluoreszierende SYBR Green an die DNA

gebunden und die Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus bei 88 °C (für MnSOD), bei 89 °C (für β -Actin) und 88 °C (für SOD1) durch den Light Cycler gemessen. Die erhaltenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Dies gilt ebenso für die Standardreihe. Als Standard wurden verschiedene Verdünnungen des PCR-Produktes der jeweiligen Primer verwendet.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Immortalisierte Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2.2 Trypsinieren von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin (0,05 % w/v)/EDTA (0,02 % w/v) pro 25 cm²-Flasche für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.2.2.3 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium 10 % DMSO / 20 % FKS / 1 % Penicillin / Streptomycin in DMEM

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000 x g in der Labofuge sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen (aus einer 25 cm²-Flasche) in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und auf drei Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei

37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 3,5 ml kaltes Medium (4 °C) überführt und in der Labofuge 5 min bei 1.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.2.4 Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 1×10^4 Zellen auf 35 mm Gewebeschalen ausgesät. Optimem-Medium wurde mit 4 µg DNA auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurden 4 µl Lipofectamin 2000 mit Optimem ebenfalls auf ein Endvolumen von 200 µl eingestellt. Die beiden Ansätze wurden gemischt und 20 min bei RT inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden in Antibiotika-freiem DMEM/FKS für 24 bis 72 h bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Lösungen:

10 mM	PBS
3 %	Para-Formaldehyd (PFA) in PBS (w/v)
0,1 mg/ml	Poly-L-Lysin in PBS
1%	BSA in PBS

Sterile Deckgläschen wurden in eine 35 mm Gewebekulturschalen ausgesät und mit 200 µl Poly-L-Lysin für 1 h bei 37 °C beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gespült.

Etwa 500-1.000 Zellen wurden auf den beschichteten Deckgläschen über Nacht gezüchtet. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml 3 % PFA für 40 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und 6 min mit -20 °C kaltem Methanol permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte die Blockierung mit 1 % BSA in PBS über 30 min bei RT. Die Deckgläschen wurden auf einen Streifen Parafilm gelegt und 50 µl der Antikörperverdünnung als Tropfen darauf pipettiert. Eine mit feuchtem Filterpapier ausgekleidete Petrischale wurde als Verdunstungsschutz darüber gelegt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in 1% BSA/PBS für 2 h bei RT. Im Anschluß daran wurden die Zellen 3 x mit 1 ml PBS gewaschen. Die Bindung der

an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte, wie für den Primärantikörper beschrieben, für 1 h bei RT unter Lichtausschluß. Danach wurden die Zellen zunächst wieder 3 x mit PBS und mit A. bidest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Glycerol-Gelatine (Sigma) eingebettet und bei 4 °C gelagert.

Für Kolokalisationsstudien wurden die Zellen simultan mit den jeweiligen Primärantikörpern, die in unterschiedlichen Spezies generiert worden waren, inkubiert. Durch geeignete Wahl der Sekundärantikörper konnten diese spezifisch dargestellt werden.

Die digitale Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 der Firma Zeiss, Oberkochen, und am Konfokalmikroskop LSM 510 der Firma Zeiss, Jena, Deutschland.

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

„Hungermedium“	DMEM ohne Methionin/ 0,1 % BSA
Pulse-Medium	DMEM ohne Methionin/ 0,1 % BSA 100 µCi/ml [³⁵ S]-Methionin
Chase-Medium	DMEM/ 5 %FKS/ 0,25 mg/ml Methionin

Konfluente Zellen in einer 35 mm Gewebepatte wurden mit PBS gewaschen und mit 700 µl „Hungermedium“ für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 700 µl Pulse-Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach entweder sofort abgeerntet oder für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C einem Chase unterzogen. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und darin abgeschabt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 x g wurde das Pellet in 50 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert. Die Homogenate wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt.

3.2.2.7 Immunpräzipitation von Cathepsin D

Die Immunpräzipitation von metabolisch markiertem Cathepsin D erfolgte nach Muschol et al., 2002.

3.2.2.8 Immunpräzipitation von myc-getaggetem CLN6

Die Immunpräzipitation von myc-CLN6 aus Zellen erfolgte in 400 µl Lysispuffer (1 % TX-100/ 1 % BSA in A. dest.) unter Zugabe von 50-fach konzentriertem Proteaseinhibitorcocktail. Weiterhin wurde das Protokoll nach Muschol et al., 2002 verwendet mit dem Unterschied, daß 3 x mit 10 mM PBS gewaschen wurde.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen nach dem Protokoll von Bradford, 1976, gemessen.

3.2.3.2 Bestimmung der Lipidoxidation

Die Lipidoxidation wurde in kultivierten humanen und Schafsfibroblasten über die Detektion des Abbauproduktes der Lipidoxidation, dem Malondialdehyd, bestimmt. Dazu wurde das in den Zellen vorhandene Malondialdehyd unter Hitzeeinwirkung bei pH 3,5 mit Thiobarbitursäure gekoppelt. Dieser Komplex wurde in Butanol extrahiert, über die HPLC getrennt und mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Extinktion 515 nm; Emission 553 nm) nachgewiesen. Die Lipidoxidation wurde in Dreifachbestimmungen von Kontroll- und CLN6/OCL6-Zellen durchgeführt (Fukunaga et al., 1993).

3.2.3.3 Färbung von Proteinen

3.2.3.3.1 Anfärbung mit Coomassie-Blue

Die Anfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blue (0,05 %) wurde gemäß den Anleitungen der „Current Protocols in Molecular Biology“ (2000), Harvard Medical School durchgeführt.

3.2.3.3.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in Gelen erfolgte nach dem Protokoll von Nesterenko et al., 1994.

3.2.3.3.3 Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen für die Fluorographie

Bei der Imprägnierung von Polyacrylamid-Gelen mit PPO (Diphenyloxazol in DMSO) wurde das Protokoll von Bonner & Laskey, 1974 befolgt, um eine Signalverstärkung von Radioaktivität in SDS-Page-Gelen zu erreichen.

3.2.3.4 Messung von Enzymaktivitäten

3.2.3.4.1 Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität

Substratpuffer	10 mM	para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
	100 mM	Na-Citrat pH 4,6
	0,04 %	NaN ₃
	0,2 %	BSA

Stop-Puffer 0,4 M Glycin/NaOH pH 4,6

Pro Ansatz wurden zwischen 5-20 μ l der zu messenden Probe eingesetzt und mit A. dest. auf ein Volumen von 50 μ l gebracht. Nach dem Zufügen von 50 μ l Substratpuffer folgte eine Inkubation von 30 bis 60 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stop-Puffer beendet und die optische Dichte bei 405 nm gemessen. Zur Quantifizierung der β -Hexosaminidase-Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient von 18500 berücksichtigt.

3.2.3.4.2 Messung der MnSOD-Aktivität

Endkonzentration des Reaktionspuffers:

50 mM	Kaliumphosphat pH 7,8
1 mM	DETAPAC
1 unit/ml	Catalase
56 μ M	Nitro-Blue-Tetrazolium
100 μ M	Xanthine
5 mM	NaCN
3,3 nM	Xanthine-Oxidase

Die Aktivität der MnSOD wurde in ML-Fractionen (siehe 3.2.3.8.1) von kultivierten humanen und Schafsfibroblasten photometrisch gemessen (Oberley et al., 1987). Die ML-Fractionen (100 µg Protein) wurden mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Nach Zugabe von 0,8 ml Reaktionspuffer ohne und mit NaCN, das die Cu/Zn-abhängige SOD1 inhibiert, wurden die Proben 30 min bei RT inkubiert. Die Zugabe der Xanthine-Oxidase startete die Reaktion, die dann 2 min im Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen wurde. Es wurde der Anstieg der Extinktion pro Minute bestimmt.

Für die Messung der „Im-Gel-Aktivität“ wurden je 30 µg Protein der ML-Fractionen unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Auf das Kochen der Proben vor dem Auftrag wurde verzichtet. Zur Renaturierung der Proteine wurden die Gele 30 min in 2,5 % Triton X-100 und 2 x 20 min in A.dest. geschwenkt. Im weiteren wurden die Gele 20 min unter Lichtausschluß in 2,45 mM Nitro-Blue-Tetrazolium inkubiert. Anschließend wurden die Gele in Reaktionspuffer (36 mM Kaliumphosphat pH 7,8/ 28 mM TEMED/ 28 µM Riboflavin/ 0,33 M NaCN) im Dunkeln geschwenkt und danach illuminiert bis eine deutliche Blaufärbung des Gelhintergrundes eingetreten ist (Beauchamp & Fridovich, 1971). Die Reaktion wurde durch Wässern und sofortiges Trocknen des Gels gestoppt.

3.2.3.5 Westernblotanalyse

Transferpuffer 1	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran geht auf Towbin et al., 1979, zurück und wurde für 90 min bei 900 mA in einer Elektroblot-Apparatur durchgeführt. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer (10 mM PBS/ 5 % Milchpulver/ 0,05 % Tween-20) inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 2 h bei RT. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 5 min mit Waschpuffer (10 mM PBS/ 0,05 % Tween-20) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach

erneutem Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL; SuperSignal, Pierce Rockford, IL, USA).

3.2.3.6 [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP-Overlay-Blot

Renaturierungslsg.	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	20 %	Glycerin
Transferpuffer 2	10 mM	NaHCO ₃ pH 9,8
	3 mM	Na ₂ CO ₃
Bindungspuffer	50 mM	Natriumphosphatpuffer pH 7,5
	10 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
	0,3 %	Tween 20
	4 μM	ATP

In diesem Fall wurden Proteine nicht mittels eines Antikörpers detektiert, sondern mit einem radioaktiv markiertem Liganden. Dazu wurden die Proteine im Gel nach der SDS-PAGE 30 min bei RT in Renaturierungslösung geschwenkt, um das SDS zu entfernen. Erst jetzt erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran in Transferpuffer 2 wie in 3.2.3.5 beschrieben. Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend 2 x 10 min in Bindungspuffer gewaschen. Die Bindung von Guanosine-5' [$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat (50 – 60 μCi / 10 ml) an GTP-bindende Proteine erfolgte innerhalb von 2 h bei RT in Bindungspuffer. Ungebundenes [$\alpha^{32}\text{P}$]-GTP wurde durch sechsmaliges Waschen mit Bindungspuffer entfernt. Die gebundene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie detektiert.

3.2.3.7 [^{125}J]-Arylsulfatase A-Overlay

Auch hier wurden die Proteine, die zuvor durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert wurden, nicht mittels eines Antikörpers, sondern mit [^{125}J]-Arylsulfatase A (ASA) detektiert. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran in Blockpuffer (10 mM PBS/ 1% BSA/ 0,1 % Tween-20) über Nacht bei 4 °C und anschließend 2 h bei RT mit [^{125}J]-ASA (100.000 cpm/ml) in Blockierungspuffer inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 4 x 10 min mit Waschpuffer (10 mM PBS/ 0,1 % Tween-20) gewaschen, getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

3.2.3.8 Subzelluläre Fraktionierung

3.2.3.8.1 Mitochondrien/Lysosomen-Fraktionen

Saccharose/EDTA	2 mM	EDTA
	250 mM	Saccharose
Saccharose/Tris	10 mM	Tris/HCl pH 7,4
	250 mM	Saccharose

Von kultivierten Patientenfibroblasten wurden angereicherte Mitochondrien-Lysosomenfraktionen (ML-Fraktionen) hergestellt (Ezaki et al., 1996). Acht konfluent gewachsene 10 cm-Gewebekulturschalen wurden 3 x mit PBS und einmal mit Saccharose/EDTA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 2 x in 1 ml Saccharose/Tris abgeschabt und durch Zentrifugation bei 1.000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml Saccharose/Tris resuspendiert und durch 15 Züge im Dounce-Homogenisator (Stempel A) auf Eis homogenisiert. Nach Abtrennung der Zellkerne durch 2 min Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C wurde das Pellet durch 15 Züge rehomogenisiert und nochmals zentrifugiert, um restliche intakte Zellen noch aufzubrechen. Die Überstände wurden vereinigt und 15 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet mit angereicherten Mitochondrien und Lysosomen wurde in 300 µl A. dest. und Proteaseinhibitorcocktail (Sigma) aufgenommen.

3.2.3.8.2 Fraktionierung mittels Saccharosegradienten

Puffer A	320 mM	Saccharose
	1 mM	NaHCO ₃
	1 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	CaCl ₂
Puffer B	320 mM	Saccharose
	1 mM	NaHCO ₃

Frisches Hirngewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert und in 4 ml Puffer A pro 1 g Gewebe unter Zugabe von 50-fach konzentriertem Inhibitorcocktail aufgenommen. Das Gewebe wurde durch 40 Züge im Dounce-Homogenisator (Stempel A) homogenisiert und 10 min bei 1.400 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde durch 15 Züge in 2 ml Puffer A pro 1 g Gehirn rehomogenisiert. Beide

Überstände wurden vereinigt und 10 min bei 13.800 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet mit den angereicherten Lysosomen, Mitochondrien und Synaptosomen wurde in 2,4 ml Puffer B pro 1 g Hirn und Proteaseinhibitoren resuspendiert und anschließend auf einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten überschichtet. Der Gradient bestand aus drei Schichten mit jeweils 1,3 ml 0,85 M, 1 M und 1,2 M Saccharose. Die Trennung der subzellulären Kompartimente erfolgte durch 2 h Zentrifugation bei 83.000 x g und 4 °C im SW55-Rotor. Die sichtbaren Proteinbanden an den Stufenübergängen wurden abgenommen, wobei die Proteinbanden von oben nach unten als Fraktion 1 bis 3 bezeichnet wurden. Die Fraktionen 1 bis 3 wurden mit 1, 5 ml 0.25 M Saccharoselösung verdünnt und nochmals 30 min bei 100.000 x g und 4 °C im AT4-Rotor zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde in 200 µl 0,1 % Triton X-100 resuspendiert, ebenso das Pellet des Saccharosegradienten selbst (Fraktion 4).

3.2.3.8.3 Herstellung von Gehirngewebehomogenaten und Isolierung des Speichermaterials

Zur Isolierung des Speichermaterials aus OCL6-Schafshirngewebe wurde zunächst die graue Substanz von der weißen Hirnsubstanz manuell mit einem Spatel abgeschabt. Die erhaltenen 2 g graue Substanz wurden mit A. dest. auf ein Volumen von 20 ml gebracht, mit dem Tissue Tearer (Dremel, USA) homogenisiert, anschließend 2 x 20 s bei maximaler Stärke sonifiziert und 1 h bei RT inkubiert. Das Homogenat wurde entweder sofort für Westernblotanalysen verwendet oder 10 min bei 4 °C und 7.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der entstandene braune Ring des Pellets wurde vorsichtig isoliert und in 500 µl A. dest. resuspendiert. Diese Fraktion wurde auf einen linearen Gradienten von 20 % bis 35 % Cäsiumchlorid aufgetragen und 15 h bei 4 °C und 100.000 x g in einem SW41-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das unter der UV-Handlampe fluoreszierende Speichermaterial abgenommen, 1:10 mit A. dest. verdünnt und erneut 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet mit dem Speichermaterial wurde in 1 ml A. dest. gelöst.

3.2.3.8.4 Herstellung von Membranfraktionen und Trypsin-Verdau aus transfizierten BHK-Zellen

Lysispuffer für	1,5 %	Triton X-100
Membranproteine:	1 %	Natriumdesoxycholat
	0,1 %	SDS
	1%	BSA
	0,5 M	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 7,4

Transient transfizierte BHK-Zellen (6 cm²-Platte) wurden nach 24 h 3 x mit 10 mM PBS gewaschen, in 2 x 2 ml 0,25 M Saccharose/10 mM Tris pH 7,4 abgeschabt und durch 5 min Zentrifugation bei 1.000 rpm pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml 0,25 M Saccharose/10 mM Tris pH 7,4 resuspendiert und durch 15 Züge im Dounce-Homogenisator (Stempel A) homogenisiert. Eine Zentrifugation für 2 min bei 1.000 x g und 4°C trennte die Zellkerne ab. Der Überstand wurde 20 min bei 20.000 x g und 4 °C im SS34-Rotor erneut zentrifugiert und das entstandene Pellet wurde in 100 µl 10 mM PBS/5 mM Jodacetamid/2 mM EDTA durch 10 Züge rehomogenisiert. Zu einer Hälfte des Ansatzes wurden 5 µl der Trypsin-Stocklösung (10,76 mg/ml PBS) gegeben und zur anderen Hälfte die entsprechende Menge PBS. Beide Ansätze wurden 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Protein-Auftragspuffer erfolgte die Auftrennung durch SDS-PAGE und die Detektion der Proteine durch Westerblot (3.2.3.5). Alternativ wurden die mit dem MPR300 transfizierten BHK-Zellen nach 24 h über Nacht mit [³⁵S]-Methionin markiert (3.2.2.6), bevor sie für den Trypsin-Verdau vorbereitet wurden. Nach der Inkubation mit Trypsin wurde der Verdau durch Zugabe von 600 µl Lysispuffer für Membranproteine gestoppt und der MPR300 wurde immunpräzipitiert (3.2.2.7).

3.2.3.9 Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese

Rehydrierungspuffer	8 M	Urea
	2 %	Chaps
	0,5 %	IPG-Puffer pH 3-10 (Amersham Pharmacia)

10 x Auftragspuffer	5 %	IPG-Puffer pH 3-10 (Amersham Pharmacia)
	20 %	Chaps
	200 mM	DTT
Äquibrierungspuffer	50 mM	Tris/HCl pH8,8
	6 M	Urea
	30 %	Glycerol
	2 %	SDS

Die getrockneten Streifen (pH 3-10; 11 cm) für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden über 15 h in 200 µl Puffer rehydriert. Die Proteine (0,15 mg) wurden in 10 µl Auftragspuffer und 48 mg Harnstoff in einem Gesamtvolumen von 100 µl gelöst und durch „cup-loading“ auf die IEF-Streifen aufgetragen. Alle Lösungen waren jederzeit mit Cover Fluid überschichtet, um das Ausfallen des Harnstoffs zu verhindern. In der Multiphore II-Kammer wurden die Proteine im IEF-Streifen durch Applikation von 20kVh in drei Stufen (1 Vh bei 300 V, 2800 Vh bei 3500 V und 17,2 kVh bei 3500 V) getrennt. Nach der IEF wurden die Proteine im IEF-Streifen 15 min in Äquibrierungspuffer mit SDS beladen und somit für die zweite Dimension, der Auftrennung nach Masse, vorbereitet. Der Gelstreifen wurde dazu quer auf ein 12,5 – 15 % SDS-PAGE-Gel gelegt.

3.2.3.10 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen erfolgte durch MS-MALDI-TOF. Die Proteine wurden mit Coomassie oder Silber angefärbt und aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Die Analyse erfolgte kommerziell durch die Firma Megamedics in Wedel unter Verwendung des Voyager-DETM PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.2.3.11 Immunhistochemie

In Paraffin eingebettetes Gehirngewebe wurde als 4-10 µm dünne Schnitte auf Objektträger gezogen und von Dr. Jaana Tyynelä, Universität Helsinki, zur Verfügung gestellt. Das Paraffin wurde in verschiedenen Bädern entfernt: 3 x 5 min in Xylene, 2 x 5 min in 99 % Ethanol, 1 x 5 min in 96 % Ethanol, 1 x 5 min in 70 % Ethanol und 3 x 5 min in A. dest. Für die optimale Antigenerkennung wurden die Schnitte durch 4 x 5 min Kochen in der Mikrowelle bei maximaler Stärke in

10 mM Citratpuffer, pH 6, permeabilisiert. Die Schnitte wurden in Citratpuffer abgekühlt, 3 x 5 min in 10 mM PBS gewaschen und 30 min in 5 % BSA in PBS inkubiert. Der primäre Antikörper wurde 1:200 verdünnt in 1 % BSA/PBS und über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS-Bädern 3 x 5 min gewaschen und für 30 min in einer feuchten Kammer mit dem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (1:65 verdünnt in 1 % BSA/PBS) inkubiert. Nachdem die Schnitte erneut 3 x 5 min in PBS-Bädern gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation für 30 min mit den Lösungen A und B, 1:50 verdünnt in PBS, aus dem Vectastain Elite ABC-Reagent-Kit der Firma Vector. Nach weiterem Waschen der Schnitte mit PBS folgte die Detektion durch Inkubation mit der AEC-Lösung der Firma Vector für 5 – 15 min. Die Schnitte wurden 2 x mit A. dest. gespült und 20 s in 1:5 verdünnter Mayers-Hematoxylin-Lösung gefärbt. Überschüssige Farblösung wurde durch intensives Spülen mit A. dest. entfernt. Anschließend wurden die Schnitte mit Vectashield Mounting Medium (Vector) eingebettet.

3.2.3.12 Jodierung von Arylsulfatase A

Jodogen	1 mM	Jodogen (0,8 mg in 577 µl CH ₂ Cl ₂ lösen und 1:3 in CH ₂ Cl ₂ verdünnen)
Elutionspuffer	0,1 %	KJ
	0,05 %	BSA in 10 mM PBS
Boratpuffer	20 mM	Borat pH 8,0
Jodierungsansatz	1 µg	Arylsulfatase A
	100 µCi	Na ¹²⁵ J mit Boratpuffer ad 60 µl

Zur Jodogenbeschichtung wurden Glasspitzröhrchen schräg in einen Rotor eingespannt, 80 µl der Jodogenverdünnung zugegeben und im Stickstoffstrom unter Rotation von Dichlormethan befreit. Beschichtete Glasspitzröhrchen sind bei -20 °C circa 8 Wochen haltbar. Vor Jodierungsbeginn wurde eine 5 ml NAP™-Fertigsäule mit Sephadex G-25 mit 30 ml Elutionspuffer äquilibriert. Der Jodierungsansatz wurde 2 min auf Eis inkubiert und dann in das mit Jodogen beschichtete Röhrchen überführt. Dieses wurde 8 min auf Eis rotiert, und die Reaktion wurde in ein unbeschichtetes Röhrchen überführt. Das Jodogenröhrchen wurde mit 140 µl Boratpuffer nachgespült und das Volumen des Ansatzes durch Zugabe von 300 µl Elutionspuffer auf 500 µl erhöht. Der Reaktionsansatz wurde

auf die G25-Säule zur Entfernung des nichtumgesetzten [¹²⁵J]-Na-Jodids aufgetragen und in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Von den 10 Fraktionen wurde je 1 µl im Gamma-Counter gezählt. Fraktionen, die jodierte Arylsulfatase A enthielten, wurden gepoolt und bei 4 °C gelagert. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die cpm-Zahl der vereinigten Fraktionen berechnet und auf die Gesamtmenge des eingesetzten Proteins bei angenommener verlustfreier Wiederfindung bezogen.

3.2.3.13 [¹²⁵J]-Arylsulfatase A-Endozytoseassay

Kultivierte Kontroll- und OCL6-Schafsfbroblasten wurden 4 h bei 37 °C mit DMEM/ 0,05 % BSA, das 100.000 cpm [¹²⁵J]-Arylsulfatase A (ASA) enthielt, in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P)-Natriumsalz (5 mM) inkubiert. Die M6P-abhängige Aufnahme der ASA wird ausschließlich von dem MPR 300 vermittelt und kann deshalb durch Zugabe von M6P inhibiert werden. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen und oberflächengebundene ASA durch 2 Waschschrte mit M6P-Bariumsalz (2 mM in PBS) für 5 min entfernt. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt und die zellassoziierte Radioaktivität im γ-Counter gezählt. Die Zellen wurden sedimentiert und unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.2.3.14 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Biotinlösung	0,5 mg/ml	Sulfo-NHS-SS-Biotin in 10 mM PBS
Reduktionslösung	50 mM	2-Mercaptoethanesulfat (MESNA)
	100 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8,6
	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
Quenchlösung	1 %	BSA
	5 mg/ml	Jodacetamid in 10 mM PBS

Kultivierte Kontroll- und OCL6-Schafsfbroblasten wurden auf 4 °C abgekühlt, 3 x mit 10 mM PBS gewaschen, 2 x für 15 min mit der Biotinlösung bei 4 °C inkubiert und anschließend 4 x mit 10 mM PBS gewaschen. Je ein Ansatz der Zellen wurde

3 x 30 min bei 4 °C mit dem Reduktionspuffer inkubiert, um gebundenes Sulfo-NHS-SS-Biotin wieder abzuspalten. Danach erfolgte für alle Ansätze eine Inkubation für 20 min bei 4 °C mit der Quenclösung, um freie SH-Gruppen abzusättigen. Nach erneutem Waschen mit 10 mM PBS wurden die Zellen abgeschabt, pelletiert und durch Immunpräzipitation (3.2.2.7) wurde das zu untersuchende Protein gefällt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-Streptavidin-Antikörpern und ECL im Westernblot analysiert (3.2.3.5).

4 ERGEBNISSE

4.1 Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese

Die zwei-dimensionale (2D)-Gelelektrophorese trennt Proteine in der ersten Dimension aufgrund ihres isoelektrischen Punktes (pI) in einem immobilisierten pH-Gradienten auf. Danach erfolgt die Separation der zuvor mit SDS beladenen Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes durch SDS-PAGE (zweite Dimension).

Wenn die 2D-elektrophoretische Auftrennung von Extrakten aus angereicherten Lysosomen und Mitochondrien (ML-Fraktionen) von humanen Fibroblasten (3.2.3.8.1) gemäß der Angaben des Herstellers Pharmacia durchgeführt werden (Berkelman & Stenstedt, 1998), nach denen die Proteine in den Rehydrierungspuffer gegeben werden und die isoelektrische Fokussierung (IEF) nach 11 – 15 kVh beendet ist, war die Wiederfindung der eingesetzten Proteine gering. Um eine mögliche Degradation während der langen (16 h) Rehydrierungszeit auszuschließen, wurden die Proteine durch „cup-loading“ erst während der ersten Dimension aufgetragen. Es konnte mit Hilfe eines IEF-Standards gezeigt werden, daß die Proteine nach „cup-loading“ im IEF-Streifen intensiver anfärbbar waren. Zusätzlich hat sich eine Verlängerung der Fokussierungszeiten auf 20 kVh als günstiger für die Auflösung der zu trennenden Proteingemische erwiesen. Die üblicherweise angewandte Fixierung der IEF-Streifen mit Agarose auf den SDS-PAGE-Gelen behindert den Transfer der hier untersuchten Proteine von der ersten in die zweite Dimension. In allen weiteren Untersuchungen wurden die Proteinextrakte (0,15 mg Protein) durch „cup-loading“ auf die IEF-Streifen (pH 3-10) geladen, wobei die IEF nach der Applikation von 20 kVh beendet wurde. Die Proteine in den Streifen wurden danach durch SDS-PAGE (12,5–15 % Acrylamid) inklusive 4 % igem Sammelgel getrennt.

Die Proteinextrakte sollten direkt nach der Präparation verwendet werden, da nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen von ML-Fraktionen, aber auch von anderen Proben eine Abschwächung der Signalintensität nach 2D-Elektrophorese und Silberfärbung zu beobachten war.

Um die Reproduzierbarkeit der Proteinmuster nach der 2D-Elektrophorese und Silberfärbung zu bestimmen, wurden lysosomale Fraktionen (F4) aus Hirngewebe von 23 Tage alten Mäusen, die parallel oder an verschiedenen Tagen präpariert wurden, durch unabhängige 2D-Elektrophorese und Silberfärbung analysiert. Es konnten Proteine in einem pH-Bereich von 4,5 bis 10 und einer molaren Masse von 66 bis wenigen kDa festgestellt werden. Einige, stellvertretend für viele, in Abb. 1 umrandete Proteinmuster lassen sich leicht in beiden Präparationen wiederfinden. So sind z.B. die Proteinmuster in (a), (d) und (e) zwar bei beiden Präparationen der Wildtyp-Mäuse als auch beim Material der CtsD-defizienten Maus gleich, aber die Intensitäten der einzelnen Spots in diesen Mustern unterscheiden sich teilweise. Beim Muster (b) und (f) sind sowohl die Verteilung der Spots, als auch ihre relativen Intensitäten gleich. Einige Proteine sind in der Präparation 2 nicht nachweisbar (z.B. Pfeil g und Muster c und h) und andere lassen sich nicht in der Präparation 1 detektieren (z.B. Pfeil i). Insgesamt gibt es jedoch mehr Übereinstimmungen bei paralleler Präparation (WT Präp. 1 und CtsD-/- Präp. 1) und 2D-Elektrophorese und die Unterschiede im Proteinmuster sind durch die Defizienz des CtsD bedingt.

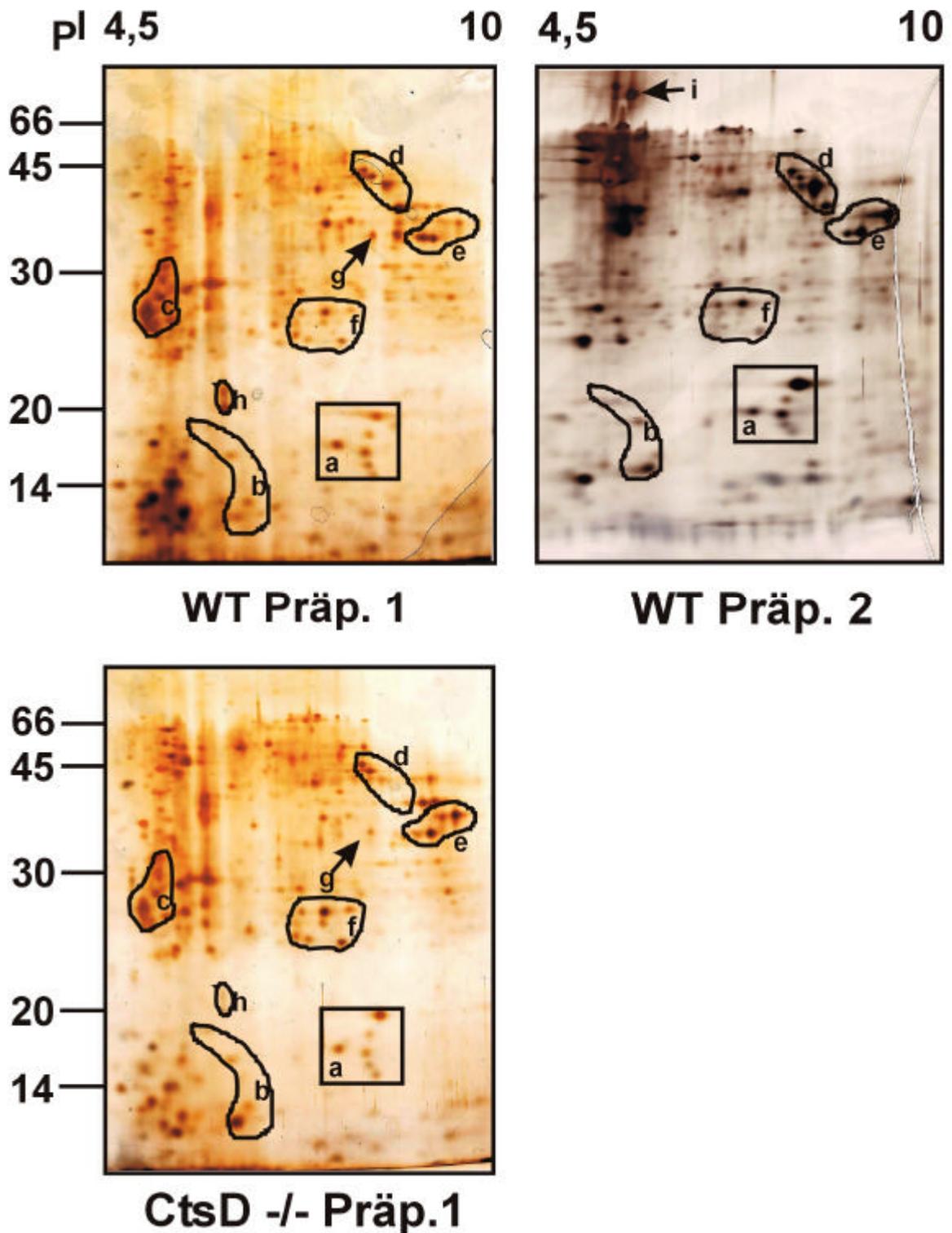


Abbildung 1: Reproduzierbarkeit von zwei-dimensionaler elektrophoretischer Auftrennung von Proteingemischen.

F4-Fractionen (0,15 mg Protein) wurden von 23 Tage alten Wildtyp (WT)- und CtsD-defizienten (CtsD^{-/-}) - Maushirnen hergestellt (Prap. 1). Zusätzlich wurde das Hirn einer weiteren Wildtyp-Maus im gleichen Alter aus einem anderen Wurf und zu einem anderen Zeitpunkt präpariert (Prap. 2). Die F4-Fractionen der Wildtyp Präparation (WT Prap. 1 und 2) wurden unabhängig voneinander durch 2D-Elektrophorese aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Die WT und CtsD^{-/-} Präparationen wurden unter identischen Bedingungen präpariert und durch 2D-Elektrophorese und Silberfärbung analysiert. Die Positionen des Molekulargewichtstandards sind gekennzeichnet. Gleiche Proteinmuster sind umrandet und unterschiedliche Spots mit einem Pfeil gekennzeichnet.

4.2 Proteinanalyse von kultivierten CLN6-Fibroblasten und Geweben

4.2.1 Vergleich der Proteinmuster von Kontrollen und CLN6/OCL6-Fraktionen

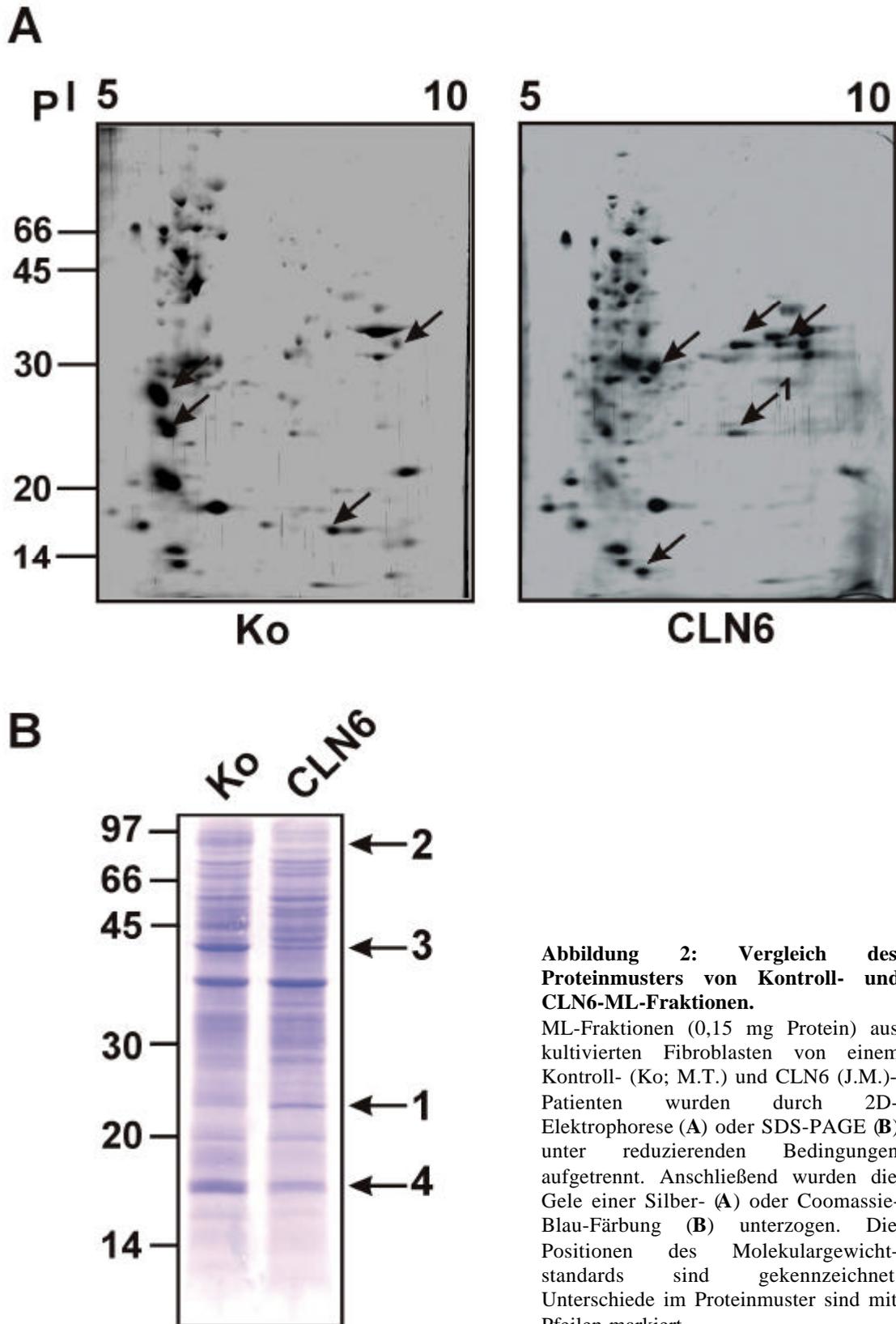
In Zellen und Geweben von CLN6-Patienten kommt es zu einer Akkumulation der mitochondrialen c-Untereinheit der ATP-Synthase (sub c) in den Lysosomen (Palmer et al., 1992; Palmer et al., 1989). Während die Speicherung von sub c in den meisten Zellen, z.B. auch in kultivierten Fibroblasten der Patienten beobachtet werden kann, sind nur die Neuronen von Degenerationsprozessen betroffen.

Um den Pathomechanismus der CLN6-Erkrankung besser zu verstehen, wurde zunächst das Proteinmuster von Mitochondrien- und Lysosomen- (ML) Fraktionen (Ezaki et al., 1996) aus kultivierten Hautfibroblasten eines CLN6-Patienten (J.M.) mit denen eines Kontrollpatienten (M.T.) verglichen. Wie in Abb. 2A zu sehen ist, gibt es beim CLN6-Material nach 2D-Elektrophorese diverse Unterschiede im Proteinmuster im Vergleich zu den Proben von Kontrollzellen (Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet). Unterschiede lassen sich jedoch auch durch einfache SDS-PAGE-Auftrennung erkennen (Abb. 2B; markiert durch nummerierte Pfeile).

Anschließend wurden verschiedene Proteinspots aus 2D-Gelen bzw. Proteinbanden aus 1D-SDS-PAGE-Gele ausgeschnitten (Abb. 2A und B; Nr. 1-4). Nach Trypsinverdau und Gelextraktion wurden die Peptide durch MS-MALDI-TOF analysiert. Die erhaltenen Peaks der Peptidmassen wurden mit Hilfe des Programms MS-Fit/ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu>) mit der Swiss-Prot.010501-Datenbank verglichen.

Der Spot Nr. 1, dessen Menge in Patientenmaterial stark erhöht ist, wurde als Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase (MnSOD) identifiziert (Abb. 2A). MnSOD ist ein mitochondriales Protein von 24,5 kDa, das als Radikalfänger für Superoxidanionen dient (Macmillan-Crow & Cruthirds, 2001). Auch nach 1D-Auftrennung konnte eine in Patientenmaterial mengenmäßig erhöhte Bande bei etwa 25 kDa nachgewiesen werden, die ebenfalls als MnSOD identifiziert wurde

(Abb. 2B). Andere, nur mit Pfeil gekennzeichnete Proteinspots ergaben keine auswertbaren Ergebnisse bei der Massenspektrometrie.



Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Westernblots mit anti-MnSOD-Antikörpern von zweidimensional aufgetrennten ML-Fractionen aus kultivierten Fibroblasten von Kontroll- und CLN6-Patienten durchgeführt. Wie Abb. 3 zeigt, ist nach densitometrischer Auswertung die Menge an MnSOD-immunreaktivem Material tatsächlich in CLN6-Patienten um den Faktor 18 erhöht im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der nach 2D-Elektrophorese bestimmte pI von 7,7 stimmt mit dem theoretischen pI von MnSOD überein.

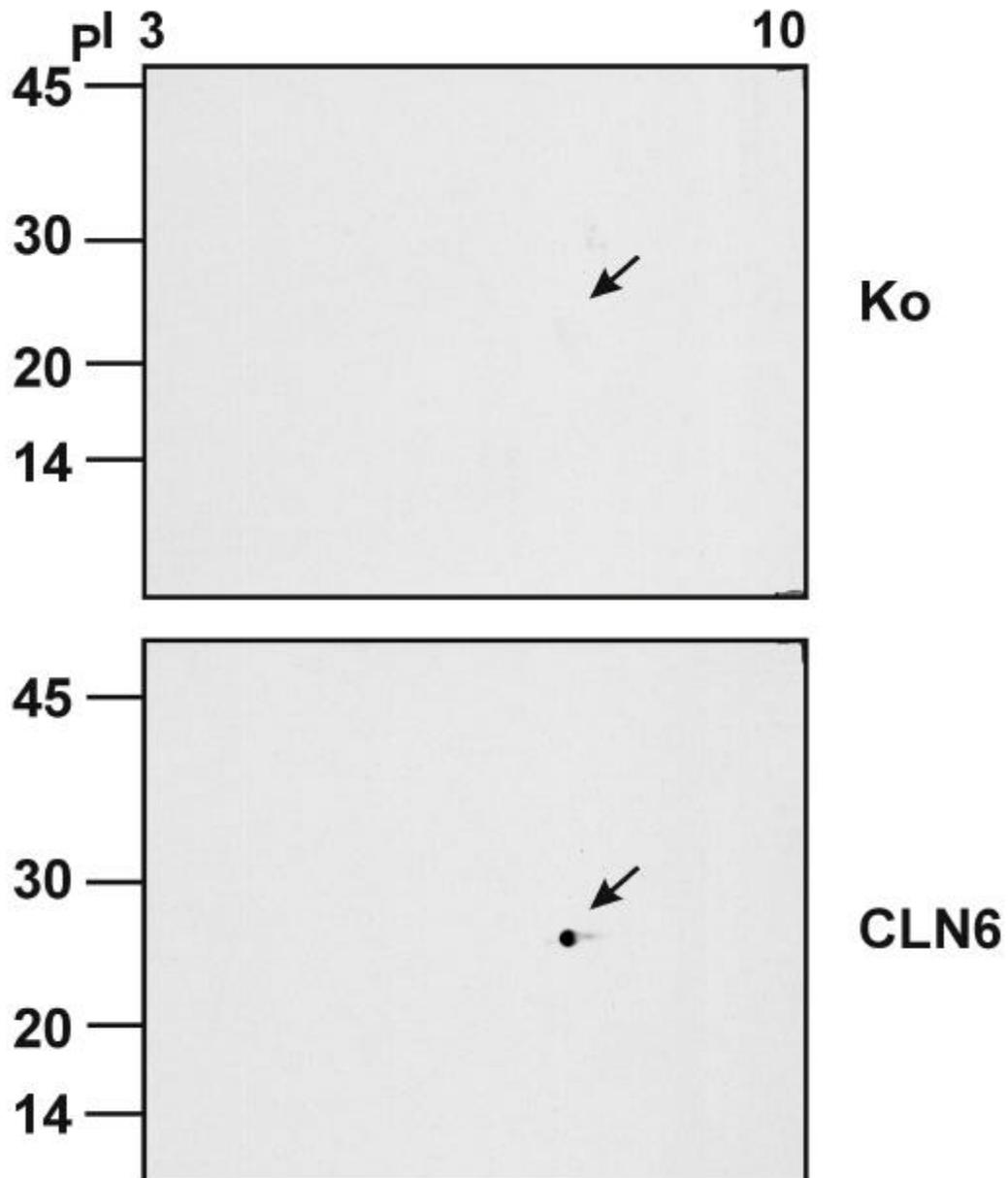


Abbildung 3: MnSOD-Westernblot von ML-Fractionen aus kultivierten Fibroblasten von Kontroll- und CLN6-Patienten.

Extrakte aus ML-Fractionen (0,15 mg Protein) von Kontroll- (Ko; M.T.) und CLN6 (J.M.)-Patientenfibroblasten wurden durch 2D-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach Inkubationen mit dem anti-MnSOD-Antiserum (1:500) für 2 h und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT, wurden die gebundenen Antikörper mit ECL sichtbar gemacht.

Erhöhte Mengen an MnSOD-immunreaktivem Material konnten in ML-Fractionen aus kultivierten Fibroblasten von zwei weiteren, nicht verwandten CLN6-Patienten (M.P. und M.S.) aus Tschechien im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 4A). Die densitometrische Auswertung des Blots ergab eine 5,2- bis 6-fache Steigerung des MnSOD immunreaktiven Materials in CLN6-Patienten. Dagegen ist die Menge an Lamp1, einem lysosomalen Transmembranprotein, in den ML-Fractionen aller untersuchten Patienten und Kontrollen gleich. (Abb. 4B).

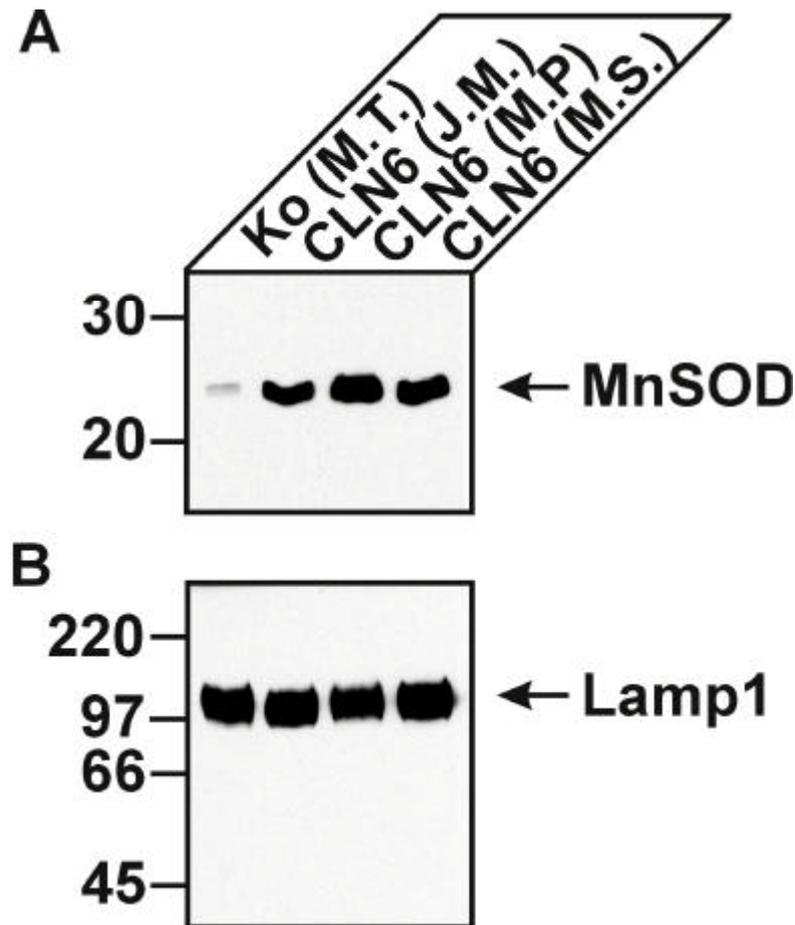


Abbildung 4: MnSOD-Westernblot von ML-Fractionen aus Fibroblasten von verschiedenen CLN6-Patienten.

Proteine aus ML-Fractionen (30 µg Protein) kultivierter Kontroll- (Ko; T.M.) und Patientenfibroblasten (CLN6; J.M., M.P., M.S.) wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran gebettet und mit anti-MnSOD-Antikörpern (A) oder anti-Lamp1-Antikörpern (B) und ECL analysiert.

Um die Spezifität der erhöhten MnSOD-Spiegel von CLN6-Patienten zu untersuchen, wurden ML-Fractionen aus Fibroblasten von einem CLN2 (M.G.)- und zwei CLN3-Patienten (J.E. und C.C.) analysiert. Weiterhin wurden Lysosomen-angereicherte F4-Fractionen aus Hirnhomogenaten Cathepsin D (CtsD)-defizienter Mäuse auf den Gehalt an MnSOD untersucht. Wie Abb. 5 zeigt, ist die Proteinmenge von MnSOD ausschließlich in Fibroblasten von CLN6-Patienten erhöht.

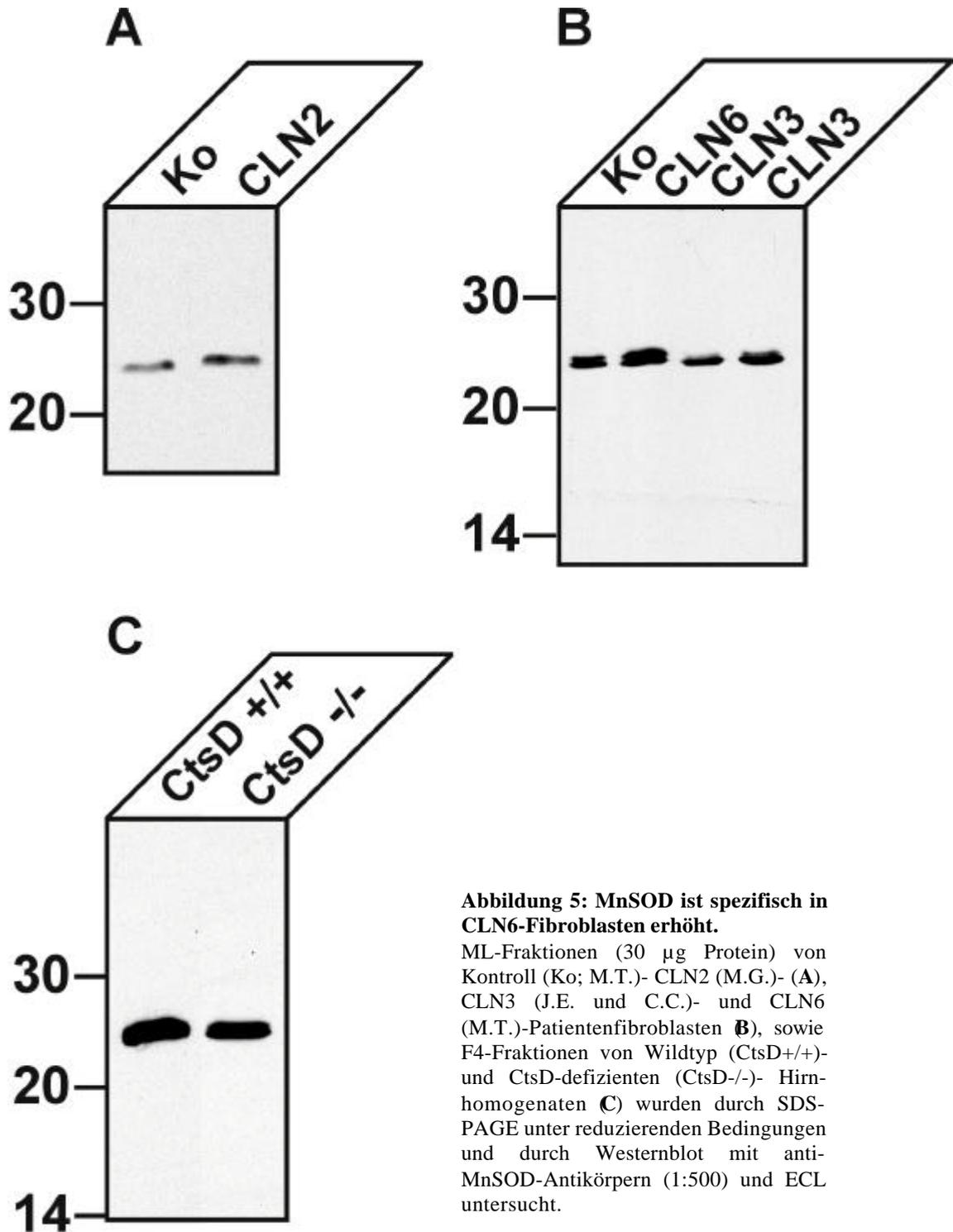


Abbildung 5: MnSOD ist spezifisch in CLN6-Fibroblasten erhöht.

ML-Fraaktionen (30 µg Protein) von Kontroll (Ko; M.T.)- CLN2 (M.G.)- (A), CLN3 (J.E. und C.C.)- und CLN6 (M.T.)-Patientenfibroblasten (B), sowie F4-Fraaktionen von Wildtyp (CtsD+/+) und CtsD-defizienten (CtsD-/-)- Hirnhomogenaten (C) wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und durch Westernblot mit anti-MnSOD-Antikörpern (1:500) und ECL untersucht.

Bei der Analyse einer Probe grauer Substanz aus dem Hirn eines 8-jährigen CLN6-Patienten konnte das Ergebnis aus den Fibroblasten bestätigt werden. Die MnSOD immunreaktive Proteinmenge ist im CLN6-Hirnhomogenat um etwa 7-fach erhöht (Abb. 6A). Dagegen bleibt die Menge an einem anderen mitochondrialen Enzym, die Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase (GPDH), in CLN6-Homogenaten unverändert (Abb. 6B).

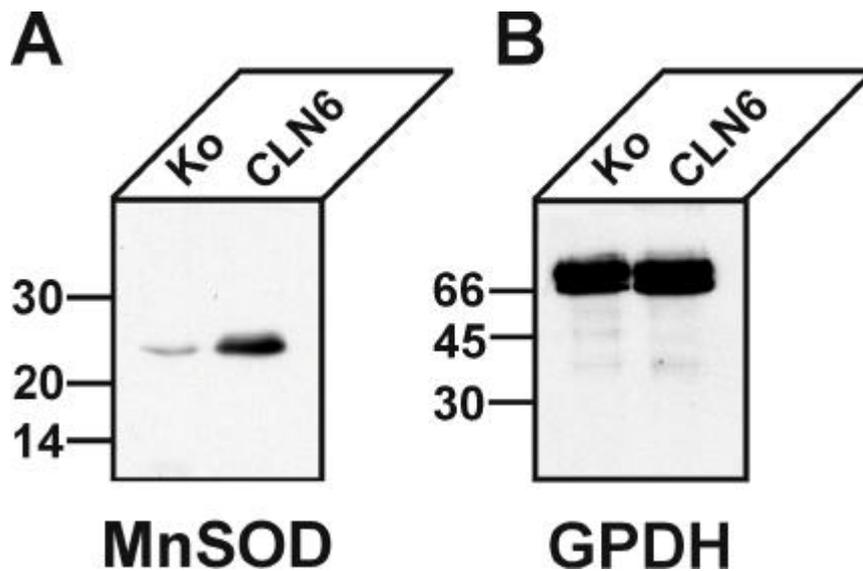


Abbildung 6: Gesteigerte MnSOD-Spiegel im Hirn eines CLN6-Patienten.

Die Hirnhomogenate (30 µg Protein) von gleichaltrigen Kontroll- (Ko) und CLN6-Patienten wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert. Der anti-MnSOD-Antikörper (1:500) (A) und das anti-GPDH-Antiserum (B) wurden durch HRP-gekennzeichnete Sekundärantikörper und ECL detektiert.

Für die CLN6-Erkrankung sind zwei natürlich entstandene Schafsmodelle beschrieben worden, die OCL6-Southhampshire-Schafe aus Neuseeland und die OCL6-Merino-Schafe aus Australien (Broom et al., 1998; Cook et al., 2002). Klinische und biochemische Analysen haben ergeben, daß diese Tiere die gleichen Symptome zeigen wie die CLN6-Patienten. Auch bei den Schafen kommt es zur Akkumulation der sub c (Palmer et al., 1990; Palmer et al., 1992; Palmer et al., 1989).

ML-Fractionen aus Hautfibroblasten eines 18 Monate alten, an OCL6 erkrankten Southhampshire-Schaf und eines gleichaltrigen gesunden Schafes wurden über 2D-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend im Westernblot untersucht. Die Menge an MnSOD ist in den ML-Fractionen von OCL6-Zellen nach densitometrischer Auswertung 20-fach erhöht im Vergleich zum Kontrollmaterial (Abb. 7). Bei der OCL6-Probe läßt sich noch ein zweiter Spot mit einem etwas saureren pI von 7.6 mit dem anti-MnSOD-Antikörper detektieren, der nicht in der Kontrolle zu finden ist.

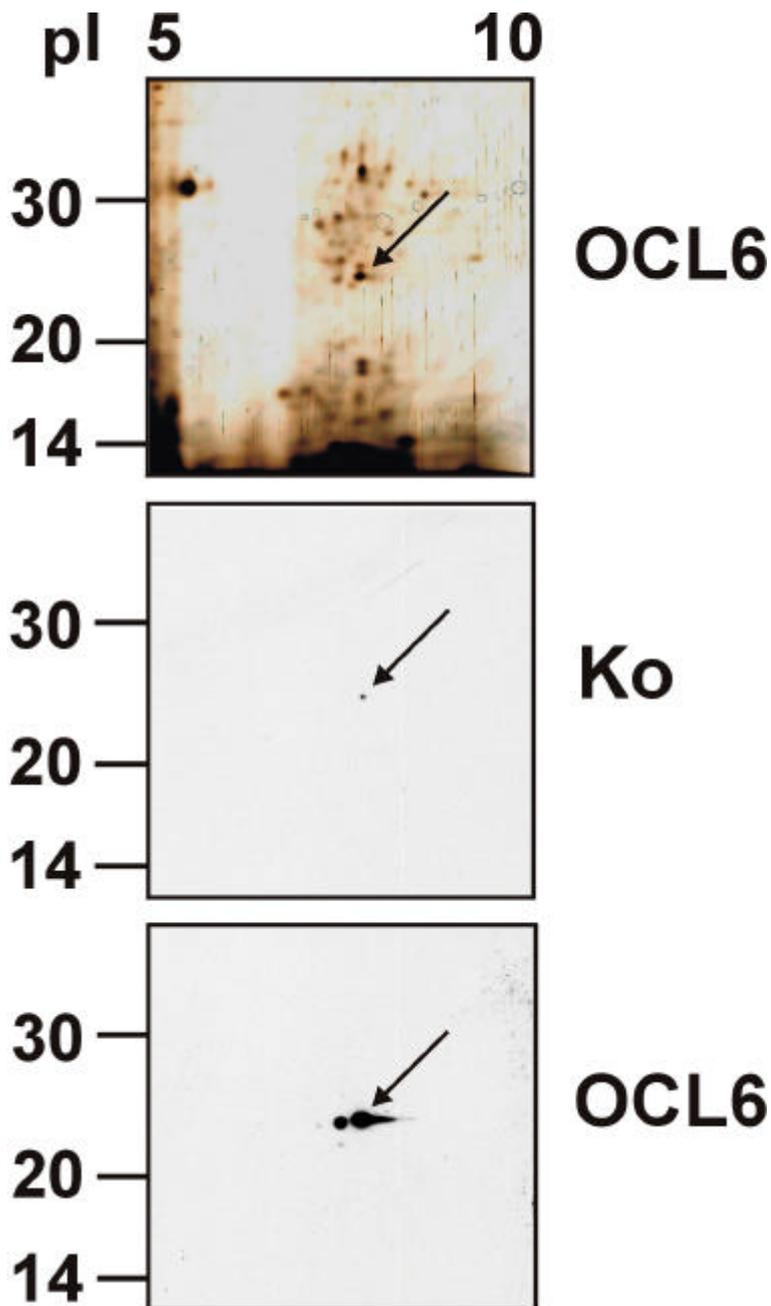


Abbildung 7: MnSOD-Westernblotanalyse in ML-Fractionen von OCL6-Fibroblasten.

Je 0,15 mg Protein der ML-Fractionen von Kontroll- (Ko) und OCL6-Schafsfibroblasten wurden zweidimensional gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen (oben) oder auf Nitrocellulosemembran transferiert. MnSOD wurde durch Westernblot und ECL nachgewiesen. Die Pfeile zeigen das MnSOD-Signal im Silbergel von OCL6-Material (oben) oder auf der Nitrocellulosemembran nach Westernblot an.

Bei der einfachen eindimensionalen Auftrennung der ML-Fractionen durch SDS-PAGE läßt sich densitometrisch eine 8-fache Steigerung der MnSOD in erkrankten OCL6-Schafsfibroblasten feststellen (Abb. 8).

Westernblotanalyse von Homogenaten aus Hirn (Cortex)- und Lebergewebe nach 2D-elektrophoretischer Trennung zeigte in beiden Organen von OCL6-Schafen (17 Monate alt) densitometrisch stark erhöhte Mengen (6,5-fach im Hirnhomogenat und 4,4-fach in Leberhomogenaten) an MnSOD immunreaktivem Material (Abb. 9A und B).

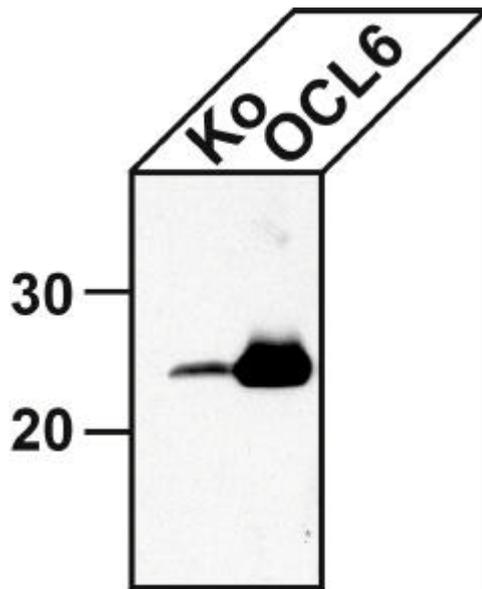
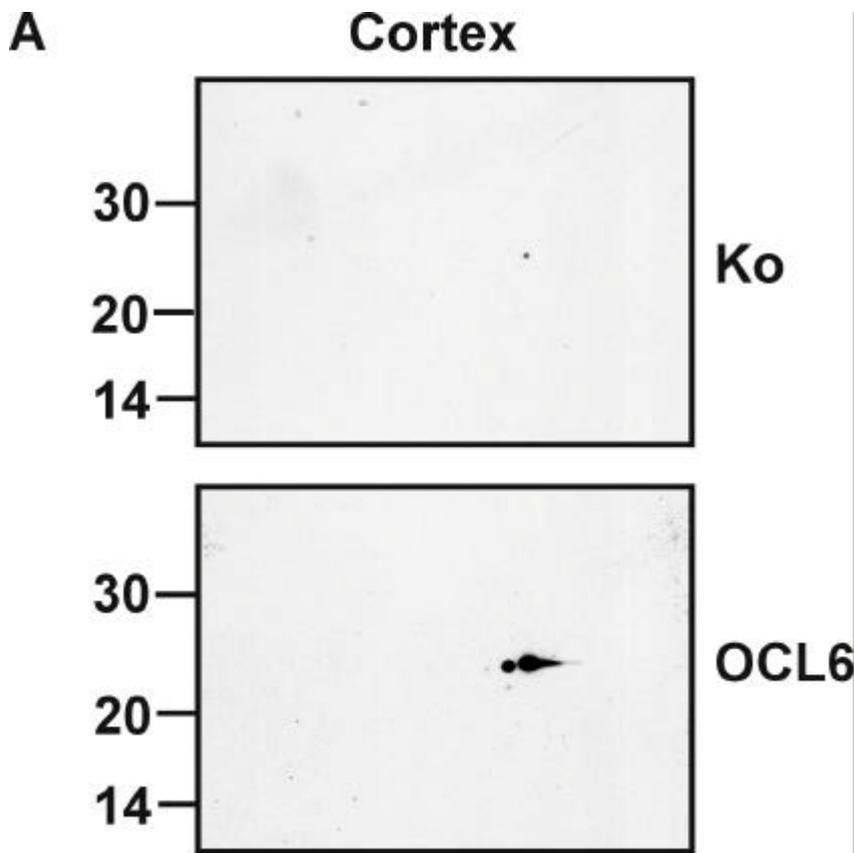


Abbildung 8: MnSOD-Westernblot von Kontroll- und OCL6-Schafszellen.

ML-Fractionen (30 µg Protein) von kultivierten Kontroll- (Ko) und OCL6-Schafsfibroblasten wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot auf die Anwesenheit von MnSOD getestet.

Ähnlich wie bei der Analyse des Fibroblastenmaterials (Abb. 7) sind auch im Hirngewebe von OCL6-Schafen zwei Isoformen mit ungefähren pI-Werten von 7,6 und 7,7 nachweisbar (Abb. 9A). Bei der Analyse des Lebergewebes waren dagegen sowohl bei Kontrollen als auch beim OCL6-Schaf drei MnSOD-Isoformen detektierbar (Abb. 9B).



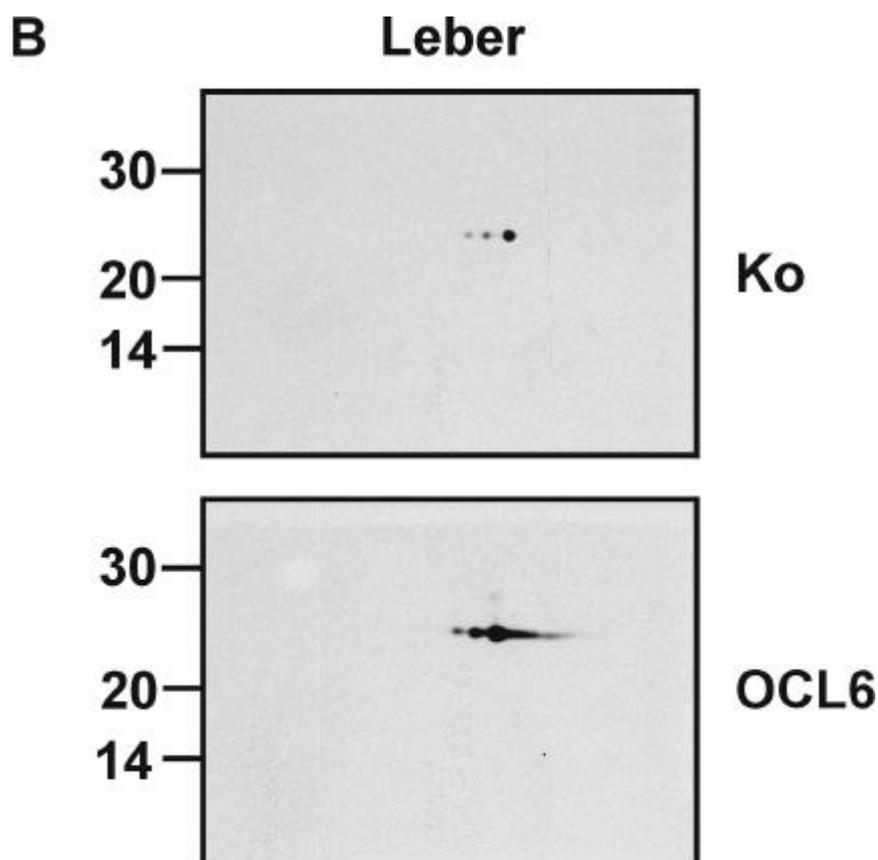


Abbildung 9: MnSOD-Westernblotanalyse von Proteinextrakten aus Hirn- und Lebergeweben von OCL6-Schafen.

Homogenate (0,15 mg Protein) von cerebralem Cortex (A) und Leber (B) von 17 Monate alten Kontroll (Ko)- und OCL6-Schafen wurden zweidimensional aufgetrennt und auf die Präsenz von MnSOD durch Westernblot und ECL untersucht.

4.2.2 Charakterisierung der Erhöhung des MnSOD

Um zu untersuchen, ob das zusätzlich in CLN6-Patienten vorhandene MnSOD-Protein enzymatisch aktiv ist, wurden zwei verschiedene Aktivitätsassays durchgeführt. Zum einen wurde die MnSOD-Aktivität nach elektrophoretischer Auftrennung von nativen (nicht gekochten) ML-Fraktionen im Gel sichtbar gemacht (Beauchamp & Fridovich, 1971). Dabei wurden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine zunächst renaturiert. Anschließend wurde das Gel in Nitro-Blue-Tetrazolium (NBT) und dann in einer Riboflavinlösung inkubiert, die an der Luft Superoxidanionen produziert, die das NBT reduzieren. Die Aktivität der MnSOD wird als Inhibition der NBT-Reduktion dargestellt. Abb. 10A zeigt eine nicht durch NBT gefärbte Bande von etwa 80 kDa, die einem MnSOD-Komplex entsprechen muß. Sowohl in ML-Fraktionen von CLN6- als auch von OCL6-Fibroblasten ist die Inhibition der Blaufärbung durch NBT-Reduktion im Gel deutlicher (2- bzw. 3,5-fach nach Densitometrie) nachweisbar.

Zum anderen wurde die Aktivität der MnSOD in einem photometrischen Test, der auf dem gleichen Prinzip beruht (Oberley et al., 1987), gemessen (Abb. 10B).

Sowohl in humanen CLN6-ML-Fractionen als auch im entsprechenden OCL6-Material war im Vergleich zu den jeweiligen ML-Fractionen aus kultivierten Kontrollfibroblasten eine deutliche Zunahme (2,1- bzw. 3,4-fach) der MnSOD-Aktivität zu beobachten.

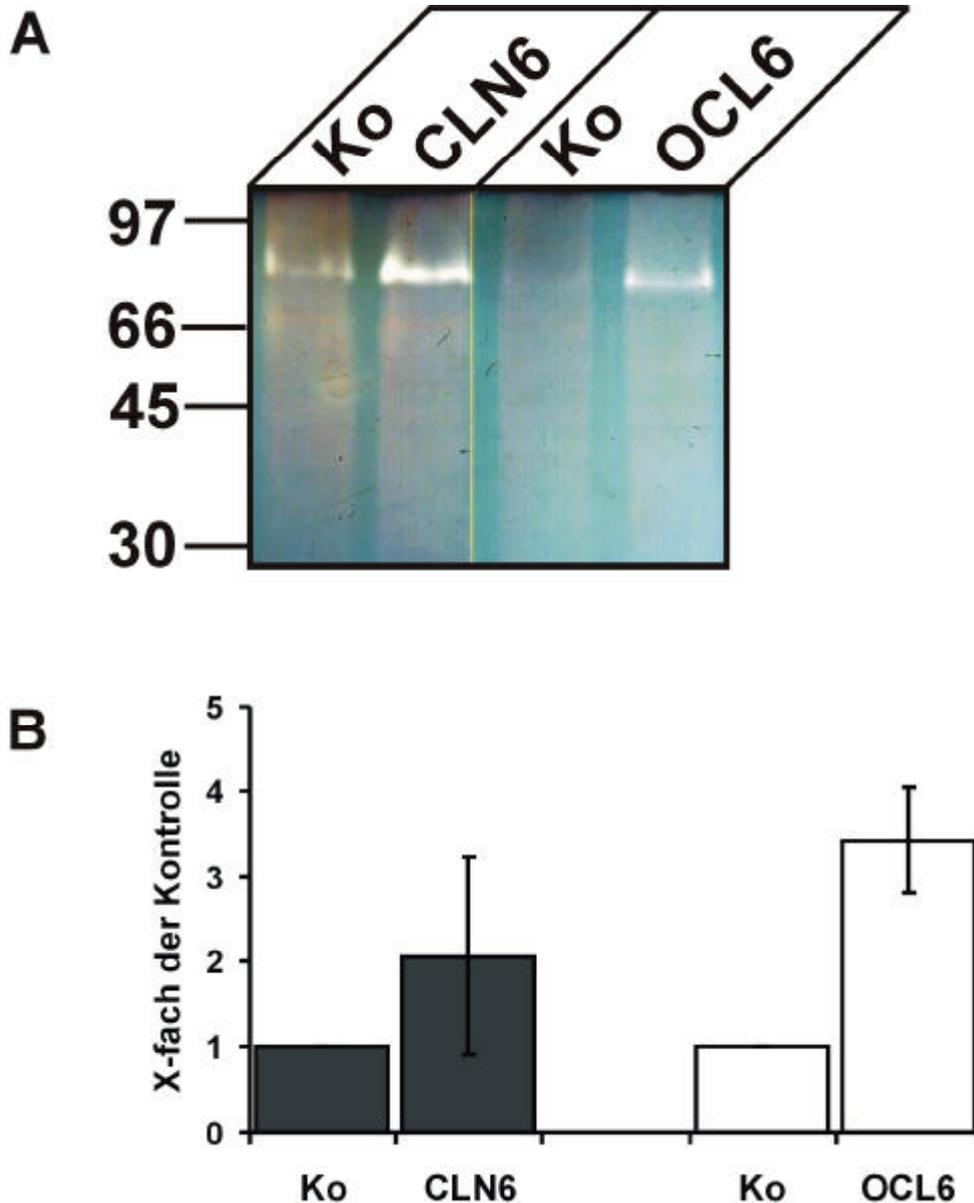
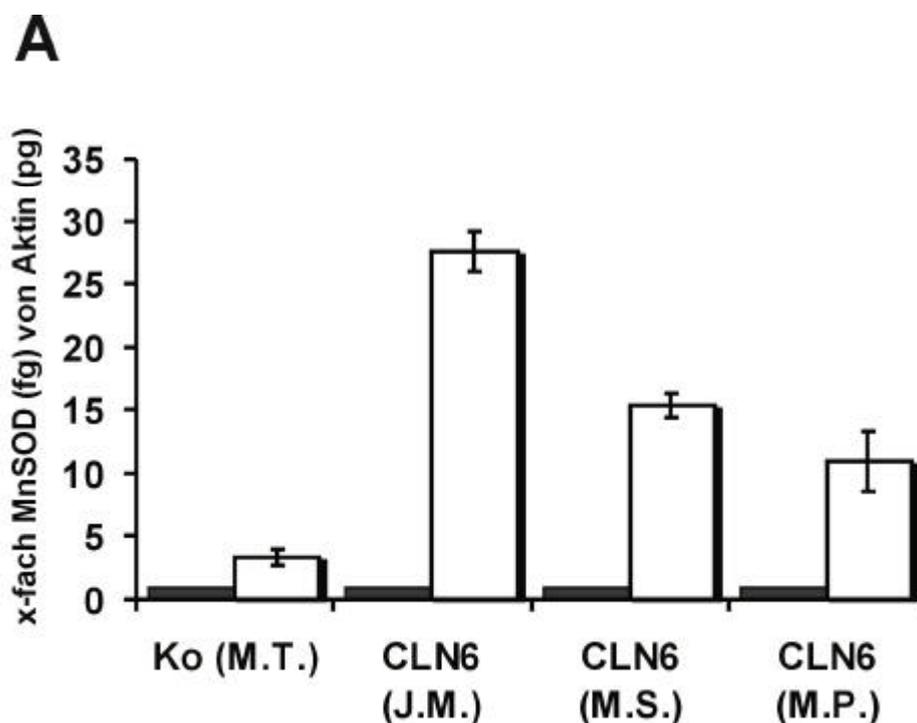


Abbildung 10: MnSOD-Aktivitätsbestimmung in ML-Fractionen von CLN6- und OCL6-Fibroblasten. Je 30 µg Protein von ML-Fractionen aus Kontroll- (Ko; M.T.) und CLN6- (J.M.) Patientenfibroblasten und dem entsprechenden Kontroll (Ko)- und OCL6-Schafsmaterial wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen und ohne vorheriges Kochen durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Renaturierung der Proteine im Gel, erfolgte die Detektion der MnSOD-Aktivität als Funktion der Nitro-Blue-Tetrazolium-Inhibition. Die Cu/Zn-abhängige SOD1 wurde durch Zugabe von 0,33 M Natriumcyanid in den Reaktionspuffer inhibiert (A). Photometrische Bestimmung der Aktivität von MnSOD in den gleichen ML-Fractionen. Je 30 µg Protein wurden eingesetzt. Der Mittelwert (n=3) der Kontroll-Fractionen wurde auf 100 % gesetzt (B).

Bei einem vorläufigen Experiment wurde die Malondialdehyd (MDA)-Konzentration in Fibroblastenextrakten einer Kontrolle (M.T.) und von zwei verschiedenen CLN6-Patienten bestimmt, die als ein Abbauprodukt der Lipidoxidation, als Maß für die erhöhte MnSOD-Aktivität gewertet werden kann. Der MDA-Gehalt war in den beiden Zellextrakten der CLN6-Patienten 1,5- bis 2- fach erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

Der erhöhte Gehalt an MnSOD-Protein in Extrakten von Fibroblasten und Geweben aus CLN6 Patienten kann auf eine erhöhte Expression oder auf einen verminderten Abbau zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde die Menge der MnSOD-mRNA in Fibroblasten von einem Kontroll- und verschiedenen CLN6-Patienten durch Real Time RT-PCR im Light Cycler bestimmt. Dazu wurden die Mengen an MnSOD auf die Mengen an β -Actin (Abb. 11A) oder auf die der Cu/Zn-abhängigen SOD1 bezogen (Abb. 11B). Die Menge an MnSOD mRNA ist in drei unterschiedlichen CLN6-Patienten in Bezug auf β -Actin um das 3- bis 15- fache erhöht. Bezogen auf die Cu/Zn-abhängige SOD1 ist der Gehalt an MnSOD-mRNA 12- bis 23-fach erhöht, d.h. die erhöhte MnSOD-Proteinmenge ist auf eine gesteigerte Expression zurückzuführen.



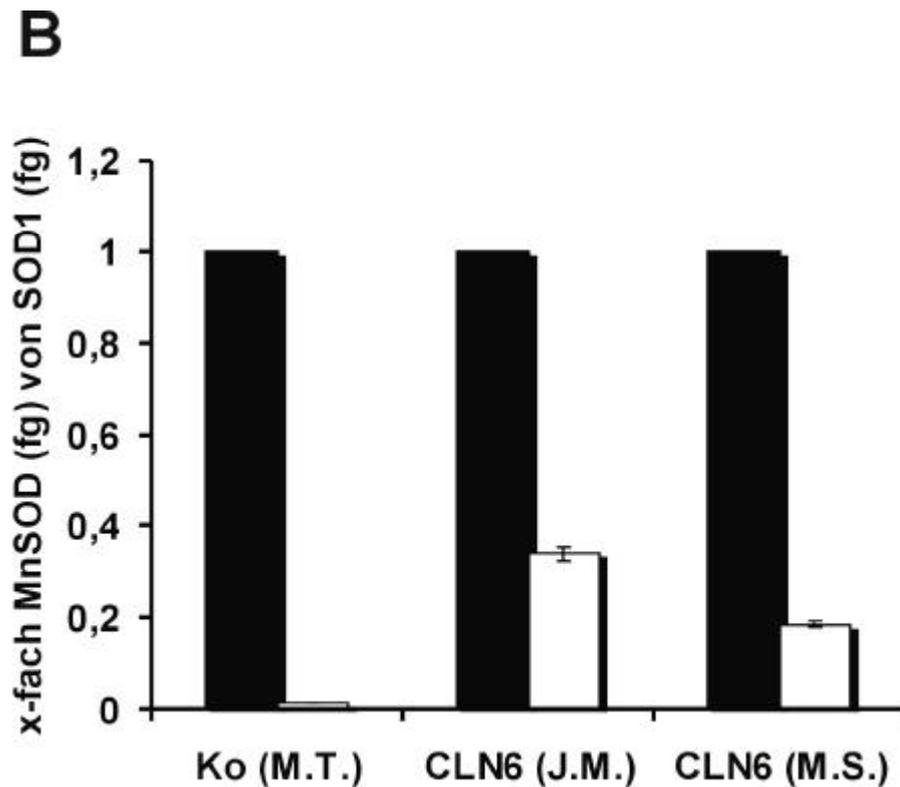


Abbildung 11: Die Transkriptionsrate der MnSOD ist in CLN6-Patientenfibroblasten im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

Total-RNA wurde aus Fibroblasten von einem Kontroll- (Ko; M.T.) und drei CLN6-Patienten (J.M.; M.S.; V.P.) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die quantitative PCR wurde wie in 3.2.1.11 beschrieben durchgeführt. Die Menge an β -Actin-mRNA in pg (A) oder SOD1-mRNA in fg (B) wurde als 1 und die MnSOD-mRNA in fg in Bezug gesetzt. Die Graphik zeigt den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Als Standardreihe dienten verschiedene Verdünnungen des PCR-Produktes für MnSOD, SOD1 und β -Actin.

4.2.3 Lokalisation von MnSOD in Gehirngewebe und Fibroblasten

Um festzustellen, ob mitochondriale MnSOD ähnlich wie die mitochondriale sub c in Lysosomen der Patientenzellen gespeichert wird und aus diesem Grund in gesteigerten Mengen vorhanden ist, wurden aus Cortexmaterial eines Kontroll- und eines OCL6-Schafes Speichermaterial isoliert. Die unter UV-Licht autofluoreszierende Fraktion wurde im Westernblot auf das Vorhandensein von sub c (Abb. 12A) und MnSOD (Abb. 12B) untersucht. Es wird deutlich, daß MnSOD nicht in der mit sub c- angereicherten Fraktion zu finden ist.

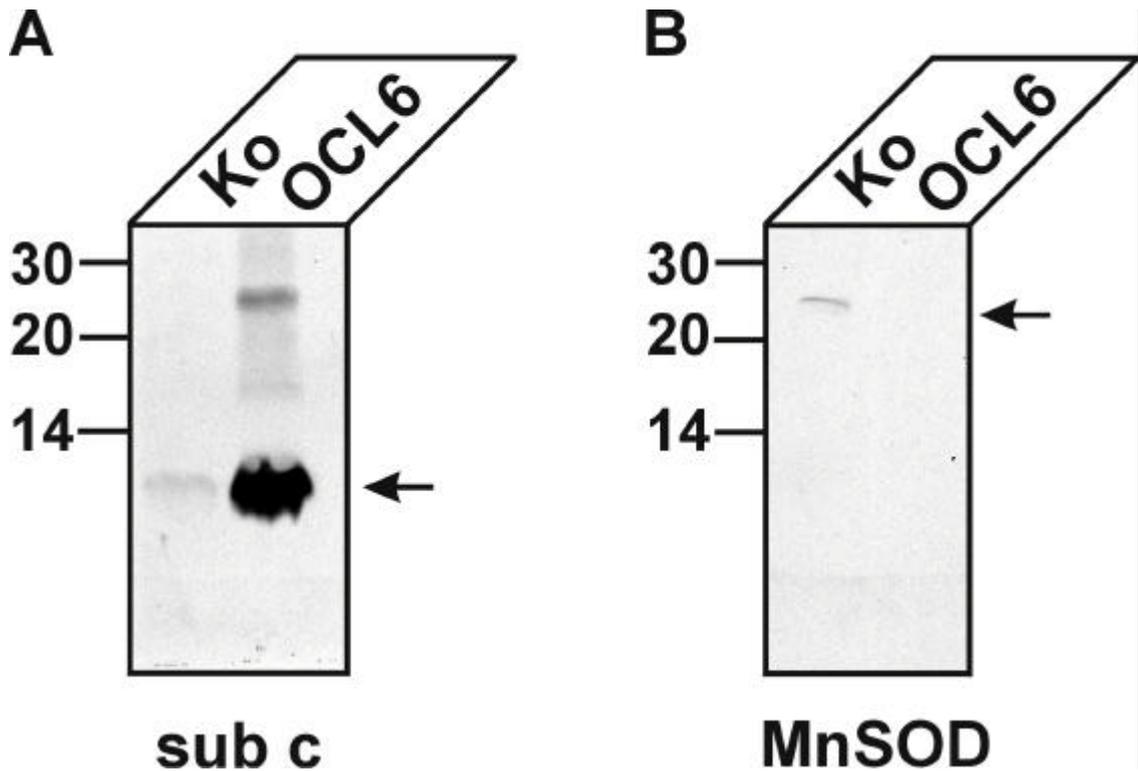


Abbildung 12: MnSOD liegt nicht im sub c-positiven Speichermaterial vor.

Eine autofluoreszierende Fraktion wurde aus OCL6-Cortexmaterial unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (17 % Acrylamid) getrennt. Aus cerebralem Cortex eines Kontrollschafes (18 Monate) wurde die Fraktion unter gleichen Bedingungen isoliert und gleiche Volumina einer entsprechenden Gradientenfraktion aufgetragen. Nach dem Transfer auf Nitrocellulosemembran erfolgte der Westernblot für sub c (A) oder für MnSOD (B). Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper und ECL.

Durch immunhistochemische Analysen wurde die Lokalisation der MnSOD genauer bestimmt. Dazu wurden 4 bis 10 μm dünne Paraffinschnitte von verschiedenen Gehirnarealen eines CLN6-Patienten, eines OCL6-Schafes und von den jeweiligen Kontrollen bzw. eines CLN5-Patienten mit MnSOD-Antikörpern gefärbt. Im frontalen Cortex von Kontrollschnitten zeigte sich ein granuläres zytoplasmatisches Signal, das mit einer mitochondrialen Lokalisation übereinstimmt (Abb. 13A und C). MnSOD war in den Neuronen, v.a. in den großen Neuronen der tiefen corticalen Schichten, zu finden. Es ist jedoch auch vereinzelt in Gliazellen detektierbar. Innerhalb der weißen Substanz konnte sowohl in den Gliazellen als auch im Neuropil eine punktförmige Färbung von MnSOD beobachtet werden, wobei die Intensität der Färbung in den Schnitten von CLN6-Patienten stärker war als in den Kontrollschnitten (Abb. 13B und D). Zudem waren auch hypertrophe Astrozyten im cerebralen Cortex stark gefärbt. Im Gegensatz dazu zeigten die verbleibenden Neuronen in den CLN6-Schnitten zwar große Mengen an Speichermaterial, aber nur geringe Mengen an MnSOD. Das

Speichermaterial selbst zeigte keine Immunreaktivität bei Färbung mit dem anti-MnSOD-Antikörper, während das angefärbte MnSOD-haltige Material eher durch das Speichermaterial an den Rand der Neuronen gedrängt wurde.

Das stärkste Signal mit dem anti-MnSOD-Antikörper konnte in den CLN6-Schnitten in reaktiven Astrozyten auf der Pons-Ebene der Corticospinal-Trakte festgestellt werden (Abb. 13F). Dieses Signal war dagegen weder in den normalen Kontrollen noch in Hirnschnitten eines CLN5-Patienten detektierbar (Abb. 13E).

Zwischen Kontroll- und OCL6-Schafsgehirnen waren die Unterschiede in der MnSOD-Färbung nicht so ausgeprägt wie im humanen Material. Die Neuronen, v.a. in den tiefen Schichten des Cortex, und auch einige subcorticale Nuclei waren sowohl in Kontrollen als auch in OCL6-Schnitten auffallend gefärbt (Abb. 13G-J). Die Verteilung der MnSOD-Immunreaktivität bei OCL6-Southhampshire- (Abb. 13G und H) und OCL6-Merino-Schafen (Abb. 13I und J) war im Wesentlichen gleich. In beiden Schafsmodellen ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen eine stärkere punktförmige Färbung in Neuronen und im Neuropil feststellen. Die Neuronen von an OCL6 erkrankten Tieren zeigten stärkere Färbungsintensitäten in den tiefen Schichten des Cortex und im Pons. Es wurden auch bei den OCL6-Schafen einige MnSOD-positive Zellen mit Astrozytenmorphologie beobachtet, doch diese waren in geringerer Zahl vorhanden als in den entsprechenden humanen CLN6-Gehirnschnitten.

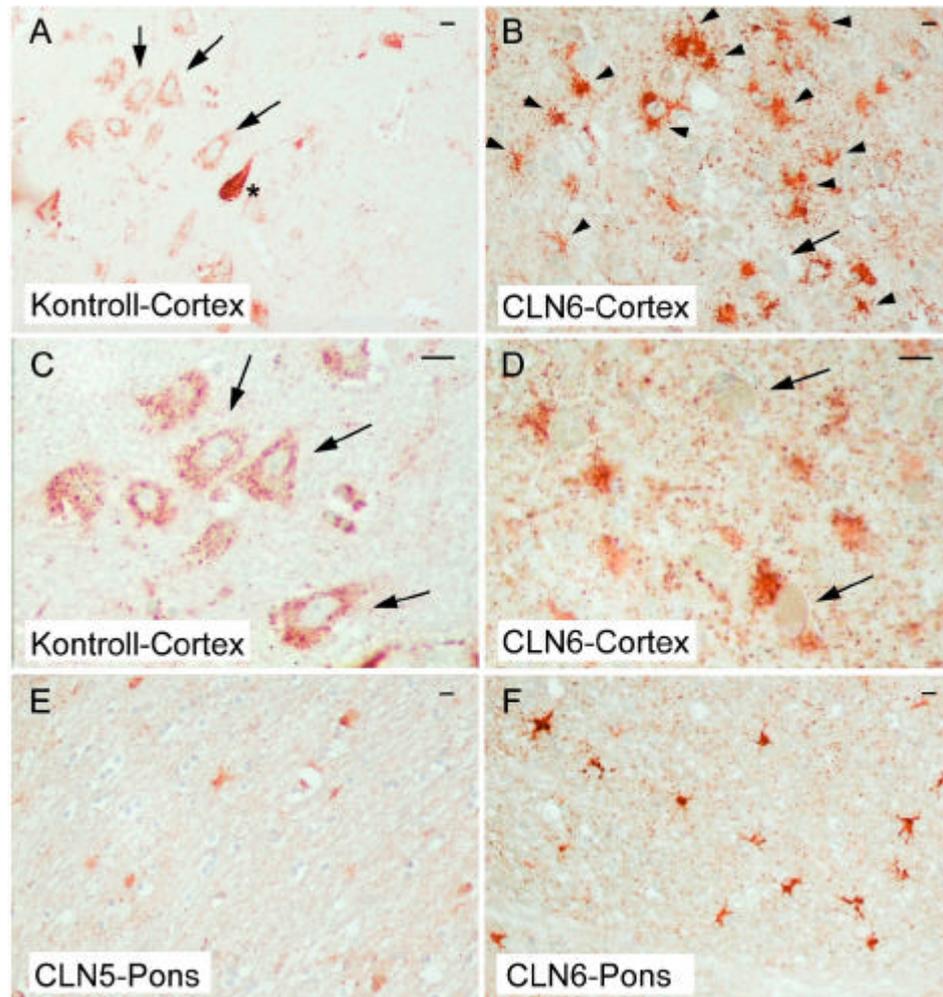


Abbildung 13A-F: Immunhistochemischer Nachweis von MnSOD in humanem CLN6-Gehirngewebe. Im humanen frontalen Cortex von Kontrollen (**A**) kann die MnSOD-Immunreaktivität als gleichmäßig verteilte Granula im Zellsoma nachgewiesen werden. Dies ist besser sichtbar bei stärkerer (2,5-fach) Vergrößerung (**C**). Es wurden einzelne, dunkel gefärbte Neuronen (*) im Kontrollgewebe gefunden. Im frontalen Cortex von einem CLN6-Patienten (**B**) ist die auffälligste MnSOD-Immunreaktivität in den reaktiven Astrozyten (Pfeilspitzen) im gesamten Cortex zu beobachten (**B** und **D**). Die noch vorhandenen Neuronen (Pfeile) in den tiefen corticalen Schichten zeigen großen Mengen an Speicherematerial, das aber nicht mit dem MnSOD-Antikörper gefärbt wurde. Das Neuropil ist in allen erkrankten Patienten punktförmig angefärbt. Astrozyten in cerebrospondinalen Trakten sind auf der Ebene des Pons eines CLN5-Patienten nur schwach gefärbt (**E**). Im Gegensatz dazu sind die Astrozyten dieser Region in einem CLN6-Patienten sehr intensiv gefärbt (**F**). Zur Detektion wurde das rote AEC-Chromogen verwendet. Die Schnitte wurden anschließend mit Hematoxylin gefärbt. (Balken \cong 10 μ m).

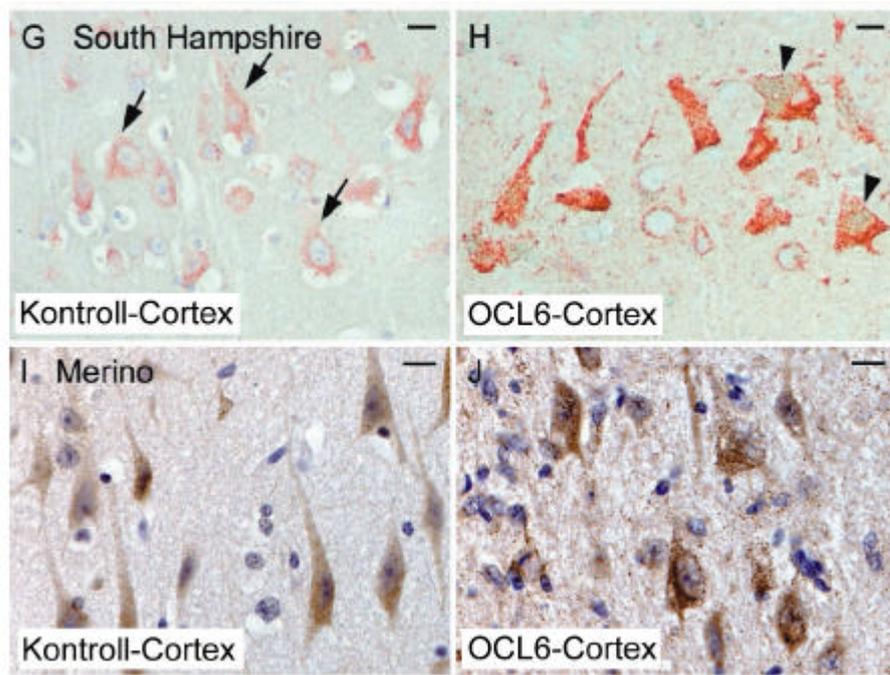


Abbildung 13G-J: Immunhistochemischer Nachweis von MnSOD in OCL6-Schafshirngewebe.

Die immunhistochemische Analyse von OCL6-Hirngewebe zeigt eine gesteigerte Expression von MnSOD im Cortex von an OCL6 erkrankten Southhamshire-Schafen (**H**) und Merino-Schafen (**J**) im Vergleich zu den jeweiligen gleichaltrigen Kontrolltieren (**G** und **I**). In Southhamshire-Schafen zeigt sich die stärkste granuläre Färbung in Neuronen (Pfeile) der tiefen Schichten im frontalen Cortex (**G**). In den erkrankten Southhamshire-Schafen war diese Färbung jedoch intensiver (**H**). Im enterorhinalen Cortex von OCL6-Merino-Schafen (**J**) liegt eine intensivere Färbung der Neuronen der Lamina V vor als im entsprechenden Bereich der Kontrolle (**I**). In beiden OCL6-Stämmen konnte auffälliges Speichermaterial (Pfeilspitze) gefunden werden, das jedoch MnSOD-negativ war. Das rote AEC-Chromogen wurde zur Detektion von MnSOD an den Schnitten aus Southhamshire-Schafen verwendet (**G** und **H**), während für die Färbung der Schnitte von Merino-Schafen das braungefärbte DAB benutzt wurde. Die Schnitte wurden anschließend mit Hematoxylin gefärbt. (Balken \cong 10 μ m).

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von MnSOD in Fibroblasten von CLN6-Patienten, wurden Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Dazu wurden humane kultivierte Hautfibroblasten von einem Kontroll- (M.T.) und einem CLN6-Patienten (J.M.) jeweils mit anti-MnSOD-Antikörpern und Antikörpern gegen die mitochondriale Cytochrom c Oxidase (COX) oder das lysosomale Membranprotein Lamp1 inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper. Die Färbung der MnSOD weist sowohl in Fibroblasten von Kontrollen (Abb. 14A und G) als auch des CLN6-Patienten (Abb. 14D und J) ein perlkettenartiges intrazelluläres Muster auf. Dieses Muster wiederholt sich bei der Anfärbung von COX (Abb. 14B, E, H und K). Die Überlagerung zeigt eine deutliche Gelbfärbung sowohl in den Kontrollzellen (Abb. 14C) als auch in CLN6-Fibroblasten (Abb. 13F) und damit die Kollokalisierung von MnSOD und COX. Im Gegensatz dazu zeigt die Färbung von Lamp1 (Abb. 14H und K) ein typisch punktförmiges, lysosomales Muster. In der

Überlagerung der beiden Färbungen von MnSOD und Lamp1 gibt es keine Gelbfärbung (Abb. 14I und L), d.h. die beiden Proteine liegen nicht im gleichen Zellorganell vor. MnSOD ist sowohl in den Kontroll- als auch den CLN6-Hautfibroblasten in den Mitochondrien lokalisiert.

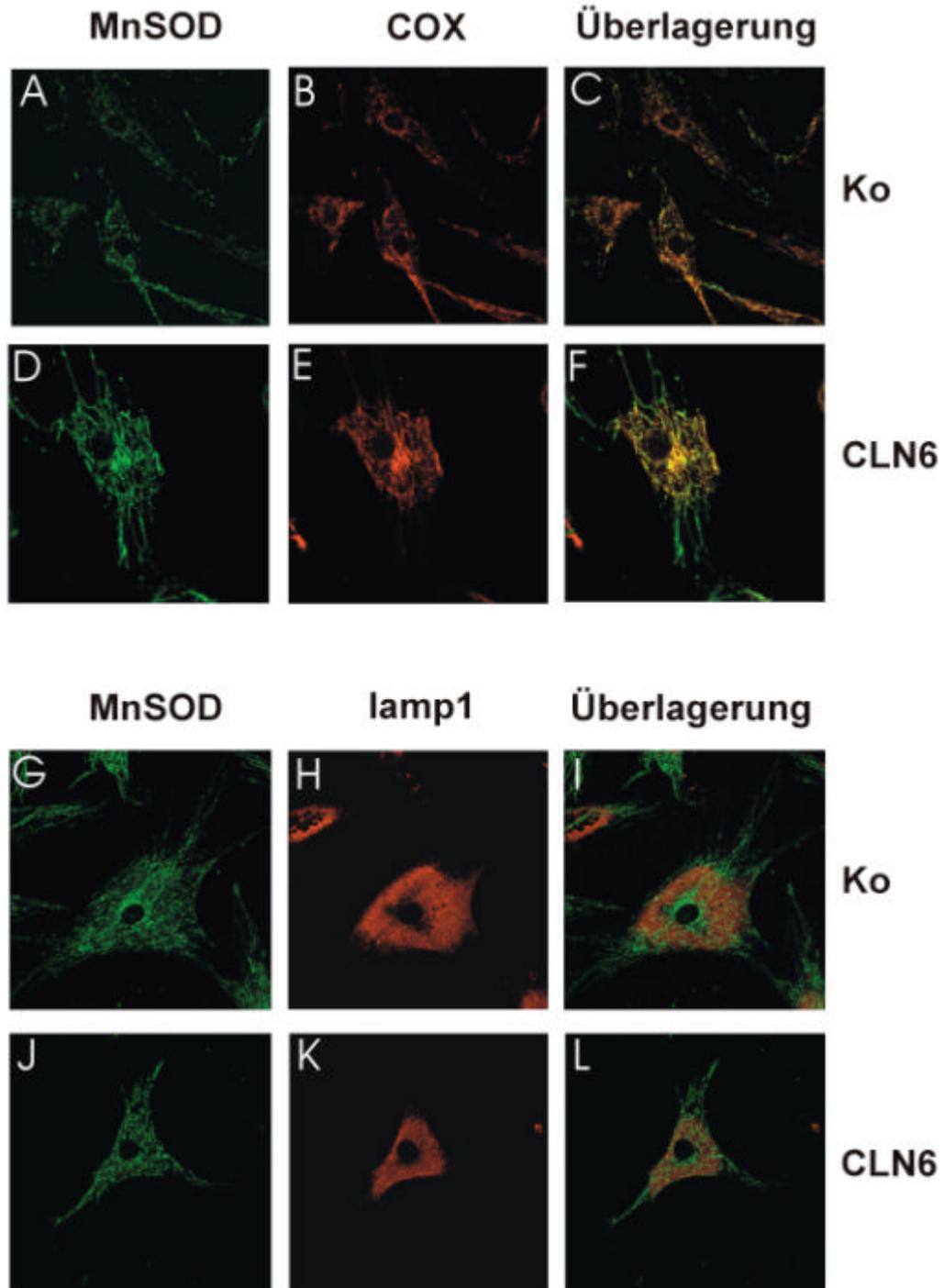


Abbildung 14: Mitochondriale Lokalisation von MnSOD in CLN6-Hautfibroblasten.

Subkonfluente Fibroblasten des Kontroll (Ko; M.T.)- und des CLN6-Patienten (J.M.) wurden fixiert, permeabilisiert und simultan mit dem anti-MnSOD-Antikörper aus Kaninchen und dem anti-Maus-COX-Antikörper oder dem anti-Maus-Lamp1-Antikörper inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Ziege-anti-Kaninchen-FITC (grün; A, D, G, J) und Schaf-anti-Maus-Cy3 (rot; B, E, H, K) Sekundärantikörpern. Die Überlagerung der beiden jeweiligen Bilder ist in C, F, I und L dargestellt.

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß der Gehalt an MnSOD sowohl in kultivierten humanen CLN6 als auch in OCL6-Schafsfibroblasten stark erhöht ist. Der Anstieg der MnSOD-Konzentration ist auf eine gesteigerte Transkriptionsrate zurückzuführen. MnSOD ist funktionell aktiv und ist in Fibroblasten von CLN6-Patienten und OCL6-Schafen in den Mitochondrien lokalisiert wie sowohl immunhistochemische als auch Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen ergaben.

4.2.4 Weitere veränderte Proteine in CLN6-Fibroblasten

Nach Auftrennung von Proteinen aus ML-Fraktionen von kultivierten Kontroll- und CLN6-Fibroblasten durch eine einfache SDS-PAGE sind neben dem akkumulierten MnSOD-Protein (Abb. 2B; Nr. 1) noch weitere Unterschiede im Proteinmuster erkennbar. MALDI-TOF-Analysen der ausgeschnittenen 90 kDa (Abb. 2B; Nr.2), 41 kDa (Abb. 2B; Nr. 3) und 18 kDa Bande (Abb. 2B; Nr. 4) ergaben, daß es sich um spezifische N-terminale Fragmente des α 2-Macroglobulins (α 2-M) handelt.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden die ML-Fraktionen im anti- α 2-M-Westernblot getestet. Wie Abb. 15 zeigt, gibt es diverse immunreaktive Banden: > 220 kDa, 74 kDa, 58 kDa, 41 kDa und 28 kDa. Bei der größten und am stärksten immunreaktiven Bande handelt es sich wahrscheinlich um das α 2-M-Dimer (~360 kDa). Die immunreaktiven Banden von etwa 74 kDa, 58 kDa und 41 kDa sind in der CLN6-Fraktion deutlich in der Menge gegenüber den Kontrollen reduziert (14-, 4,4- und 6,7-fach nach Densitometrie), wobei die 74 kDa und 58 kDa Banden in der Coomassie-Färbung unauffällig sind. Das 18 kDa Fragment wurde durch den anti- α 2-Macroglobulin-Antikörper nicht erkannt.

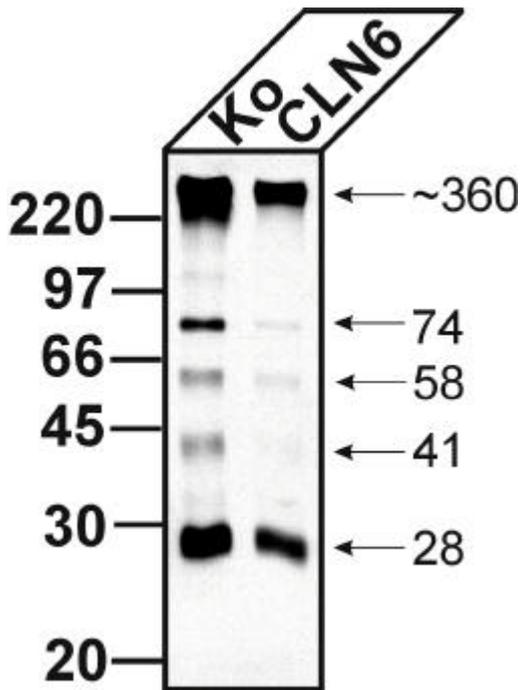


Abbildung 15: α 2-Macroglobulin-Westernblotanalyse von ML-Fractionen aus Kontroll- und CLN6-Fibroblasten.

Proteingemische aus den ML-Fractionen (30 μ g Protein) von kultivierten Fibroblasten aus Kontroll (Ko; M.T.)- und CLN6-Patienten (J.M.) wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran geblottet und mit anti- α 2-Macroglobulin-Antikörpern (1:500) und ECL analysiert.

4.2.5 Funktionelle Analyse der Lysosomen in OCL6-Fibroblasten

Da die Funktion des CLN6-Genproduktes unbekannt ist, sollte zunächst untersucht werden, ob der Transport und die proteolytische Prozessierung lysosomaler Enzyme in OCL6-Fibroblasten beeinträchtigt ist. Dazu wurden Kontroll- und OCL6-Schafsfibroblasten metabolisch für 1 h mit [35 S]-Methionin markiert und entweder sofort oder nach einer 7-stündigen Chase-Periode geerntet. Sowohl aus den Medien als auch aus den Zellen wurde das lösliche lysosomale Enzym Cathepsin (CtsD) immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE durch Fluorographie detektiert. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, ist nach dem Pulse ein 45 kDa CtsD-Polypeptid sichtbar, dessen Syntheserate sich in Kontroll- und OCL6-Fibroblasten nicht wesentlich unterscheidet. Nach der Chase-Periode wurden 14 % des gesamten [35 S]-Methionin-markierten CtsD in das Medium als 51 kDa Form sezerniert, wobei ca. 13 % des neusynthetisierten CtsD in dieser Zeit zur 30 kDa Form prozessiert werden. Die Prozessierungsrate unterscheidet sich nicht in Kontroll- und OCL6-Fibroblasten. Die CtsD-Aktivität war ebenfalls unverändert in OCL6-Fibroblasten (Daten nicht gezeigt).

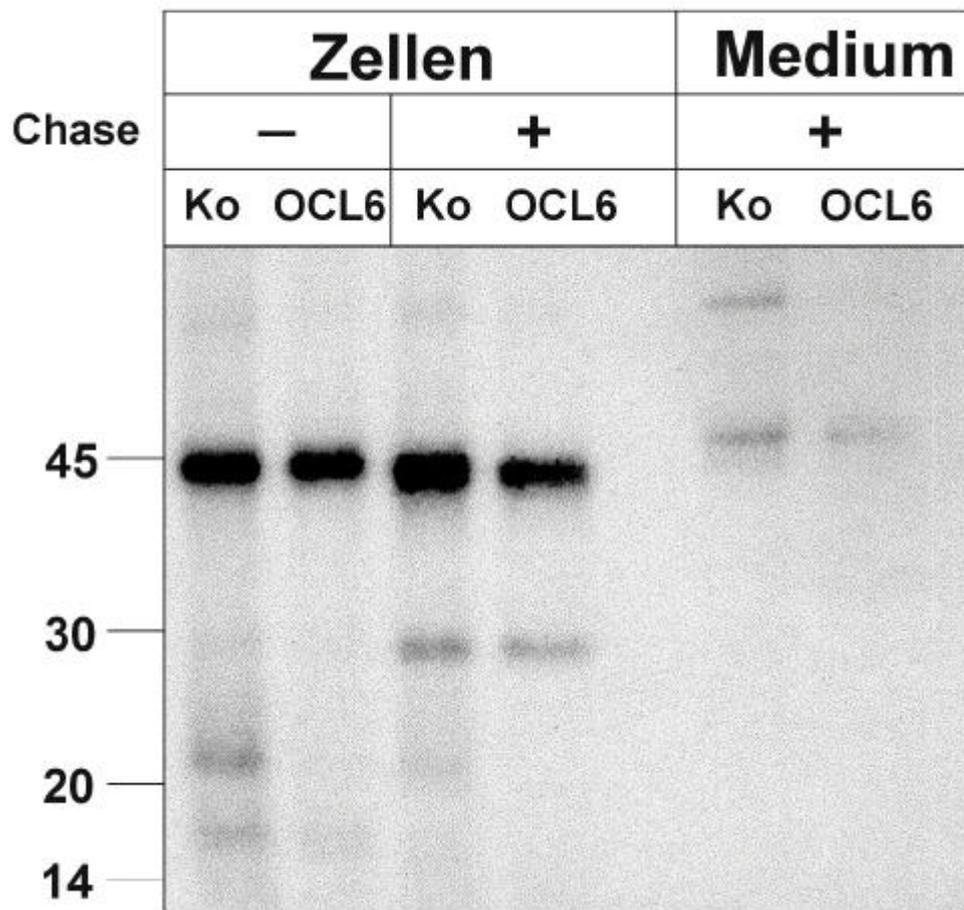


Abbildung 16: Die Synthese und Prozessierung von Cathepsin D in OCL6-Schafsfibroblasten.

Konfluente Kontroll- (Ko) und OCL6-Schafsfibroblasten wurden für 1 h metabolisch mit [^{35}S]-Methionin (70 $\mu\text{Ci/ml}$) markiert und entweder sofort abgeerntet oder einem Chase für 7 h unterzogen. CathepsinD wurde aus dem Medium und den Zellextrakten immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Fluorographie detektiert.

Neben dem Biosyntheseweg kann der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR)-abhängige Transport lysosomaler Enzyme über den Endozytoseweg zu den Lysosomen erfolgen. Aus diesem Grund wurde in OCL6-Schafsfibroblasten die Endozytose eines MPR-Liganden verfolgt. Dazu wurde [^{125}J]-markierte humane rekombinante Arylsulfatase A (ASA) dem Zellmedium von Kontroll- und OCL6-Fibroblasten zugegeben und in An- und Abwesenheit von Mannose-6-phosphat (M6P) für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zelloberflächengebundenes Material wurde anschließend bei 4 °C mit M6P verdrängt und die internalisierte [^{125}J]-ASA über die Messung der Radioaktivität und durch SDS-PAGE autoradiographisch bestimmt. Die densitometrische Auswertung ergab, daß in OCL6-Fibroblasten bis zu 100-fach mehr [^{125}J]-ASA nachweisbar war als in den Kontrollzellen (Abb. 17A). Die Aufnahme ist spezifisch und läßt sich fast vollständig durch M6P

hemmen. Im Vergleich dazu wurde bis zu 130-fach mehr [^{125}J]-ASA M6P-spezifisch von den humanen Kontrollzellen (HKo) aufgenommen. Die erhöhte Menge an [^{125}J]-ASA in OCL6-Zellen kann a) auf eine erhöhte Endozytose oder b) auf einen verminderten Abbau in den Lysosomen zurückzuführen sein. Eine gesteigerte Endozytoserate kann wiederum durch eine erhöhte Zahl an 300 kDa M6P-Rezeptoren (MPR300) oder durch eine schnellere Internalisierungskinetik der MPR300 an der Zelloberfläche erklärt werden. Zunächst wurde der Gesamtgehalt der MPR300 in den Kontroll- und OCL6-Fibroblasten mit Hilfe eines Westernblots unter Verwendung von Antikörpern gegen den humanen MPR300 geprüft. Die Signalstärke des immunreaktiven ovinen MPR300 war sehr schwach (Abb. 17B), aber ohne signifikante Unterschiede. Alternativ wurde die Gesamtmenge der ovinen MPR300 durch einen Antikörper-unabhängigen Overlay-Blot mit [^{125}J]-ASA bestimmt (Abb. 17C). Die densitometrische Auswertung ergab wieder, daß die Menge der MPR300 in Kontroll- und OCL6-Fibroblasten gleich ist. Um zu untersuchen, ob die Verteilung der MPR300 sich in den beiden Zelltypen unterscheidet und mehr MPR300 im „steady state“ an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wurden alle Zelloberflächenproteine der Schafsfibroblasten bei 4 °C biotinyliert und die Menge an MPR300 mit folgender Immunpräzipitation bestimmt. Als Kontrolle wurde bei den Proteinen der Kontrollzellen die Biotingruppe anschließend durch Reduktion der Linker-Disulfidbrücken wieder abgespalten. Die Auswertung eines vorläufigen Experimentes ergab, daß es keine Unterschiede in der an der Zelloberfläche vorliegenden MPR300-Menge zwischen Kontroll- und OCL6-Schafsfibroblasten gibt. Um die Abbaurate innerhalb einer 4-stündigen Endozytosezeit zu bestimmen, sind [^{125}J]-markierte ASA-Präparationen notwendig, die keine bzw. nur einen geringen Anteil an freier Radioaktivität enthalten (= 1 %) und am besten über MPR-Affinitätssäulen gereinigt sind. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

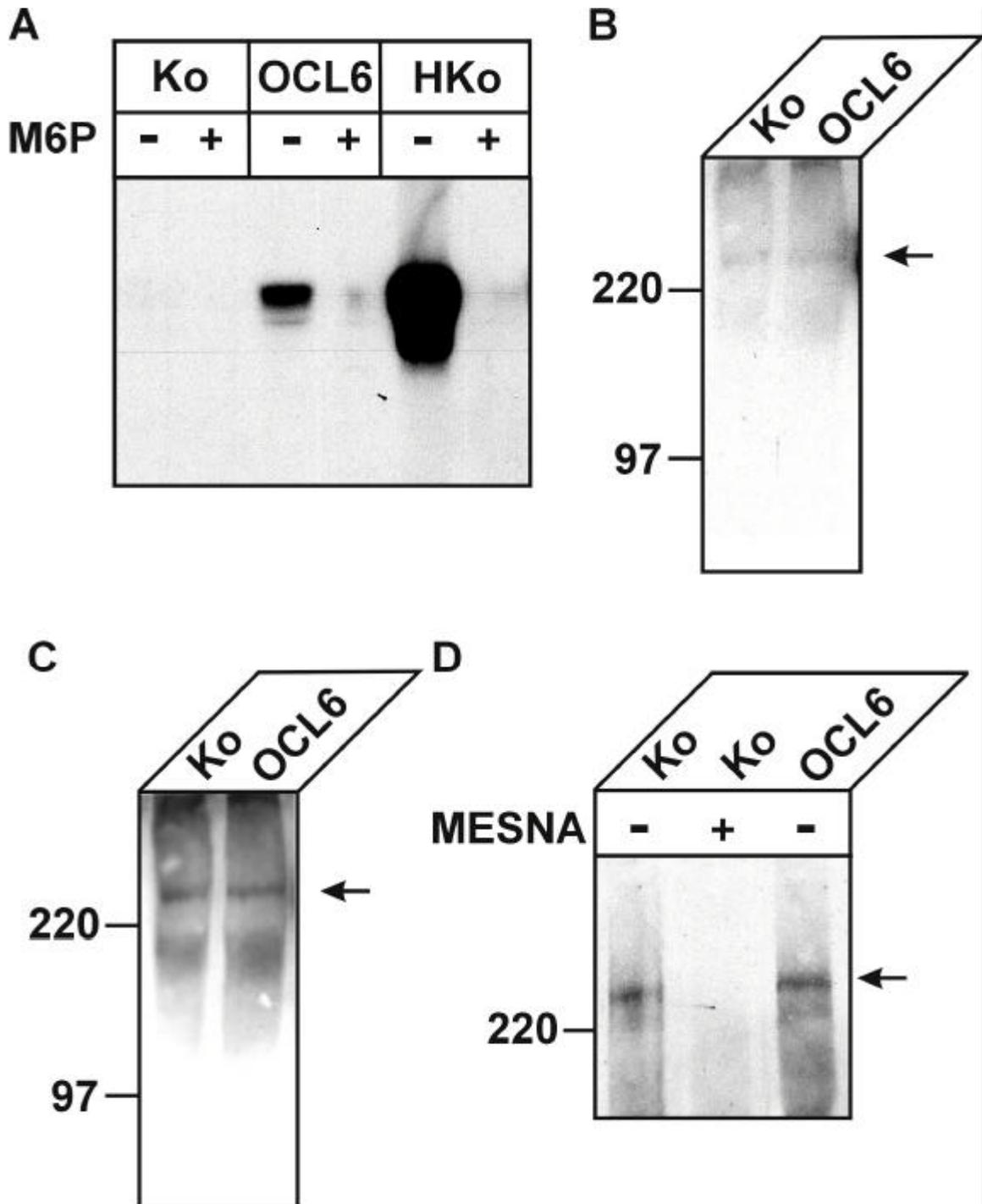


Abbildung 17: Endozytose von $[^{125}\text{J}]$ -ASA in Schafsfibroblasten.

Kontroll (Ko)-, OCL6-Schafszellen und humane Kontrollfibroblasten (HKo; B.C.) wurden in An- und Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P; 5 mM) für 4 h bei 37 °C mit $[^{125}\text{J}]$ -ASA (100.000 cpm/ml) inkubiert. Nach Entfernung der an die Zelloberfläche gebundenen ASA durch Waschen mit M6P (2 mM), wurden die Zellysate unter nicht reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) und Autoradiographie analysiert (A). Die Zellysate von Kontroll- (Ko) und OCL6-Fibroblasten wurden durch SDS-PAGE (8 % Acrylamid) unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und MPR300 wurde entweder im Westernblot mit anti-MPR300-Antikörpern (B) oder mit $[^{125}\text{J}]$ -ASA (100.000 cpm/ml) im Overlay-Blot nachgewiesen (C). Zelloberflächenproteine von Kontroll (Ko)- und OCL6-Schafsfibroblasten wurden biotinyliert. Bei einem Ansatz (+) wurden die Biotingruppen anschließend wieder durch Reduktion mit MESNA entfernt. Alle Proben wurden mit anti-MPR300-Antikörpern immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit anti-Streptavidin-Antikörper und ECL detektiert (D). Die Pfeile in B, C und D geben die Position des MPR300 an.

4.2.6 Expression des CLN6-Genproduktes

Um das CLN6-Genprodukt (CLN6p) zu charakterisieren, wurde die vollständige *CLN6* cDNA aus einem EST-Klon (IMAG p998E179643) isoliert und in den pCDNA3.1GFP/A(-) Vektor subkloniert. Der autofluoreszierende GFP-Anteil wurde an den N-Terminus des CLN6p fusioniert. Dazu wurden über die Primer GFPCLN6for und GFPCLN6rev (siehe Anhang) und die anschließende PCR die Restriktionsschnittstellen EcoR1 und BamH1 an das 5'- bzw. 3'- Ende des *CLN6* eingefügt. Über diese Restriktionsschnittstellen wurde dann die *CLN6* cDNA in den pCDNA3.1GFP/A(-) Vektor eingefügt. Anschließend wurden BHK-Zellen mit diesem Plasmid oder dem leeren Vektor transient transfiziert und im Westernblot mit anti-GFP-Antikörpern analysiert, da kein CLN6p-Antikörper existiert. Wie aus Abb. 18 deutlich wird, exprimieren die BHK-Zellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert wurden das GFP-Protein von ca. 28 kDa. In den Lysaten der GFP-CLN6p exprimierenden BHK-Zellen ist ein etwa 34 kDa Protein mit dem anti-GFP-Antikörper detektierbar. Das CLN6p hat eine berechnete Größe von 36 kDa. Das GFP-CLN6p-Fusionsprotein hätte daher eine zu erwartende molare Masse von 64 kDa. Da eine proteolytische Spaltstelle nach dem Aminosäurerest 29 in CLN6 vorhergesagt wurde (Gao et al., 2002), ist anzunehmen, daß diese Spaltstelle tatsächlich benutzt wurde und das nachgewiesene 34 kDa Protein aus dem GFP-Anteil und diesen 29 N-terminalen Aminosäureresten besteht.

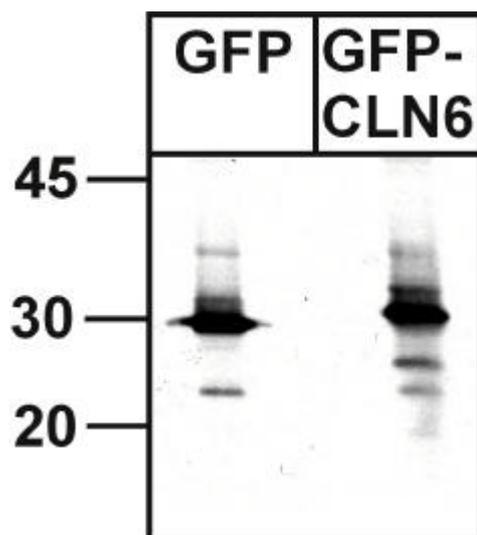


Abbildung 18: Expression des GFP-CLN6p-Fusionsprotein in BHK-Zellen.

BHK-Zellen wurden mit dem Vektor allein (GFP) oder mit dem GFP-CLN6 Plasmid transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellysate unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und im Westernblot mit anti-GFP-Antikörpern (1:500) und ECL analysiert.

Aus diesem Grund wurde das *CLN6* in den pCDNA3.1myc/His-A(-) Vektor kloniert, um eine C-terminale Fusion mit einem myc- und His-Tag zu erhalten. Weiterhin wurde dieses Konstrukt verwendet, um schon beschriebene Patientenmutationen

einzuführen. Der im ersten Abschnitt (4.2.1) schon beschriebene CLN6-Patient J.M. weist homozygot die Deletion I154 ($\Delta 154$) auf und in einer Familie aus Costa Rica wurde die homozygote Mutation G123D nachgewiesen (Wheeler et al., 2002). Die Mutagenese erfolgte durch „Quick change“ mit den Primern Del154for, Del154rev, G123Dfor und G123rev (siehe Anhang). BHK-Zellen wurden mit dem CLN6myc/His und dem Vektor allein transfiziert und nach 24 h geerntet, wobei die Zellysate mit dem anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit anti-His-Antikörpern analysiert wurden. Die Abb. 19A zeigt, daß das immunreaktive Protein mit einer Größe von etwa 34 kDa in etwa der berechneten molaren Masse des CLN6 entspricht. Auch die mutierten Konstrukte von CLN6G123D und CLN6 $\Delta 154$ sind intakt nachweisbar, wenn auch in etwas geringerer Menge (Abb. 19B).

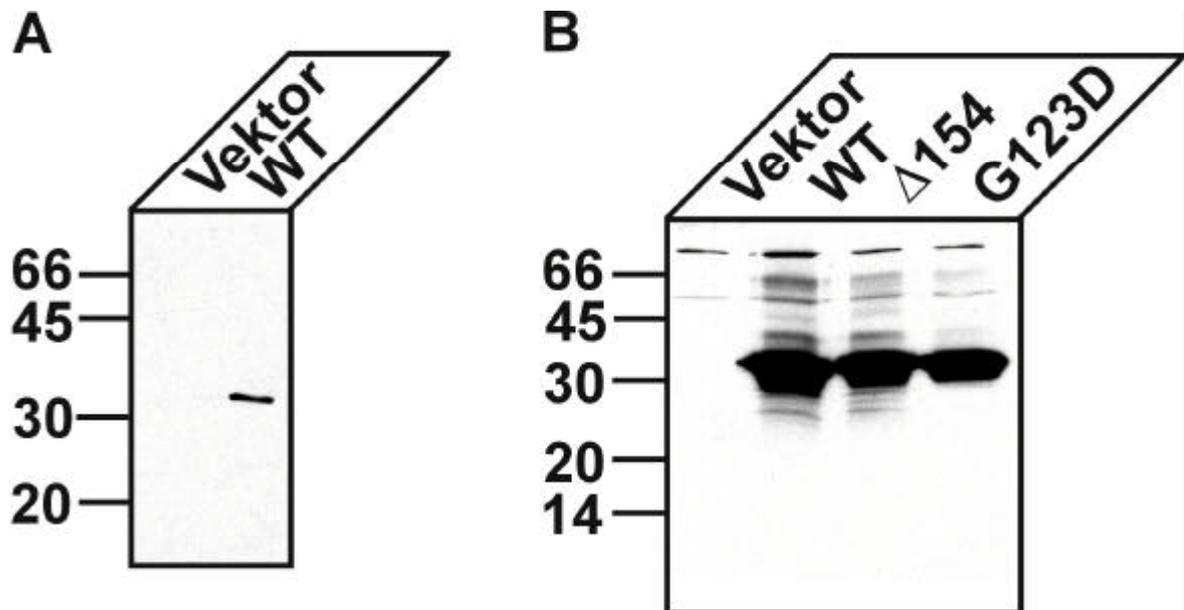


Abbildung 19: Am C-terminus mit myc- und His-fusioniertes CLN6, sowie die CLN6-Mutanten G123D und D154 werden als 34 kDa Protein in BHK-Zellen exprimiert.

BHK-Zellen wurden mit dem Vektor allein (Vektor), der CLN6 (WT), CLN6G123D (G123D) oder CLN6 $\Delta 154$ ($\Delta 154$) cDNA transient transfiziert und nach 24 h geerntet. **A.** Anschließend wurden die myc-konjugierten CLN6-Proteine immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen getrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit anti-His-Antikörpern im Westernblot analysiert. **B.** Die transfizierten Zellen wurden geerntet, durch SDS-PAGE separiert und im Westernblot mit anti-myc-Antikörpern untersucht. Die Detektion der immunreaktiven Proteine erfolgte durch einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper und ECL.

Um die Halblebenszeit des Wildtyp-CLN6-Proteins und der CLN6-Mutanten zu bestimmen, wurden BHK-Zellen transient mit dem Vektor allein, CLN6WT, CLN6G123D oder CLN6 $\Delta 154$ cDNAs transfiziert. Nach 24 h folgte eine einstündige metabolische Markierung mit [35 S]-Methionin, gefolgt von unterschiedlichen Chase-Zeiten (0, 6, 20, 29, 44 h). Anschließend wurden die

myc-konjugierten CLN6-Proteine mit dem anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE getrennt und durch Fluorographie analysiert. Die Menge der immunpräzipitierten, [³⁵S]-markierten CLN6-Proteine wurde densitometrisch quantifiziert. Abb. 20 zeigt, daß die Halblebenszeit des Wildtyp-CLN6-Proteins mit dem myc/His-Fusionsanteil bei etwa 20 Stunden liegt, 54 % des Ausgangsmaterials sind nach 20 h Chase noch vorhanden. Die CLN6-Mutanten G123D und Δ154 sind nur zu 17 % bzw. 34 % im Vergleich zum CLN6WT nach einstündiger Markierung nachweisbar. Die Halblebenszeit beider Mutanten liegt unter 6 h: nach 6 h Chase sind nur noch 20 % bzw. 34 % der nach dem Pulse detektierbaren Mutanten CLN6G123D bzw. CLN6Δ154 nachweisbar.

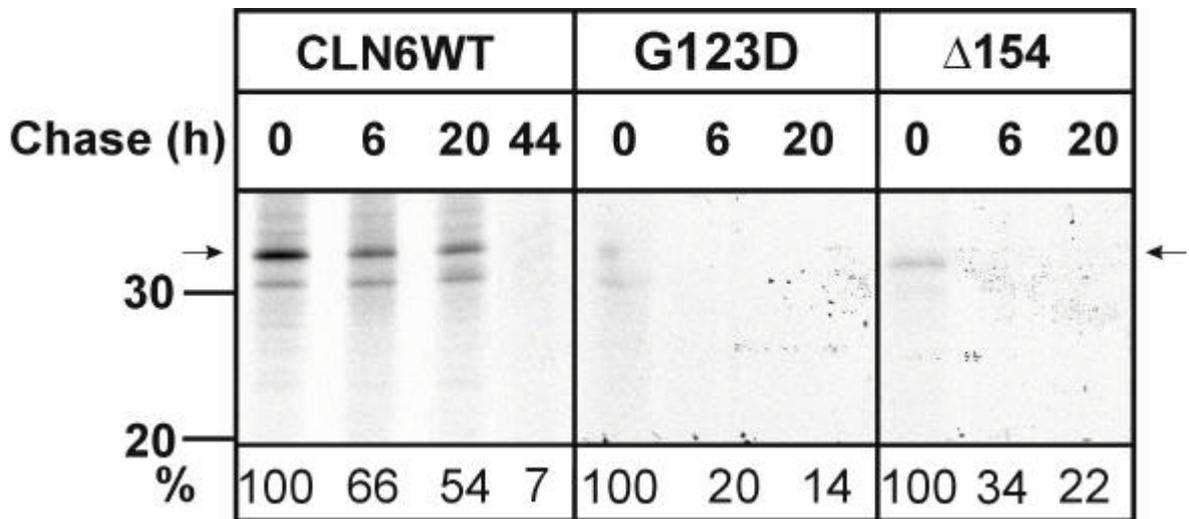
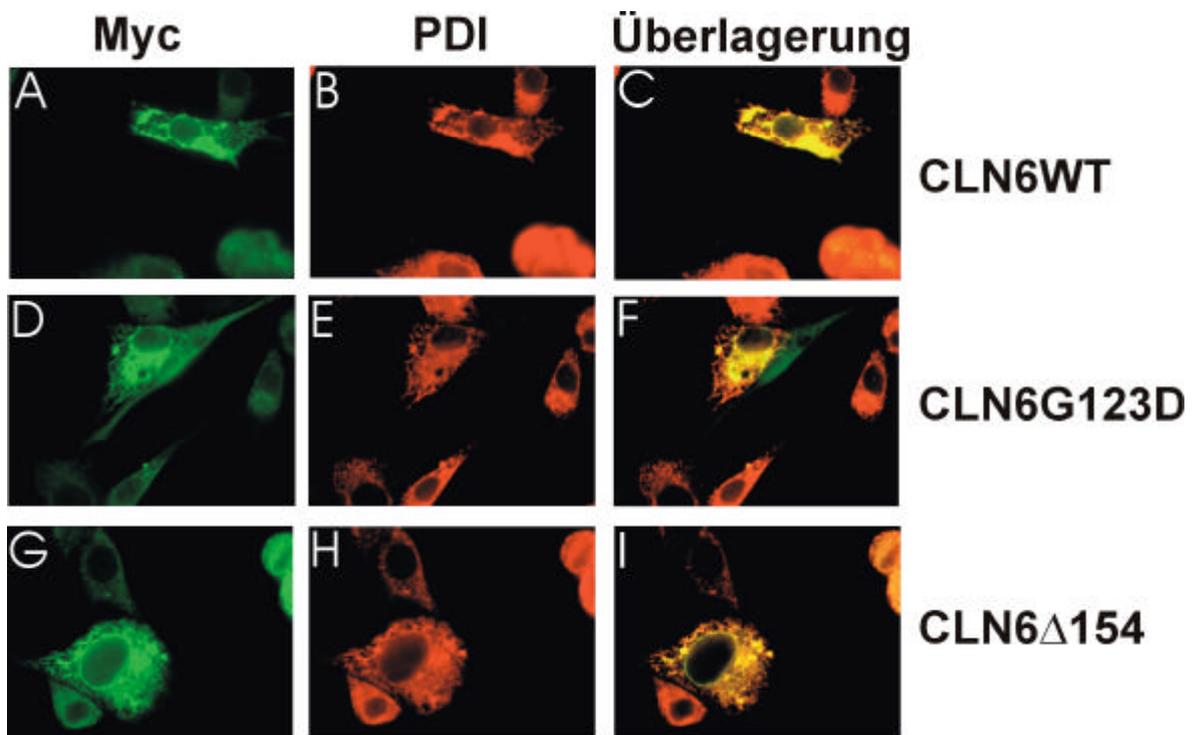


Abbildung 20: Halblebenszeitbestimmung des am C-terminus mit myc- und His-fusioniertem CLN6, sowie der CLN6-Mutanten G123D und CLN6Δ154.

BHK-Zellen wurden mit der CLN6WT, CLN6G123D (G123D) oder CLN6Δ154 (Δ154) cDNA transient transfiziert und nach 24 h für 1 h mit [³⁵S]-Methionin markiert und anschließend einem Chase von 0, 6, 20 und 44 h unterzogen. Die CLN6-Konstrukte wurden über den myc-Tag immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt, durch Fluorographie detektiert und densitometrisch ausgewertet. Die Zahlen unter den Bahnen geben die Menge an CLN6p in % des gesamten während der Pulse-Zeit neusynthetisierten CLN6p wieder.

Um die intrazelluläre Lokalisation des CLN6p und seiner Mutaten zu untersuchen, wurden BHK-Zellen transient mit cDNAs für CLN6WT (Abb. 21A, B, C, J, K, L), CLN6G123D (Abb. 21D, E, F, M, N, O) oder CLN6Δ154 (Abb. 21G, H, I, P, Q, R) transfiziert und nach 24 h für die Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchung aufgearbeitet. Die Zellen wurden simultan mit polyklonalen anti-myc-Antikörpern aus Kaninchen (Abb. 21A, D, G) und monoklonalen Antikörpern gegen das ER-Markerprotein Protein Disulfid-Isomerase (PDI; Abb. 21B, E, H) oder mit den monoklonalen anti-myc-Antikörpern (Abb. 21J, M, P) und dem polyklonalen Antiserum gegen das lysosomale Markerprotein Cathepsin D (CtsD) aus

Kaninchen (Abb. 21K, N, Q) inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper. Wie in den Überlagerungen der Färbungen zu sehen ist, kolokalisieren CLN6 WT (Abb. 21C), CLN6G123D (Abb. 21F) und CLN6 Δ 154 (Abb. 21I) mit PDI, d.h. alle transfizierten Konstrukte befinden sich in ER-Membranen. Die Mutationen haben keinen Einfluß auf die Lokalisation des CLN6p. Dagegen ist in den Überlagerungen der myc-Färbung mit der des CtsD keine Gelbfärbung zu beobachten, was eine lysosomale Lokalisation ausschließt.



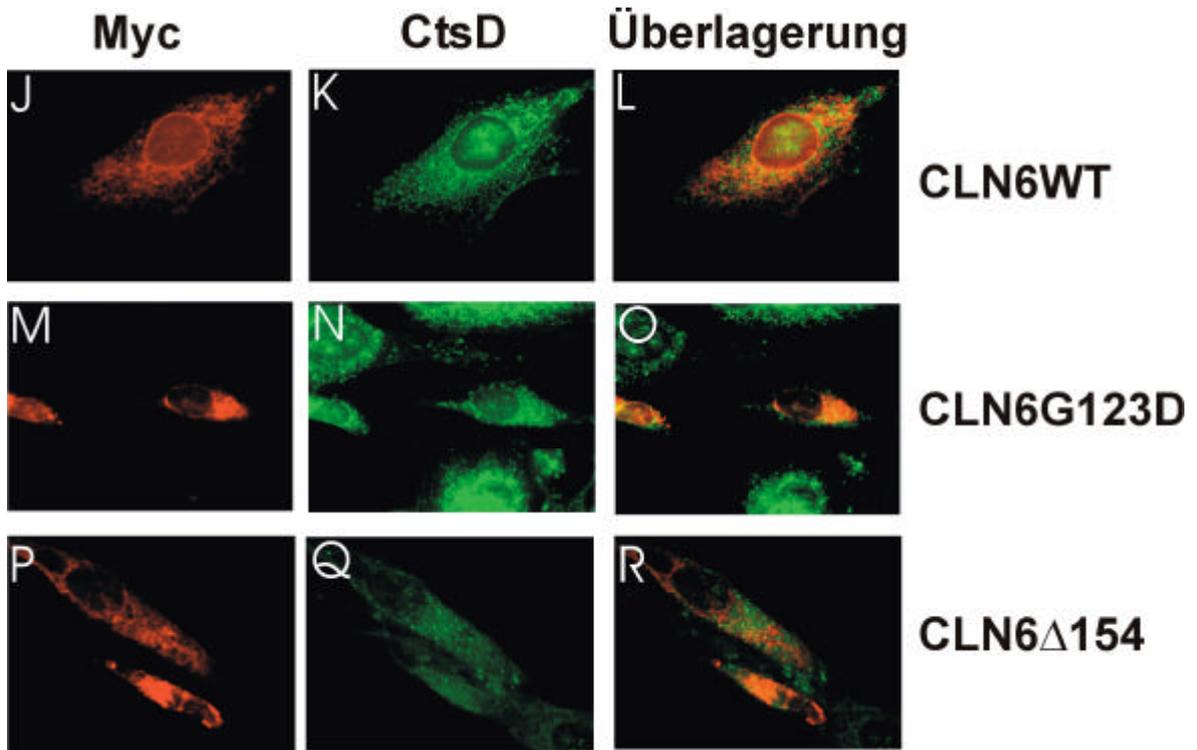


Abbildung 21: Wildtyp und CLN6-Mutanten CLN6G123D und CLN6D154 sind im ER lokalisiert.

Subkonfluente BHK-Zellen wurden transient mit cDNAs des Wildtyps (CLN6WT; **A, B, C, J, K, L**), CLN6G123D (**D, E, F, M, N, O**) oder dem CLN6 Δ 154 (**G, H, I, P, Q, R**) auf Deckgläschen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und simultan mit dem anti-myc-Antikörper aus Kaninchen (grün) und dem Maus PDI-Antikörper (rot) inkubiert (**A – I**). Alternativ wurden die Zellen mit dem Maus anti-myc-Antikörper (rot) und dem Kaninchen anti-CtsD-Antiserum (grün) inkubiert (**J – R**). Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Ziege-anti-Kaninchen-FITC (grün; **A, D, G, K, Q**) und Schaf-anti-Maus-Cy3 (rot; **B, E, H, J, M, P**) Sekundärantikörpern. Die Überlagerung der beiden jeweiligen Bilder ist in **C, F, I, L, O** und **R** dargestellt.

Die Topologie des Transmembranproteins CLN6p ist noch unbekannt, aber es wurde ein Modell aufgrund berechneter Daten entwickelt. Danach besitzt CLN6p sechs bis sieben Transmembrandomänen, wobei der N-Terminus im Zytoplasma und der C-Terminus intraluminal liegt (Gao et al., 2002; Wheeler et al., 2002). Um zu prüfen, ob sich der C-Terminus im Lumen eines intrazellulären Kompartimentes befindet, wurden Proteaseresistenzversuche mit C-terminalen myc- und His-Fusionsanteilen durchgeführt. Dazu wurden Membranen aus BHK-Zellen isoliert, die das Wildtyp-CLN6p überexprimieren, und anschließend 60 min mit Trypsin inkubiert. Bei luminaler Orientierung des myc-markierten C-Terminus sollte dieser vor dem Abbau durch Trypsin geschützt und im Westernblot nachweisbar sein. Im Westernblot ist ein um etwa 3 kDa verkürztes CLN6p nach Behandlung mit Trypsin nachweisbar (Abb. 22B).

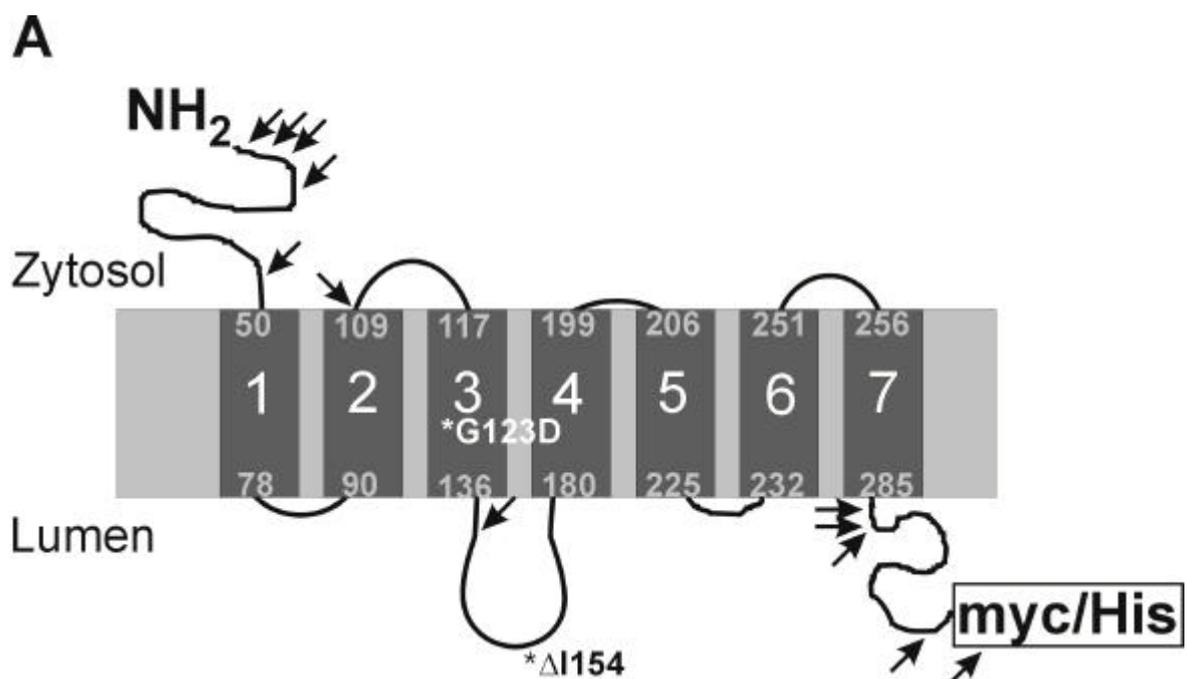
CLN6 enthält insgesamt 11 Spaltstellen für Trypsin, die außerhalb der potentiellen Transmembrandomänen liegen. Davon befinden sich 5 Trypsinspaltstellen in der

berechneten N-terminalen, zytoplasmatischen Domäne, eine weitere im vorhergesagten 2. Loop im Cytoplasma, eine nach der dritten Transmembrandomäne im Lumen und dann noch 4 weitere Spaltstellen im möglichen luminalen C-Terminus (Abb.22A, Spaltstellen sind durch Pfeile markiert). Zudem liegt eine Trypsin-Spaltstelle im myc-Tag selbst vor.

Wenn der C-Terminus im Cytoplasma liegen würde, wäre das CLN6p nicht mehr durch den anti-myc-Antikörper zu erkennen, da dieser Fusionsanteil durch Trypsin abgebaut werden würde. Da aber nur eine Verkürzung um etwa 3 kDa durch die Trypsinbehandlung erfolgt, ist anzunehmen, daß nur die Spaltstellen im N-Terminus genutzt werden und es maximal zu einer Abspaltung von 39 Aminosäureresten (ca. 4 kDa) kommt. Die Trypsin-Spaltstelle direkt nach der zweiten angenommenen Transmembrandomäne ist offensichtlich für Trypsin nicht zugänglich, da sonst noch eine weitere Verkürzung des CLN6p erfolgen würde.

Als Kontrolle der Anwendbarkeit der Trypsinresistenzmethode wurden BHK-Zellen parallel mit der cDNA für den MPR300 transient transfiziert, mit [³⁵S]-Methionin markiert und in gleicher Weise fraktioniert und mit Trypsin verdaut. Nach anschließender MPR300-Immunpräzipitation wird deutlich, daß die zytoplasmatische Domäne durch Trypsin abgebaut wird und es dadurch zu einer Verkürzung des MPR300 um ca. 20 kDa kommt (Abb 22C).

Aus diesen Daten wird deutlich, daß der C-Terminus von CLN6 dem Lumen und der des MPR300 dem Zytoplasma zugewandt ist.



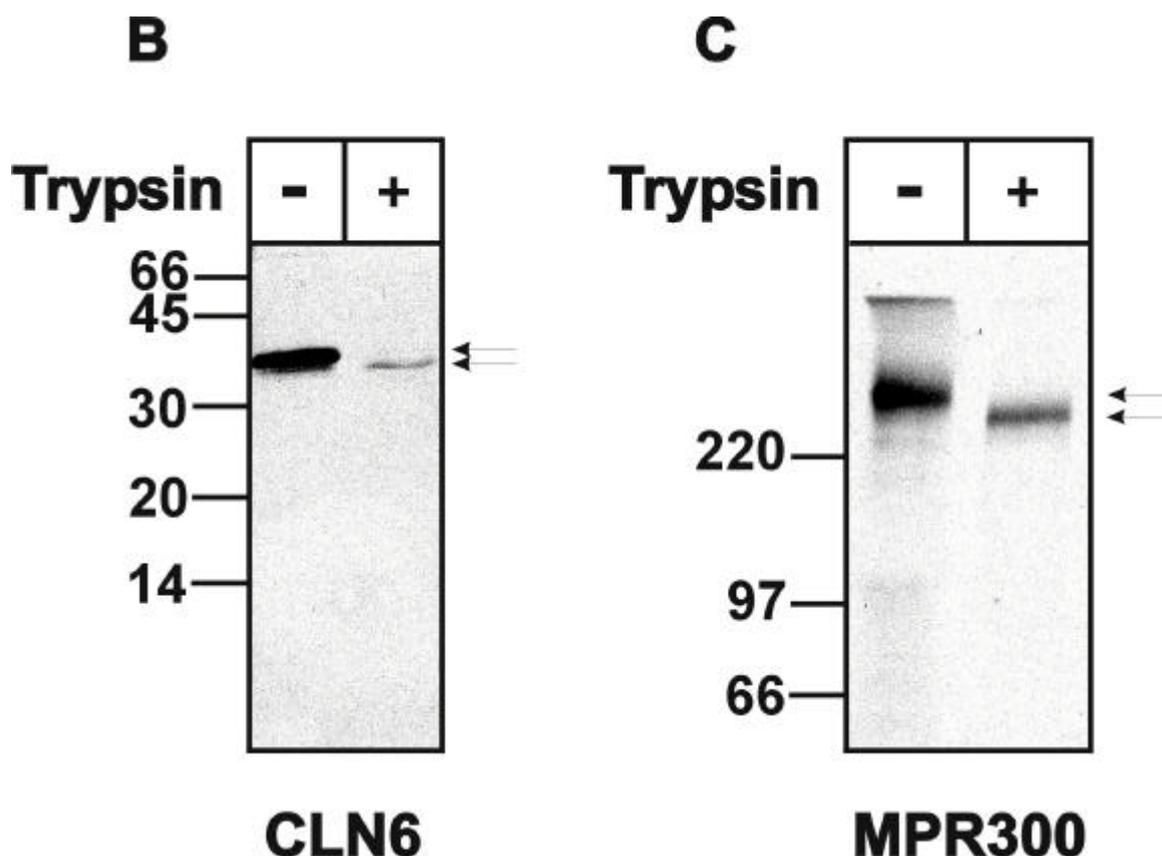


Abbildung 22: Der C-Terminus von CLN6 ist luminal lokalisiert.

Die schematische Darstellung des CLN6-Proteins mit myc-/His-Tag am C-Terminus (verändert nach Wheeler et al., 2002). Die sieben Transmembrandomänen (1-7) und jeweils die ersten und letzten Aminosäurereste der Transmembrandomänen sind numeriert. Die Pfeile kennzeichnen die Trypsinspaltstellen (A). Membranen aus BHK-Zellen, die mit den cDNAs für Wildtyp-CLN6 (B) oder MPR300 (C) transient transfiziert waren, wurden nach 24 h für 60 min ohne (-) oder mit Trypsin (+) bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde in (B) direkt durch SDS-PAGE (15 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend mit anti-myc-Antikörpern (1:500) im Westernblot analysiert. HRP-gekoppelte Sekundärantikörper ermöglichten die Detektion durch ECL. C. Die transient mit MPR300 cDNA transfizierte BHK-Zellen wurden über Nacht mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und wie in B. aufgearbeitet und mit Trypsin verdaut. Anschließend folgte die Immunpräzipitation des MPR300 und die Auftrennung durch SDS-PAGE (8 % Acrylamid). Die Detektion erfolgte durch Fluorographie.

4.3 Cathepsin D-Defizienz, eine neue Form der NCL

4.3.1 Biochemische Charakterisierung subzellulärer Fraktionen aus Gehirnen Cathepsin D-defizienter Mäuse

Eine weitere Form der Neuronalen Ceroid Lipofuszinose wird durch den Defekt im *Cathepsin D* (*CtsD*) verursacht, der bislang nur bei Schafen als natürliche Mutation gefunden wurde (Tyynela et al., 2000). Die typischen NCL-Symptome

wie Erblindung, Neurodegeneration und die lysosomale Speicherung der sub c werden auch in CtsD-knock-out-Mäusen beobachtet (Koike et al., 2000). Die CtsD-defizienten Mäuse sterben zwischen Tag 25 und 27 nach der Geburt (Saftig et al., 1995). Um die Ursachen zur Pathogenese der Neurodegeneration bei CtsD-Defizienz genauer zu untersuchen, wurden die Gehirne von CtsD-defizienten und WT-Mäusen im Alter von 23 Tagen nach der Geburt analysiert. Da CtsD eine lysosomale Protease ist, deren natürliche Substrate nicht bekannt sind, sollte zunächst eine lysosomale Fraktion auf Veränderungen im Proteinexpressionsmuster mit Hilfe der 2D-Elektrophorese untersucht werden. Die Isolierung von Synaptosomen aus verschiedenen Gehirnarealen mittels diskontinuierlicher Saccharosegradienten (Carlin et al., 1980) wurde auf Maushirncortex adaptiert und lieferte 4 Fraktionen, die an den Grenzschichten zwischen 0,32 M und 0,85 M Saccharose (Fraktion 1), 0,85 M und 1 M (Fraktion 2), zwischen 1 M und 1,2 M Saccharose (Fraktion 3) und am Boden des Gradienten (Fraktion 4) akkumulierten (siehe auch 3.2.3.8.2). Die Fraktionen wurden durch verschiedene Markerproteine im Westernblot sowie durch die Verteilung der Aktivität der lysosomalen β -Hexosaminidase charakterisiert.

Wie Abb 23A zeigt, ist der MPR300 in den Fraktionen 1 und 2 zu finden. Dies ist auch der Fall bei Rab7 (Abb. 23B), einer GTPase, die den Transport von frühen zu späten Endosomen reguliert (Feng et al., 1995), d.h. in den beiden leichten Membranfraktionen des diskontinuierlichen Saccharosegradienten befinden sich hauptsächlich Golgi-Membranen (MPR300) und Endosomen (MPR300 und Rab7). Das lösliche lysosomale Enzym CtsD ist dagegen am stärksten in der Fraktion 4, aber auch in Fraktion 3 nachweisbar (Abb. 23C). Auch die β -Hexosaminidaseaktivität ist bezogen auf die Proteinmenge in der Fraktion 4 am höchsten, wobei auch die Gesamtproteinkonzentration in der Fraktion 4 am höchsten ist (Abb.23 E). Das mitochondriale Enzym MnSOD ist zu gleichen Teilen in den Fraktionen F3 und F4 detektierbar (Abb. 23D), d.h. die Fraktionen 3 und 4 beinhalten v.a. die Lysosomen und Mitochondrien, wobei der relative Anteil an lysosomalen gegen mitochondrialen Markerproteinen in der Fraktion 4 größer ist. Die gleiche Verteilung der Marker ergab sich in subzellulären Fraktionen aus CtsD-defizientem Maushirn (nicht dargestellt). Alle weiteren Untersuchungen wurden zunächst mit der Lysosomen-angereicherten Fraktion 4 vorgenommen.

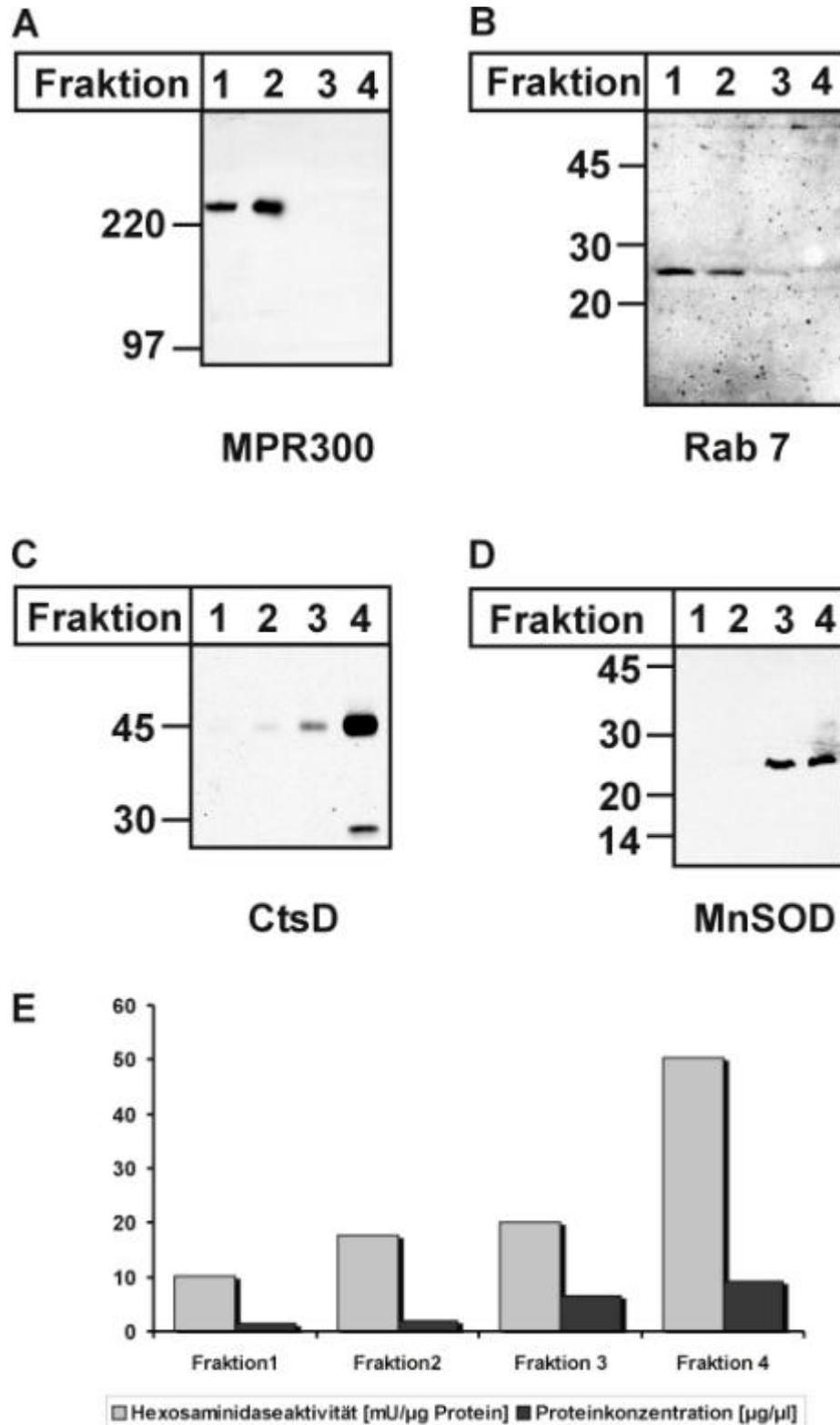


Abbildung 23: Verteilung von Markerproteinen in subzellulären Membranfraktionen aus Maushirn.

Postnukleäre Überstände von Maushirn wurden über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten fraktioniert (3.2.3.8.2). Je 30 µg Protein jeder Fraktion (1, 2, 3 und 4) wurden durch SDS-PAGE (8 % Acrylamid für **A**, 12,5 % Acrylamid für **B** und **D**, 10 % Acrylamid für **C**) getrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit anti-MPR300- (**A**), anti-Rab7- (**B**), anti-CtsD- (**C**) und anti-MnSOD-Antikörpern (**D**) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch ECL über HRP-konjugierte Sekundärantikörper. Weiterhin wurde von je 5 µl jeder Fraktion die Aktivität der β-Hexosaminidase (in mU pro µg eingesetztem Protein; weiß) und der Proteingehalt (in mg; schwarz) nach Bradford bestimmt (**E**).

4.3.2 2D-Elektrophorese von lysosomalen Fraktionen aus Kontroll- und CtsD-defizienten-Mäusen

Fraktionen 4 aus einer CtsD-defizienten Maus wurde mit der einer Kontroll-Maus im gleichen Alter (P23) und aus dem gleichen Wurf durch 2D-Elektrophorese und Silberfärbung verglichen. Es gibt zwischen den beiden Tieren diverse Unterschiede im Proteinmuster (Abb. 24; Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet). Mindestens vier Polypeptide zwischen 44 und 35,8 kDa mit pI-Werten zwischen 8,2 und 8,7 (Nr. 1-4) und zwei Proteine von 17,6 und 18,6 kDa mit einem pI von 6 (Nr. 5 und 6) sind nicht oder nur in geringen Mengen in CtsD-defizienten Mäusen vorhanden. Dagegen sind die Polypeptide Nr. 7-12 nur oder in größeren Mengen in CtsD-defizienten Mäusen vorhanden (Nr. 7: 44,2 kDa, pI 8,8; Nr. 8: 47 kDa, pI 5,5; Nr. 9: 53,8 kDa, pI 5,2; Nr. 10: 26,5 kDa, pI 5,5; Nr. 11: 13,4 kDa, pI 4,8; Nr. 12: 11,5 kDa, pI 6,1).

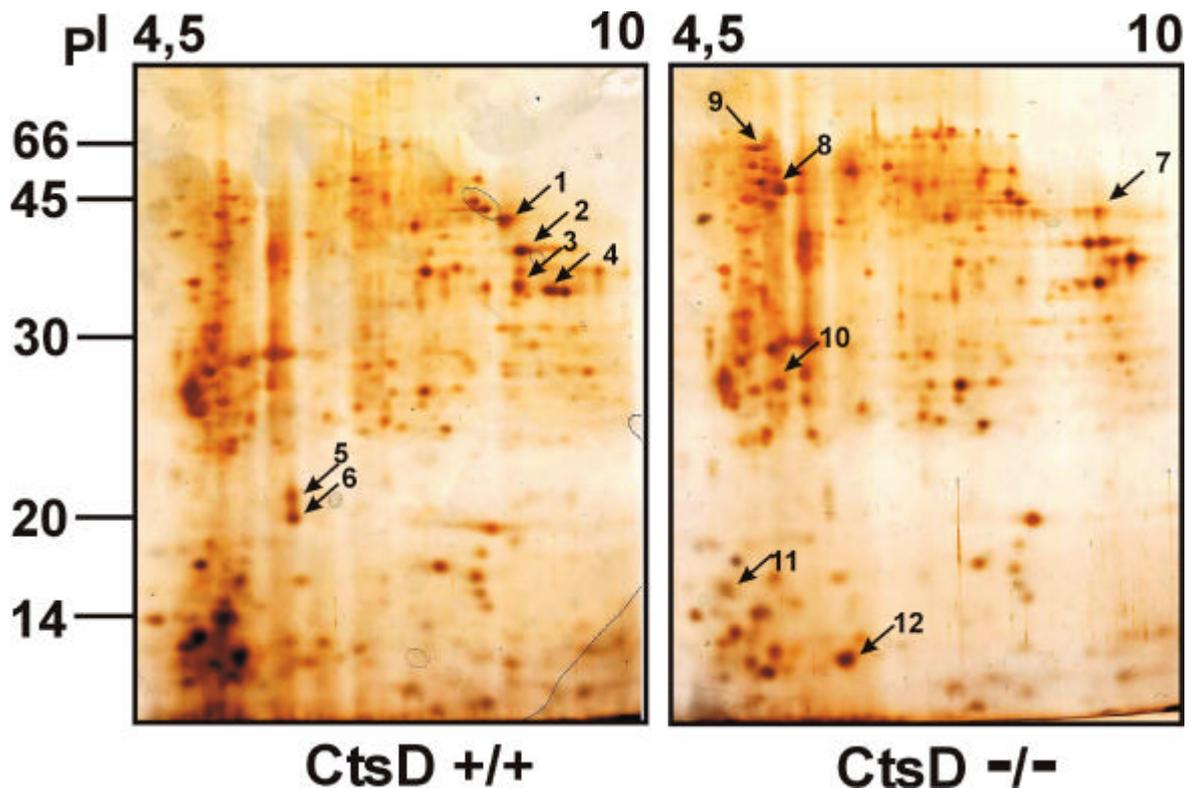


Abbildung 24: Vergleich des Proteinmusters von Fraktionen 4 aus Kontroll und CtsD-defizienten Mausgehirnen.

F4-Fraktionen (0,15 mg Protein) aus Kontroll- (CtsD^{+/+}) und CtsD-defizienten Mausgehirnen (CtsD^{-/-}) wurden durch 2D-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen. Die Positionen des Molekulargewichtstandards sind angegeben. Unterschiede im Proteinmuster sind mit nummeriertem Pfeil gekennzeichnet.

Anschließend wurden einige der in den CtsD-defizienten-Proben veränderten Proteinspots aus dem Gel ausgeschnitten und durch MS-MALDI-TOF analysiert. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mit Hilfe des Programms MS-Fit/ProteinProspector (<http://prospector.ucsf.edu>) mit der Datenbank Swiss-Prot.010501 verglichen. Es wurden pro analysiertem Polypeptid jeweils 3 potentielle Kandidaten angegeben, von denen einige jedoch sofort aufgrund ihrer zellulären Lokalisation oder aufgrund ihrer gewebespezifischen Expression ausgeschlossen werden konnten. Bei Spot Nr. 5, 6 und 10 sollte es sich um Rab19, Rab18 und Rab4a handeln und bei Spot Nr. 12 um Galectin-7 oder um das „Brain Fatty-acid Binding Protein“. Vergleichende Westernblotanalysen für Galectin-7 oder für das „Brain Fatty-acid Binding Protein“ haben jedoch keinerlei Unterschiede in der Immunreaktivität bei CtsD-defizienten Maushirnfractionen ergeben (Daten nicht gezeigt).

Die Massenanalyse eines anderen Spots hat ergeben, daß es sich um die α -Untereinheit des Guanine Nucleotide-Binding Protein G_z ($G\alpha Z$) handeln könnte. $G\alpha Z$, auch $G\alpha X$ genannt, ist ein 41 kDa Polypeptid und bildet zusammen mit einer β - und γ -Untereinheit ein heterotrimeres G-Protein, dem eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signalkaskade zukommt. $G\alpha Z$ wird v.a. in neuronalen Geweben (Hippocampus, Cerebellum, Retina, Cerebrum, Hirnanhangdrüse) und Zellen exprimiert, aber auch in peripheren Organen wie im Herz, Leber, Plazenta, Nebennierendrüse und in einigen Blutzellen und Zelllinien.

Dieses Ergebnis wurde durch Westernblotanalyse bestätigt. Dazu wurden Fraktionen 4 von zwei verschiedenen Würfeln durch SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit anti- $G\alpha Z$ -Antikörpern untersucht. Wie in Abb. 25 deutlich wird, ist der Gehalt an $G\alpha Z$ in F4-Fractionen von CtsD-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen aus dem gleichen Wurf erhöht.

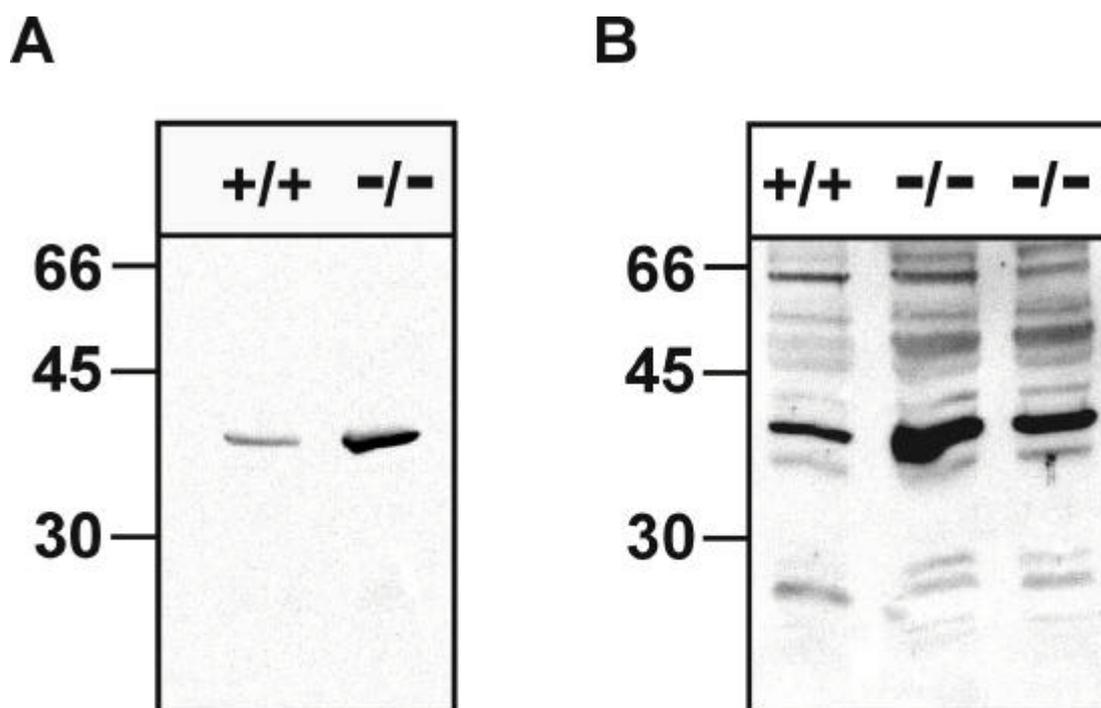


Abbildung 25: GαZ ist in Hirnfractionen von CtsD-defizienten Mäusen erhöht.

F4-Fractionen (30 µg Protein) von Hirnhomogenaten aus WT (+/+) und CtsD-defizienten (-/-) Mäusen aus je zwei verschiedenen Würfen (A und B) wurden durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid) getrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit anti-GαZ-Antiserum (Charge 1 für A und Charge 2 für B) für 2 h inkubiert. Die Detektion der immunreaktiven Proteine erfolgte durch HRP-gekoppelte Sekundäntikörper und ECL.

Die Ergebnisse der Massenanalyse haben die kleinen GTP-bindenden Rab-Proteine 18, 19 und 4a (Spots Nr. 5, 6 und 10 in Abb. 24) als potentielle Kandidaten vorgeschlagen, die eine veränderte Expressionsrate in CtsD-defizienten Mäusen zeigen. Um dies zu überprüfen und da die entsprechenden anti-Rab-Antikörper nicht zur Verfügung standen, wurden die jeweiligen Fraktionen 4 von Kontroll- und CtsD-knock-out Mäusen durch 2D-Elektrophorese getrennt und entweder durch Silberfärbung oder parallel dazu durch einen [³²P]-GTP-Overlay untersucht (3.2.3.6). Es gibt insgesamt 9 [³²P]-GTP-bindende Proteine (Abb. 26B), von denen die Nr. 1, 2 und 3 auch in der Silberfärbung (Abb. 26A) vorhanden sind, die sowohl in Kontrollen (CtsD+/+) als auch in CtsD-defizienten Hirnfractionen in etwa gleichen Mengen zu finden sind. Die anderen Spots Nr. 4-9 sind nicht in der Silberfärbung, aber in dem sensitiveren [³²P]-GTP-Overlay detektierbar. Die Spots Nr. 8 und 9 sind nur in der Fraktion 4 CtsD-defizienter (CtsD-/-) Mäuse nachzuweisen. Das G-Protein Nr. 6 war nach Densitometrie in der Kontrollfraktion (CtsD+/+) in höherer Menge vorhanden.

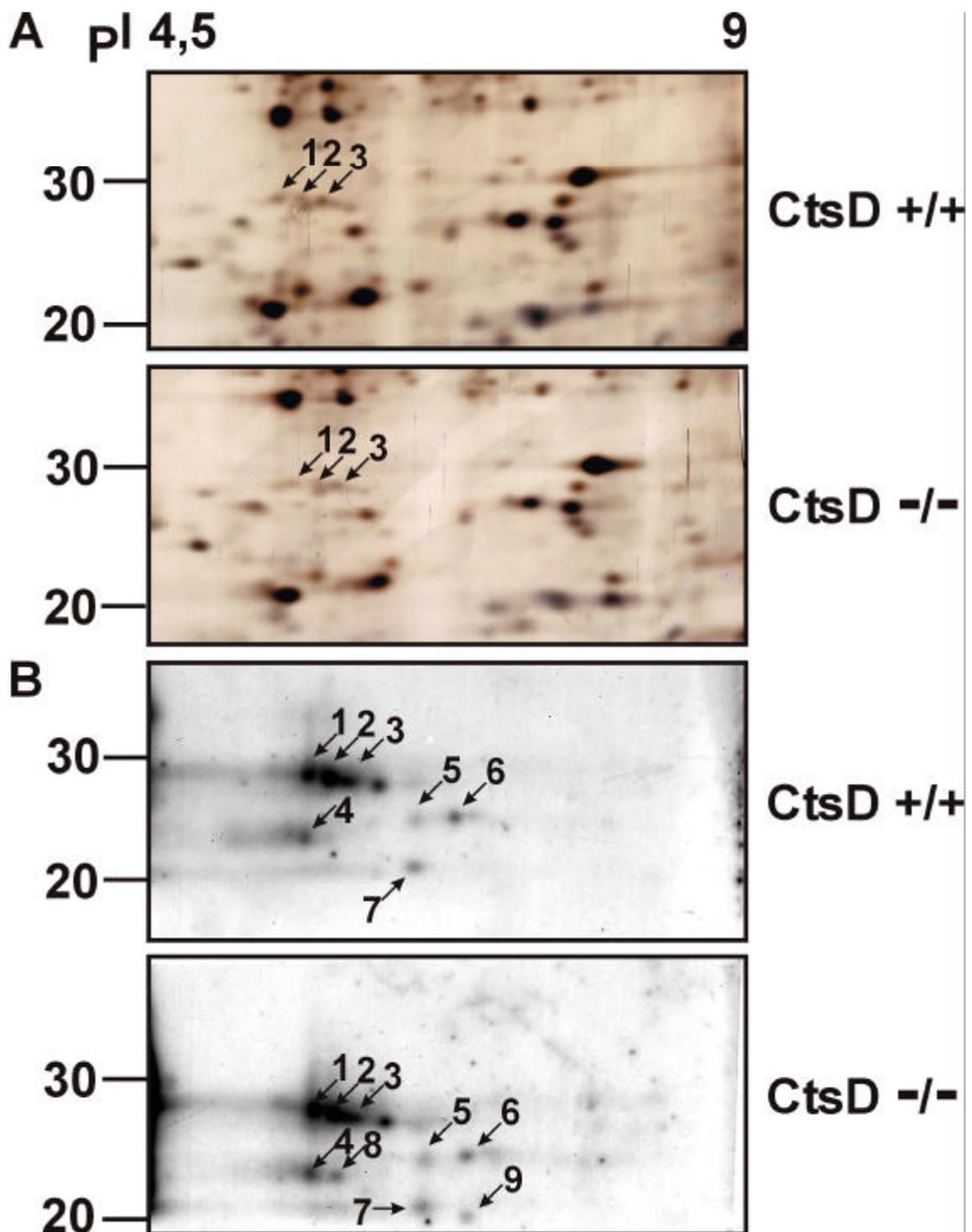


Abbildung 26: [32 P]-GTP-bindende Proteinen in Fraktion 4 von Kontroll- und CtsD-defizienten Maushirnen.

Fraktion 4 (0,15 mg Protein) von Gehirnen aus Kontroll- (CtsD+/+) und CtsD-defizienten (CtsD-/-) Mäusen wurden durch 2D-Elektrophorese getrennt. Die Proteine im Gel wurden entweder mit Silber gefärbt (A) oder renaturiert, auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit [32 P]-GTP (50-60 μ Ci/10 ml) inkubiert (B). Die numerierten Pfeile kennzeichnen die [32 P]-GTP-bindenden Proteine.

Zur Identifikation der in CtsD-defizienten Mäuse verändert exprimierten GTP-bindenden Proteine wurden Westernblotanalysen mit F4-Hirnfractionen von Kontroll- und CtsD-defizienten Mäusen für einige Rab-Proteine durchgeführt, für

die Antikörper zur Verfügung standen. Es konnten jedoch keine Veränderungen in der Proteinmenge von Rab4, Rab5 und Rab7 festgestellt werden (Abb. 27).

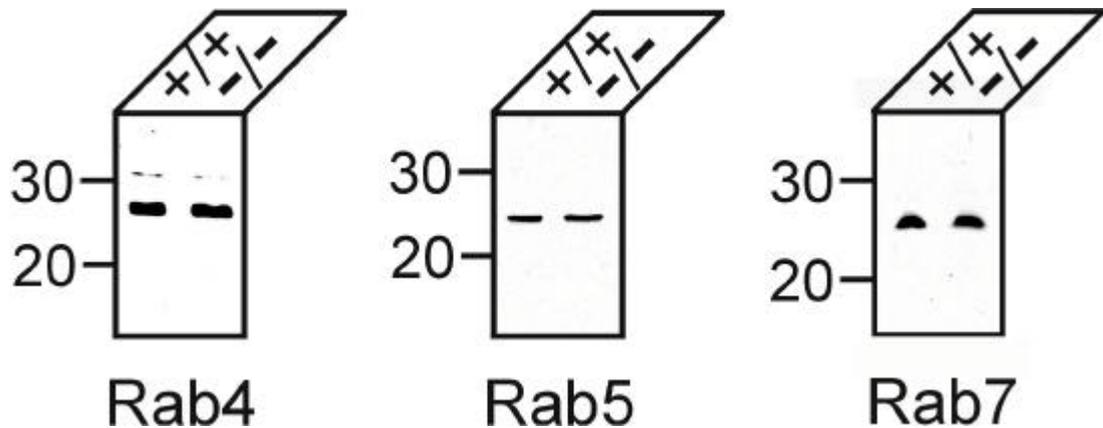


Abbildung 27: Westernblotanalyse von Rab4, 5 und 7 in Kontroll- und CtsD-defizienten F4-Maushirnfraktionen.

Kontroll (+/+)- und CtsD-defiziente (-/-) Fraktion 4 aus Maushirn (30 μ g Protein) wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE (12,5 % Acrylamid) aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und im Westernblot mit anti-Rab4-, anti-Rab5- und anti-Rab7-Antikörpern und ECL analysiert.

Es wird deutlich, daß in mit Lysosomen angereicherten Fraktionen aus CtsD-defizienten Maushirnen u.a. GTP-bindende Proteine in veränderter Menge vorhanden sind, zu denen kleine, monomere, aber auch das heterotrimere G_z Protein gehören.

5 DISKUSSION

5.1 Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Die zwei-dimensionale (2D)-Gelelektrophorese ist eine sehr effiziente Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Theoretisch können 10.000-15.000 Proteine in einem Gel getrennt werden (Klose & Kobalz, 1995). Der Praxiswert liegt jedoch weit darunter und ist abhängig von der Länge und dem pH-Bereich der benutzten IEF-Streifen der ersten Dimension, der Proteinpräparation und der Probenzusammensetzung. Einige Proteine lassen sich nicht oder nur schwer nach der 2D-Elektrophorese wiederfinden, so z.B. Membranproteine, sehr hydrophobe Proteine und allgemein Proteine mit einer höheren molaren Masse (> 70 kDa). Auch die Wahl der Präparationsmethode ist entscheidend für das 2D-Ergebnis. Es ergeben sich z.B. unterschiedliche Proteinmuster bei verschiedenen Konzentrierungen (Acetonpräzipitation oder Ultrazentrifugation) von Proteinen, so daß mehrere Methoden angewendet werden müssen, um alle vorhandenen Proteine nachweisen zu können (Thongboonkerd et al., 2002). Weiterhin ist bei der Probenvorbereitung darauf zu achten, daß die Proteinproben nicht mit hohen Salz- oder Lipidgehalten kontaminiert sind, die die IEF stören. Bei der Auftrennung von Gehirngewebe sollte das Myelin zuvor abgetrennt werden (persönliche Mitteilung von Mitarbeitern der Firma Amersham Pharmacia).

Da die 2D-Elektrophorese oft als vergleichende Technik eingesetzt wird, muß die Reproduzierbarkeit gewährleistet sein. Dies stellt jedoch v.a. bei aufwendiger Proteinpräparation z.B. bei Dichtegradienten, dessen Fraktionen manuell abgenommen werden, ein Problem dar. Voneinander unabhängig präparierte und aufgetrennte Proben, die vom Material, d.h. Alter der Tiere, Gewebe und Aufarbeitung her gleich sein sollten, zeigen zwar viele Gemeinsamkeiten, aber auch einige Proteinsignale, die sich unterscheiden (Abb. 1). Vergleichende Analysen sollten den eigenen Erfahrungen nach nur an parallel aufgearbeiteten und aufgetrennten Proteingemischen vorgenommen werden.

Üblicherweise werden die 2D-Gele nach der Proteinauftrennung mit Silber gefärbt, da die Konzentrationen einzelner Proteine in Homogenaten bzw. subzellulären Fraktionen sehr gering sein können und die Silberfärbung eine sehr sensitive, nicht-radioaktive Detektionsmethode darstellt. Bei Vergleichen der Proteinmuster ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Silberfärbung im Gegensatz zur ca. 50-fach insensitiveren Coomassiefärbung nur eine semiquantitative Detektion erlaubt.

Verändert exprimierte Proteine können über Massenspektrometrie identifiziert werden. Der Aufwand und der mögliche Verlust von einzelnen Proteinen bei einer mehrstufigen Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials zu Gunsten der Anreicherung anderer Proteine, muß individuell abgewogen werden gegenüber groben Anreicherungsschritten, die in kürzerer Zeit ohne Proteolyse mit weniger Ausgangsmaterial durchgeführt werden können. Die hier verwendete Methode zur Gewinnung einer subzellulären Fraktion, die mit Lysosomen angereichert ist, wurde ursprünglich als erster Schritt zur Isolierung von Synaptosomen und „postsynaptic densities“ verwendet (Carlin et al., 1980). Da bekannt ist, daß CLN6 eine lysosomale Speichererkrankung mit Akkumulation eines mitochondrialen Proteins (sub c) ist, wurde auf die weitere Fraktionierung verzichtet, da neben den Lysosomen auch noch andere Organellen betroffen zu sein scheinen.

Bei der massenspektrometrischen Analyse werden die im Gel enthaltenen Proteine zunächst tryptisch in Peptide gespalten und anschließend die Massen der einzelnen extrahierten Peptide im entstandenen Fragmentgemisch gemessen. Das Massenspektrum des Peptidgemisches liefert für jedes Protein einen spezifischen „Fingerabdruck“. Nachfolgend können die Proteine durch eine Suche in einer aktuellen Datenbank mit einer Liste der Peptidmassen identifiziert werden, wobei als Suchparameter a) die Spezies, b) das durch SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht und c) der isoelektrische Punkt (bei 2D-Auftrennung) verwendet wurden. Bei der Identifizierung wurden die experimentell ermittelten Peptidmassen mit den entsprechenden Werten aus einer theoretischen Fragmentierung aller in den Datenbanken erfaßten Proteine (Swissprot) verglichen. Kritisch ist hier zu bemerken, daß es verschiedene Softwareprogramme zur Datenbanksuche gibt (Profound Peptide Mapping, Protein Prospector, Mascot Search), die bei gleicher Eingabe der Peptidmassen z.T. unterschiedliche Ergebnisse liefern. Die Hauptkandidaten sollten daher mindestens beim Vergleich von zwei Software-Analysen angezeigt werden. Jeder erzielte Treffer spiegelt eine bestimmte

Wahrscheinlichkeit wider, daß es sich um das angegebene Protein handelt, was abhängig ist von der Gesamtzahl der detektierten Massen, der Zahl der Massen in Relation zur Gesamtpeptidmassenzahl, die mit einem Kandidatenprotein „matchen“, dem Prozentsatz der abgedeckten Aminosäuren u.v.a.

In der vorliegenden Arbeit erbrachte die massenspektrometrische Analyse mehrere Treffer für jede der ausgeschnittenen Proteinbanden, was zum einen damit zu erklären war, daß erzielte Treffer unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten aufwiesen und zum anderen, daß bei eindimensionaler SDS-PAGE diese Banden mehrere Proteine mit annähernd gleichem Molekulargewicht beinhalten können. Neben den o.g. Kriterien war die funktionelle Lokalisation der Kandidaten-Proteine in der Zelle ebenfalls entscheidend. Als Ausgangsmaterial für die Analyse diente eine angereicherte Mitochondrien/Lysosomen (ML) -Fraktion aus Kontroll- und Patientenfibroblasten oder Hirnmaterial. Daher konnten mögliche nukleäre oder zytoplasmatische Proteine genauso ausgeschlossen werden wie Proteine, die organspezifisch in anderen Geweben als der Haut oder dem Hirn exprimiert werden.

Die Analyse der Peptide durch Massenspektrometrie ist auf unmodifizierte Proteine einer gut untersuchten Spezies limitiert, da die in den Datenbanken vorliegenden Peptidmassen keine posttranslationalen Modifikationen berücksichtigen. Aus diesem Grund wurde nur humanes und murines, nicht aber ovines Material zur Proteinanalyse verwendet.

Leider wurde bei der kommerziellen Massenspektrometrie zur Identifizierung der hier untersuchten Proteine die Datenbank Swiss-Prot nur mit einem Softwareprogramm (Protein Prospector) durchsucht, was auch die hohe Fehlerquote bei den nachfolgenden Westernblotanalysen erklärt. So konnten, z.B. bei den Kandidatenproteinen Galectin-7 und „Brain Fatty-acid Binding Protein“, Westernblotanalysen keine Veränderung der Expression in CtsD-defizienten Mäusen zeigen, was auf eine fehlerhafte Massenanalyse hinweist (siehe 4.3.2).

5.2 Spät infantile Variante der NCL (CLN6)

Bei der spät infantilen Variante der NCL ist das *CLN6* mutiert, das für ein Transmembranprotein noch unbekannter Funktion codiert und das keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen zeigt. Da der zugrunde liegende Pathomechanismus dieser Erkrankung nicht bekannt ist, sollte das

Proteinexpressionsmuster lysosomaler Gewebefractionen von Patienten untersucht und das CLN6-Protein charakterisiert werden.

5.2.1 Anstieg der MnSOD-Expression

In dieser Arbeit wurden die Proteinexpressionsmuster von angereicherten Mitochondrien/Lysosomen-(ML)-Fraktionen aus Kontroll- und CLN6-Patientenfibroblasten durch ein- und zwei-dimensionale Elektrophorese mit anschließender Coomassie- oder Silberfärbung analysiert und veränderte Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert (Abb. 2A und B). Die mitochondriale Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD) ist in Gehirn und Fibroblasten sowohl von CLN6-Patienten als auch im OCL6-Schafsmodell in seiner Proteinexpression um das 4,4- bis 20-fache erhöht, was durch Westernblotanalyse bestätigt wurde (Abb. 3-9). Gleichzeitig sind erhöhte MnSOD-Aktivitäten in ML-Fraktionen von CLN6- und OCL6-Fibroblasten meßbar (Abb. 10A und B). Real-Time-PCR-Analysen haben ergeben, daß die erhöhten MnSOD-Spiegel auf eine gesteigerte Transkriptionsrate (Abb. 11) und nicht auf den verminderten Abbau mit Akkumulation im Speicher material (Abb. 12), wie für die c-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (sub c) nachgewiesen wurde (Palmer et al., 1989), zurückzuführen ist. Auch Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen belegen, daß die mitochondriale Lokalisation von MnSOD in CLN6-Patientenzellen unverändert ist (Abb. 14).

Die humane MnSOD (auch als SOD2 bezeichnet) wirkt als Radikalfänger in der mitochondrialen Matrix, die die Zellen vor oxidativem Stress schützt. Es metabolisiert Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid, das dann durch Catalase und Glutathion-Peroxidase zu Wasser reduziert werden kann. MnSOD ist aus vier identischen Untereinheiten von je 24,5 kDa zusammengesetzt und bildet einen 96 kDa homotetrameren Komplex, wobei je ein Mn^{2+} -Ion pro Untereinheit vorliegt (Macmillan-Crow & Cruthirds, 2001). MnSOD ist nukleär codiert und wird über eine N-terminale Signalsequenz in die Mitochondrien transloziert. Es gibt noch zwei weitere Superoxiddismutasen, die aber Kupfer/Zink-abhängig sind, wobei eine als Homodimer im Zytosol vorliegt (SOD1) und die andere als glykosyliertes Homotetramer (SOD3) v.a. im Extrazellulärraum zu finden ist (Fridovich, 1995).

An anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer Krankheit, der Amyotrophen Lateralen Sklerose (ALS) und der Parkinson'schen Erkrankung konnte gezeigt werden, daß Superoxidanionen und andere reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species; ROS) wie Hydroxylradikale (OH^\bullet) und Peroxynitrit (ONOO^-) eine Rolle spielen (Fahn & Cohen 1992; Ferrante et al., 1997). So konnte bei der Alzheimer Krankheit eine erhöhte Nitrotyrosin-Immunreaktivität nachgewiesen werden (Sayre et al., 1997; Smith et al., 1997). Bei der Parkinson'schen Erkrankung wird von einer Erhöhung des oxidativen Stresses berichtet (Koutsilieri et al., 2002) und bei der ALS werden gesteigerte Mengen an freiem 3-Nitrotyrosin gemessen (Crow et al., 1997). ROS entstehen in den Mitochondrien v.a. als Nebenprodukte der Atmungskette (Fridovich, 1989). ROS können mitochondriale Lipide, Proteine und DNA oxidieren (Richter et al., 1988), was dann zur Freisetzung von Cytochrom c, Procaspasen und Apoptose-induzierenden Faktoren führen kann (Liu et al., 1996; Petronilli et al., 1994). Auch für die MnSOD sind Nitrierungen an spezifischen Tyrosinresten durch Peroxynitrit beschrieben worden, was mit einer Inaktivierung verbunden sein könnte (MacMillan-Crow et al., 1996), die wiederum positiv auf die MnSOD-Synthese wirken kann (Macmillan-Crow & Cruthirds, 2001). Es ist daher möglich, daß Anteile der zellulären MnSOD in CLN6- und OCL6-Geweben nitriert sind, was einerseits die erhöhte Syntheserate und andererseits das Vorkommen von 2 Formen der MnSOD mit unterschiedlichem pI (Abb 7, 9A) in Fibroblasten und Hirngewebe bzw. 3 Formen in Lebergewebe (Abb. 9B) erklären könnte. Westernblotanalysen mit einem kommerziellen anti-Nitrotyrosin-Antikörper, schlagen jedoch bei der Erkennung nitrierter Formen der MnSOD fehl (Daten nicht gezeigt). Auch die vorläufigen Daten zur Bestimmung der Lipidoxidation als Funktion der Malondialdehyd-Konzentration sprechen für diese Annahme.

Im Gegensatz zur SOD1, bei der es sich um ein „house keeping gene“ handelt (Harris, 1992), kann die Synthese der MnSOD noch durch weitere Faktoren wie Wasserstoffperoxid, $\text{TNF}\alpha$, Interleukin-1 und andere Zytokine induziert werden (Visner et al., 1990; Wong & Goeddel, 1988; Yoshioka et al., 1994). Es wird für einige neurodegenerative Erkrankungen angenommen, daß apoptotische Prozesse im ZNS eine Aktivierung der Mikroglia bewirken, wie sie z.B. in Tiermodellen für die Sandhoff'sche-Erkrankung oder für Cathepsin D-Defizienz nachgewiesen wurde (Nakanishi et al., 2001; Wada et al., 2000). Die daraus

folgende Freisetzung von neurotoxischen Zytokinen soll die akute Neurodegeneration verstärken (Gray et al., 1999; Lassmann et al., 1995).

Der immunhistochemische MnSOD-Nachweis in humanem CLN6- und ovinem OCL6-Gehirngewebe zeigte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 2D-Elektrophorese und Westernblot eine intensivere Anfärbarkeit der MnSOD im Zellsoma, in verbliebenen Neuronen und in Astrozyten (Abb. 13). Die MnSOD-Immunreaktivität war insgesamt im betroffenen humanen Material höher als in ovinen Gehirnschnitten. Möglicherweise war das frühe Stadium der Erkrankung (6 Monate) bei der Gewebeentnahme ausschlaggebend für die detektierten Unterschiede zum humanen Material. Reaktive Astrozyten waren v.a. im humanen Hirngewebe stark anfärbbar.

Sub c ist in den meisten NCL-Formen, außer bei CLN1 und der congenitalen ovinen Cathepsin D-Defizienz (CONCL), die Hauptkomponente des Speichermaterials (Jolly et al., 2002; Koike et al., 2000; Palmer et al., 1992; Palmer et al., 1997; Tynnelä et al., 1997). Es wird angenommen, daß die lysosomale Akkumulation von sub c auf grundlegenden Defekten der lysosomalen Proteindegradation beruht. Im Gegensatz dazu scheint der Anstieg des MnSOD-Proteins spezifisch für CLN6 bzw. OCL6 zu sein, denn erhöhte MnSOD-Spiegel konnten weder in Fibroblasten von CLN2- und CLN3- noch in Gehirnmateriale von einem CLN5-Patienten und Cathepsin D-defizienten Mäusen beobachtet werden (Abb. 5). Die vorliegenden Daten können daher als Grundlage für weiterführende Arbeiten dienen, die MnSOD als diagnostischen Marker verwenden, um schneller und einfacher CLN6 zu diagnostizieren als durch die herkömmliche elektronenmikroskopische Auswertung des Speichermaterials.

Die Erhöhung des MnSOD-Spiegels ist sicherlich nicht eine direkte Folge der CLN6-Mutationen und die Rolle von MnSOD in der Pathogenese der Erkrankung ist noch unklar. Aktivierte Mikroglia produziert u.a. NO, das mit Superoxidanionen zu Peroxynitrat reagieren kann. Peroxynitrierung der MnSOD (N-MnSOD) könnte anschließend zur partiellen Inaktivierung und Induktion der MnSOD-Synthese führen. Die Peroxynitrierung anderer mitochondrialer Proteine führt letztlich zur Lipidoxidation, Membranzerstörung und Apoptose und könnte so zu neurodegenerativen Prozessen bei CLN6 beitragen (Abb.28).

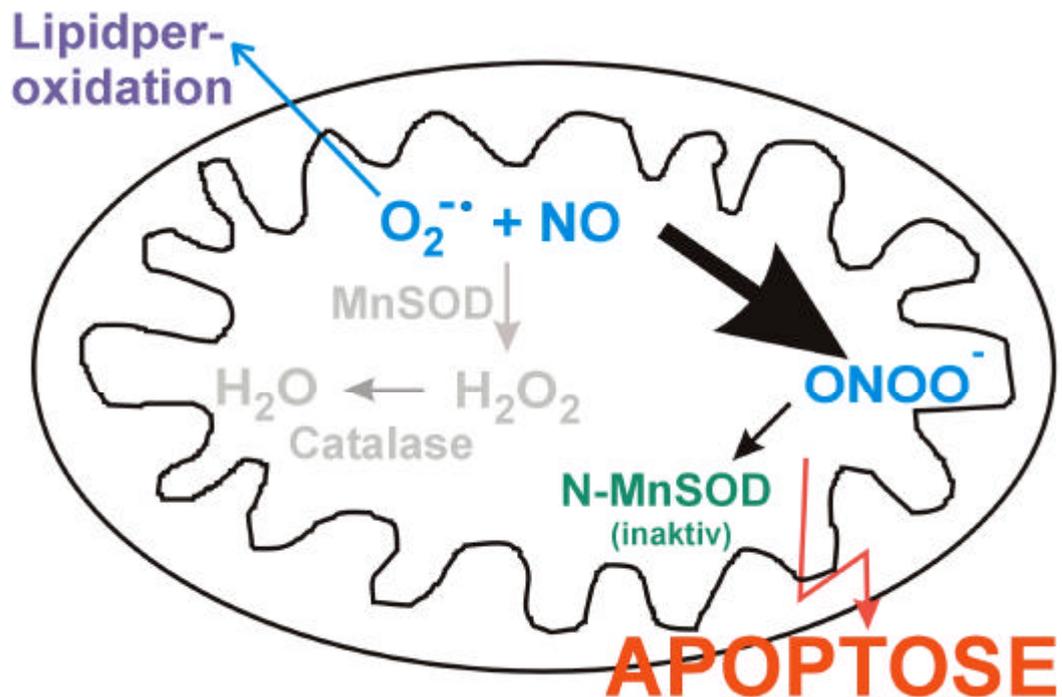


Abbildung 28: Mögliche Rolle der MnSOD in der Pathogenese der CLN6-Erkrankung.

Erhöhter oxidativer Stress aufgrund von erhöhter Bildung von „reactive oxygen species“ kann zu gesteigerter Bildung von Peroxynitrit führen. MnSOD kann an spezifischen Resten nitriert werden, was zu dessen partieller Inaktivierung und zur Induktion der MnSOD-Synthese führt. Der Anstieg der MnSOD-Expression könnte auch ein Ausdruck für umfassendere Modifikationen anderer mitochondrialer Enzyme sein, die mit gleichzeitiger Lipidoxidation und Membranzerstörung zur Apoptose und zu neurodegenerativen Prozessen bei CLN6 beitragen könnten.

5.2.2 $\alpha 2$ -Macroglobulin

In dieser Arbeit wurden neben MnSOD noch weitere Proteinbanden analysiert, die in angereicherten Mitochondrien/Lysosomen- (ML) Fraktionen aus CLN6-Patientenfibroblasten verändert waren. Massenspektrometrische Analysen haben ergeben, daß es sich bei der 90 kDa (Abb. 2B; Nr.2), 41 kDa (Abb. 2B; Nr. 3) und 18 kDa Bande (Abb. 2B; Nr. 4), die im Vergleich zu Kontrollen in CLN6-Patientenfraktionen in geringerer Menge vorhanden waren, um spezifische Fragmente des $\alpha 2$ -Macroglobulins ($\alpha 2$ -M) handelt (Abb. 2B und 15). Im Westernblot konnten noch weitere $\alpha 2$ -M-immunreaktive Fragmente mit einer molaren Masse von ~ 360 kDa, 74 kDa und 58 kDa nachgewiesen werden, die ebenfalls in CLN6-Patientenfibroblasten in geringerer Menge vorhanden waren.

α 2-M ist der Hauptproteaseinhibitor im Plasma von Vertebraten mit einer sehr breiten Substratspezifität und einer molaren Masse von 180 kDa (Barrett & Starkey, 1973; Sottrup-Jensen, 1989a). α 2-M liegt als Homotetramer vor, wobei je zwei Untereinheiten durch Disulfidbrücken verbunden sind und mit dem zweiten Dimer eine nicht-kovalente Bindung eingehen (Sottrup-Jensen, 1989a). Jede monomere Untereinheit des α 2-M enthält eine „Bait“-Region mit Schnittstellen für nahezu alle endogenen und viele bakterielle und virale Proteasen, eine Rezeptor-Bindungsstelle und eine Thiolesterbrücke (Sottrup-Jensen, 1989a; Sottrup-Jensen et al., 1989b). Der proteolytische Abbau der „Bait“-Domäne aller Untereinheiten durch eine Peptidase resultiert in Strukturänderungen des α 2-M. Die Konformationsänderung legt erst dann die Rezeptorbindungsdomäne des α 2-M frei (aktives α 2-M). Es sind zwei Rezeptoren für α 2-M beschrieben: der „Low-density-Lipoprotein-related receptor“ (LRP) und der „ α 2-M-signaling receptor“ (Howard et al., 1996). Andere Autoren gehen jedoch davon aus, daß es sich bei den beiden Rezeptoren um identische Proteine handelt (Herz et al., 1988; Strickland et al., 1990). Nach der Bindung des aktiven α 2-M an die Rezeptoren kommt es zur Endozytose des Liganden (Ashcom et al., 1990; Sottrup-Jensen, 1989a) und zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade. Dabei wird Phospholipase C aktiviert und Phosphoinositide hydrolysiert, die zur Freisetzung der sekundären Messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) führen. Erhöhte IP_3 -Spiegel bewirken die Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytoplasma und initiieren so diverse Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden. DAG aktiviert die Proteinkinase C, so daß Signalwege stimuliert werden, die von Proteinphosphorylierungen abhängig sind (Misra et al., 1999; Misra & Pizzo, 1998a; Misra & Pizzo, 1998b). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Inkubation von Makrophagen mit aktivem α 2-M deren Zellproliferation über cAMP-abhängige Signalkaskaden stimuliert (Misra et al., 2002).

Ein 39 kDa Polypeptid, das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP), bindet u.a. an LPR (Strickland et al., 1990) und fungiert als Chaperon während der Biosynthese von LRP (Willnow et al., 1995). RAP dissoziiert im späten Golgi-Apparat vom LRP aufgrund des geringeren pH-Wertes. Geringe Mengen an RAP sind also auch in Endosomen und an der Plasmamembran nachgewiesen (Bu et al., 1994; Mokuno et al., 1994; Orlando et al., 1992). Bei Überexpression von RAP kann sezerniertes

RAP an LRP an der Plasmamembran binden und so die Bindung und Endozytose von Liganden inhibieren (Bu et al., 1995; Bu et al., 1994; Herz et al., 1991; Moestrup & Gliemann, 1991; Williams et al., 1992; Willnow et al., 1994).

Northernblotanalysen zeigten, daß die α 2-M mRNA in Mäusen in den meisten Geweben nachweisbar ist mit der höchsten Expression in Hirn, Lunge, Leber, Darm, Niere und Plazenta (Lorent et al., 1994). Die Bindung von α 2-M an Proteasen reguliert diverse biologische Prozesse wie z.B. Fibrinolyse und Koagulation (Vlaicu et al., 1985). α 2-M bindet darüberhinaus Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren. Die Fähigkeit zur Bindung von Amyloid β weist auf eine Rolle des α 2-M bei der Alzheimer'schen Demenz hin (Mettenburg et al., 2002). Amyloid β zirkuliert im Plasma und in der Zerebrospinalflüssigkeit in stabilen Komplexen mit α 2-M, die nach LRP-vermittelter Aufnahme abgebaut werden können (Narita et al., 1997).

Das hier gezeigte verminderte Vorkommen von α 2-M-Fragmenten in der Mitochondrien/Lysosomen-Fraktion aus CLN6-Fibroblasten kann das Resultat a) einer geringeren Aufnahme des α 2-M in die Zelle, b) eines erhöhten Abbaus oder c) einer verminderten Synthese sein. Die geringere Aufnahme des α 2-M könnte wiederum durch eine erniedrigte Zahl von LRP an der Plasmamembran, eine Fehlsortierung oder verminderte Endozytoserate des LRP, eine Überexpression von RAP, fehlende Dissoziation des RAP vom LRP oder durch einen geringeren Gehalt an Proteasen, die das α 2-M vor der Bindung an LRP aktivieren, begründet sein. FACS-Analysen unter Verwendung von FITC-markierten anti-LRP-Antikörpern können Auskunft über die Menge an Zelloberflächen-LRP geben. Die Endozytoserate des LRP kann durch Biotinylierung aller Oberflächenproteine bei 4 °C und anschließender Internalisierung bei 37 °C und LRP-Immunpräzipitation gemessen werden. Alternativ kann die Kinetik der Endozytose durch Inkubation der Zellen mit [¹²⁵J]-markiertem, aktiviertem α 2-M mit nachfolgender Bestimmung der Abbaurate gemessen werden. Die anschließende subzelluläre Fraktionierung kann Aussagen zu möglichen unterbrochenen intrazellulären Transportwegen von endozytiertem [¹²⁵J]- α 2-M geben. Die intrazelluläre Abbaurate des endogen synthetisierten α 2-M kann außerdem durch Pulse-Chase-Experimente mit anschließender α 2-M-Immunpräzipitation analysiert werden. Auf gleiche Weise kann auch die Menge des neusynthetisierten, sezernierten α 2-M quantifiziert

werden. Ob andere Faktoren, wie z.B. das RAP, an der ungleichen Präsenz von α 2-M-Fragmenten in CLN6-Fibroblasten beteiligt sind, ist unklar. Kopräzipitationsanalysen von LRP-, α 2-M-Immunkomplexen mit RAP aus Zellhomogenaten sind zur Beantwortung der Frage notwendig. Mögliche Unterschiede in der Syntheserate des α 2-M können durch Quantifizierung der mRNA aus Kontroll- und CLN6-Patientenfibroblasten nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten lassen keine Spekulationen über die mögliche Rolle von α 2-M in der Pathogenese von CLN6 zu.

5.2.3 Rolle von CLN6 für die Aufrechterhaltung lysosomaler Funktionen

CLN6 ist das bei der spätinfantilen Variante der NCL betroffene Gen. Der Zusammenhang zwischen den Mutationen verschiedenster Gene (*CLN2-8*) und der Speicherung der sub c ist unklar. Es sollte untersucht werden, ob lysosomale Enzyme korrekt synthetisiert und prozessiert werden, aber auch ob die Endozytose eines lysosomalen Enzyms durch massive Speicherungen in den Lysosomen gestört wird. Anhand des Beispiels Cathepsin D (CtsD) konnte durch Pulse-Chase-Experimente mit anschließender Immunpräzipitation von CtsD gezeigt werden, daß dessen Syntheserate; Sekretion und Prozessierung in OCL6-Schafsfibroblasten normal verläuft (Abb. 16). Auch die CtsD-Aktivität gegenüber einem künstlichen Substrat war in OCL6-Schafsfibroblasten unverändert im Vergleich zu den Kontrollen. Allerdings ist unklar, ob CtsD wirklich den Status aller lysosomalen Enzyme repräsentieren kann.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine erhöhte MPR300-abhängige Endozytose von [¹²⁵J]-markierter Arylsulfatase A (ASA) in OCL6-Schafsfibroblasten im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. 17A). Der Anstieg der Endozytose ist weder durch einen erhöhten „Gesamt-steady-state-Level“ des MPR300 (Abb. 17B und C), noch durch eine erhöhte MPR300-Konzentration an der Zelloberfläche (Abb. 17D) bedingt, wie sie etwa durch Wachstumsfaktor induzierte Umverteilung der MPR300 beschrieben wurde (Bräulke et al., 1990). Daher ist anzunehmen, daß die erhöhten Mengen an intrazellulär nachweisbarer [¹²⁵J]-ASA auf die erhöhte Internalisierungskinetik zurückzuführen ist. In embryonalen Fibroblasten von μ 1A-defizienten Mäusen

konnten ebenfalls Unterschiede im Transport lysosomaler Enzyme erhoben werden (Meyer et al., 2001). Das μ 1A-Adaptorprotein ist Teil des Adaptorkomplexes AP1 und soll am Rücktransport MPR300-haltiger Vesikel vom Endosom zum tGN beteiligt sein. Die Störung dieses Transportschrittes durch μ 1A-Defizienz führt anschließend zur Akkumulation der MPR300 im Endosom (Meyer et al., 2001). Die intrazelluläre Verteilung der MPR300 und die Faktoren, die die Lokalisation der MPR300 in OCL6-Fibroblasten reguliert, sind noch weiter zu untersuchen und zu identifizieren. Alternativ besteht die Möglichkeit, daß der Abbau internalisierter [125 J]-ASA in OCL6-Zellen vermindert ist und es daher zur Akkumulation kommt. Es ist aber ziemlich unwahrscheinlich, daß das humane lysosomale Enzym ASA innerhalb von 4 h Endozytosezeit komplett in den Kontrollzellen abgebaut wird. Es sind folglich weitere Endozytoseversuche in An- und Abwesenheit von Proteaseinhibitoren, sowie vergleichende Analysen von Liganden verschiedener Rezeptorsysteme (z.B. Transferrin, α 2-Macroglobulin oder „low density lipoprotein“) notwendig.

5.2.4 CLN6p

Die Protein-Funktion und -Topologie des CLN6p sind bisher ungeklärt. Das *CLN6* ist bei 5 untersuchten Spezies (Mensch, Maus, Kuh, Schwein und Huhn) hochkonserviert. Berechnungen lassen darauf schließen, daß es sich bei CLN6p um ein Protein mit 6-7 Transmembrandomänen handelt. Eine potentielle proteolytische Schnittstelle nach dem konservierten Histidin-Rest 29 könnte die N-Myristoylierung am Glycin-Rest 30 ermöglichen. Es gibt keine potentiellen Phosphorylierungsstellen (Gao et al., 2002; Wheeler et al., 2002). In Ermangelung eines Antikörpers gegen das endogene CLN6p erfolgte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von überexprimiertem CLN6p über eine C-terminale Fusion mit einem myc- und His-Tag. Gleichzeitig wurden so auch zwei CLN6p-Formen mit den beschriebenen Patientenmutationen G123D und Δ 154 analysiert (Wheeler et al., 2002). Die Missensemutation G123D liegt innerhalb der berechneten dritten Transmembrandomäne. Der Aminosäurerest I154 liegt innerhalb des dritten Loops und ist hochkonserviert (Abb. 22A). Alle drei exprimierten CLN6-Konstrukte waren in BHK-Zellen durch den anti-myc-Antikörper nachweisbar (Abb. 19). In Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen weisen sowohl das CLN6 Wildtyp Protein als auch

die CLN6-Mutanten eine Kolo­kalisierung mit dem ER-Markerprotein Protein Disulfid Isomerase, aber nicht mit der lysosomalen Protease Cathepsin D auf (Abb. 21). Das ist erstaunlich, da Mutationen im *CLN6* zu einer lysosomalen Speicherkrankheit führen und daher eher ein Defekt in einem lysosomalen Protein vermutet wurde. Es ist aber nicht auszuschließen, daß CLN6p durch den myc/His-Fusionsanteil fehlerhaft sortiert und im ER zurückgehalten wird. Andererseits wurde auch für das CLN8p eine ER-Lokalisation durch Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen in transient und stabil mit der CLN8 cDNA transfizierten BHK-, HeLa- und CHO-Zellen mit einem anti-CLN8-Peptidantikörper nachgewiesen (Lonka et al., 2000). Ein weiterer Hinweis, daß es sich bei CLN6p um ein nicht-lysosomales Protein handeln könnte, ist die Abwesenheit von potentiellen Glykosylierungsstellen. Die gut untersuchten lysosomalen Transmembranproteine, Lamp1, Lamp2, Limp1, Limp2 und LAP, sind alle hochglykosyliert (Granger et al., 1990; Winchester, 2001). Es ist jedoch zu bemerken, daß CLN6p keine typischen, zytosolischen ER-Retentionssignale enthält.

Die endgültige Aussage über die intrazelluläre Lokalisation von CLN6p muß aber durch Analysen mit Antikörpern gegen das endogene Protein belegt werden. Die Immunisierung von Kaninchen zur Generierung spezifischer anti-humaner-CLN6-Peptidantikörper wurde begonnen. Ihr Einsatz in Immunfluoreszenz-, Westernblot- und Immunpräzipitations-Analysen ist vorgesehen.

Die CLN6-Konstrukte mit den beiden Patientenmutationen weisen keinen Unterschied in der intrazellulären Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp-CLN6p auf, was möglicherweise durch den myc/His-Tag hervorgerufen wird. Analysen zur Stabilität haben jedoch gezeigt, daß die Halblebenszeit ($t_{1/2}$) der CLN6G123D- und CLN6 Δ 154-Proteine bei weniger als 6 h liegt, während die Hälfte des Wildtyp-Proteins erst nach 24 h abgebaut war (Abb. 20). Die verkürzte $t_{1/2}$ macht sich auch in der niedrigeren „steady-state-Konzentration“ der Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Protein bemerkbar (Abb. 19B). Der Austausch des neutralen Glycin-Restes 123 gegen einen geladenen Aminosäurerest (G123D) führt wahrscheinlich zur Zerstörung der dritten Transmembrandomäne und somit zur inkorrekten Faltung und Integration des Proteins in die Membran, was die drastisch verkürzte $t_{1/2}$ erklären könnte und auch bei anderen Transmembranproteinen beobachtet wurde (Shieh et al., 2002). Die Deletion des Isoleucin-Restes 154 innerhalb des dritten Loops sollte dagegen die Topologie des CLN6p nicht so stark beeinflussen.

Trotzdem kommt es zum schnellen Abbau. Dies läßt darauf schließen, daß der Isoleucin-Rest 154 funktionell oder die Länge des Loops bedeutend ist. Die Verkürzung eines zytoplasmatischen Loops in MPR46 um 4-5 Aminosäurereste reduziert ebenfalls die $t_{1/2}$ des mutierten Rezeptors um das etwa 4-fache, während die Auffüllung der deletierten Aminosäurereste mit Alanin die Stabilität des MPR46 erhöht (Breuer & Braulke, 1998).

Die Topologie des CLN6p wurde durch Trypsinresistenzanalysen an Membranfraktionen aus CLN6-überexprimierenden BHK-Zellen untersucht. Die Verkürzung des CLN6p um etwa 3 kDa und der Schutz des myc/His-Tags vor Trypsinverdau legen die Vermutung nahe, daß der C-Terminus im ER-Lumen liegt (Abb 22B). Der N-Terminus zeigt wahrscheinlich ins Zytoplasma, da die Verkürzung des CLN6p um etwa 3 kDa mit der Masse des N-terminalen Peptides bis zur Trypsinspaltstelle am Aminosäurerest 39 vor der ersten Transmembrandomäne übereinstimmt.

Es kann zudem davon ausgegangen werden, daß die potentielle proteolytische Spaltstelle nach dem konservierten Histidin-Rest 29 tatsächlich verwendet wird. Nach N-terminaler Fusion des CLN6p mit GFP wird ein 34 kDa und nicht, wie angenommen, ein 64 kDa Fusionsprotein exprimiert. Dies besteht wahrscheinlich aus dem GFP-Protein (~28 kDa) mit den N-terminalen 29 Aminosäureresten des CLN6p.

Um einen Einfluß des myc/His-Tags auszuschließen, müssen am endogenen CLN6p die Untersuchungen zur Topologie mit anti-CLN6-Antikörpern bestätigt werden.

5.3 Cathepsin D-Defizienz, eine neue Form der NCL

Der Aktivitätsverlust des lysosomalen Enzyms Cathepsin D (CtsD) durch eine Mutation im aktiven Zentrum (D295N) führt bei Schafen zu einer neuen Form der NCL (CONCL). Die Tiere versterben innerhalb von 24 h nach der Geburt und zeigen lysosomale Speicherungen der Sphingolipid Aktivatorproteine A und D (Tynnela et al., 2000). Die vollständige Defizienz des CtsD-Proteins in CtsD-knock out Mäusen führt dagegen zu einem milderem Phänotyp. Die CtsD-defizienten Mäuse entwickeln sich in den ersten 2 Wochen nach der Geburt normal. Erst dann zeigen sich Symptome wie Erblindung, Krämpfe, Neurodegeneration, Speicherung

von sub c und Dünndarmnekrose. Der Tod tritt bei diesen Tieren postnatal zwischen Tag 25 und 27 auf (Nakanishi et al., 2001; Saftig et al., 1995).

Die auffälligen Unterschiede des Phänotyps von CONCL-Schafen und CtsD-defizienten Mäusen läßt auf nicht-enzymatische Funktionen des CtsD schließen, die möglicherweise für den schwereren Phänotyp in CONCL verantwortlich sind. Die zu der CONCL-Mutation korrespondierende Mutation D293N in der murinen CtsD-Sequenz führte nach Überexpression in HEK-293-Zellen neben dem Verlust der Aktivität zu einer Abspaltung eines kurzen Peptides, zu einer Retention des Enzyms im ER und zum Stabilitätsverlust (Partanen et al., 2003).

5.3.1 Heterotrimeres G_z-Protein

Vergleiche der Proteinmuster von mit Lysosomen angereicherten Fraktionen (Abb. 23) aus Hirngewebe von Wildtyp (WT) und CtsD-defizienten Mäusen wurden nach 2D-Elektrophorese und Silberfärbung angestellt. In CtsD-defizienten Maushirnfractionen verändert exprimierte Proteine wurden durch Massenspektrometrie identifiziert und durch Westernblotanalysen verifiziert (Abb. 24). Es konnte gezeigt werden, daß die α -Untereinheit des heterotrimeren G_z-Proteins (G α Z) in CtsD-defizienten Fraktionen in größerer Menge vorhanden war als in Kontrollen (Abb. 25).

G_z ist ein GTP-bindendes regulatorisches Protein, bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheit, dem eine wichtige Rolle bei zellulären Signalprozessen zukommt (Neer, 1995). Die Bindung von GTP an G α Z, das durch die Ligandenbindung an „G protein-coupled receptors“ (GPCRs) und „GTP exchange factors“ (GEF) eingeleitet wird, führt zur Dissoziation der β/γ -Untereinheiten von der GTP-gebundenen α -Untereinheit, was dann verschiedenste Signalkaskaden auslöst. Der Nachweis von Interaktionen mit dem Adenosin A₁, α_2 -adrenergen-, Dopamin D₂-, muscarinergen M₂- und allen Typen von Opioid-Rezeptoren, lassen auf eine Rolle bei der neuronalen Funktion schließen (Ho & Wong, 2001). Die α -Untereinheit besitzt eine endogene GTPase-Aktivität, dessen Kinetik jedoch bei G α Z etwa 200-fach langsamer ist als bei anderen G-Proteinen (Ho & Wong, 2001). Die GTP-Hydrolyse wird durch „GTPase-activating proteins“ (GAPs) gesteigert, die bei den G-Proteinen als „regulators of G-protein signaling“ (RGS) bezeichnet werden (Berman & Gilman, 1998). Die 3 Untereinheiten reassoziieren

nach GTP-Hydrolyse (Sprang, 1997). $G\alpha Z$ inhibiert einige Adenylyl-Cyclasen (Wong et al., 1992) und stimuliert K^+ -Kanäle (Jeong & Ikeda, 1998). Mutationen in $G\alpha Z$, die entweder die Myristoylierungs- oder Palmitoylierungs-Stelle beeinträchtigen, führen zu fehlerhafter intrazellulärer Lokalisation (Linder et al., 1993; Morales et al., 1998; Mumby et al., 1990). G-Proteinen werden primär Funktionen bei der Signaltransduktion an der Plasmamembran zugeschrieben, aber sie spielen auch eine Rolle beim intrazellulären, vesikulären Transport vom ER zum Golgi (Schwaninger et al., 1992; Lang, 1999), bei intra-Golgi-Transportprozessen (Helms et al., 1998), bei der Proteinsortierung und Vesikelabschnürung vom tGN (Leyte et al., 1992; Pimplikar & Simons, 1993), bei der Kontrolle der Exozytose (Aridor et al., 1993; Ohara-Imaizumi et al., 1992; Ohnishi et al., 1997) und bei der Autophagozytose (Ogier-Denis et al., 1996). Die Überexpression von $G\alpha Z$ schützt vor der durch 1,4-Bis(3,4-Dihydroxyphenyl)-2,3-Dimethylbutan induzierten Auflösung des Golgi-Apparates (Yamaguchi et al., 2000). Untersuchungen zur Überexpression der $G\alpha Z$ -spezifischen RGS, RGSZ1 und 2, zeigten, daß Inaktivierung des $G\alpha Z$ durch induzierte GTP-Hydrolyse zur Auflösung des Golgi-Apparates führt (Nagahama et al., 2002).

Das G_z -Protein gehört zur Unterfamilie der G_i -Proteine, das sich jedoch durch Pertussistoxin (PTX)-Insensitivität auszeichnet, da der α -Untereinheit der C-terminale Cystein-Rest für die PTX-katalysierte ADP-Ribosylierung fehlt (Ho & Wong, 2001). $G\alpha Z$ wird v.a. in neuronalen Geweben und der Retina exprimiert. $G\alpha Z$ -defiziente Mäuse sind zwar kleiner als die Kontrolltiere, sind aber gesund und fertil. Es ist beschrieben worden, daß sie eine Reduktion der Tyrosin-Hydroxylase-Aktivität in der Speicheldrüse und ebenfalls verminderte Cholin-Acetyltransferase-Aktivität in der Nebennierendrüse zeigen (Powell et al., 2002). Andere konnten beobachten, daß unter normalen Bedingungen die $G\alpha Z$ -defizienten Mäuse nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden waren. Es zeigten sich nur Unterschiede in der Reaktion auf Antidepressiva und Morphine, die bei den $G\alpha Z$ -knock out Mäusen keinen Effekt zeigten (Hendry et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, um die erhöhten Konzentrationen an $G\alpha Z$ in CtsD-defizienten Mäusen zu erklären. Es ist unklar, ob die Expressions- oder Abbaurate verändert ist, welche Faktoren regulierend auf den $G\alpha Z$ -Spiegel wirken und welche nachgeschalteten

Signalkaskaden beeinflusst sind. Da die lysosomale Protease CtsD fehlt, ist ein gestörter Abbau der G α Z denkbar. Aufgrund der Tatsache, daß G α Z spezifisch im ZNS und der Retina exprimiert wird, ist ein direkter Zusammenhang zu der Neurodegeneration und Erblindung bei CtsD-defizienten Tieren möglich.

5.3.2 Kleine, monomere G-Proteine der Ras-Superfamilie

Weitere Analysen durch Massenspektrometrie gaben die kleinen, monomeren GTP-bindenden Proteine Rab18, 19 und 4a als potentielle Kandidaten für verändert exprimierte Proteine in CtsD-defizienten Mäusen an (Abb. 24). [³²P]-GTP-Overlayblots nach 2D-Elektrophorese konnten Unterschiede bei den CtsD-defizienten Maushirnfraktionen im Muster der kleinen GTP-bindenden Proteine aufzeigen (Abb. 26). Leider konnten die in ihrer Proteinkonzentration veränderten GTP-bindenden Proteine nicht identifiziert werden, da die entsprechenden Antikörper nicht zur Verfügung standen. Es kann jedoch zumindest ausgeschlossen werden, daß Rab4, 5 und 7 in den CtsD-defizienten Tieren in ihrer Menge verändert sind (Abb. 27).

Insgesamt gibt es etwa 150 eukaryotische kleine, monomere G-Proteine, die in fünf Familien eingeteilt werden: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran (Paduch et al., 2001). Ras- und Rho-Proteine sind bei der Regulation der Genexpression involviert. Rho-Proteine können außerdem die Reorganisation des Zytoskeletts regulieren, während Rab- und Sar1/Arf-Proteine den vesikulären Transport beeinflussen. Ran-Proteine sind am nukleären Transport und der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Paduch et al., 2001). Die kleinen G-Proteine sind, wie auch die heterotrimeren G-Proteine, GTP-Hydrolasen, deren GTPase-Aktivität durch Bindung an GAPs beschleunigt wird. Die Dissoziation von GDP und der folgende Austausch gegen GTP wird durch „guanine nucleotide exchange factors“ (GEF) vermittelt, während die Fähigkeit, Effektoren zu binden durch die Anwesenheit von „guanine dissociation inhibitors“ (GDI) verhindert wird (Paduch et al., 2001).

Die Identifizierung dieser kleinen, monomeren GTP-bindenden Proteine ist von großem Interesse, da bekannt ist, daß sie, neben der Kontrolle spezifischer Transportprozesse von Vesikeln zwischen den subzellulären Kompartimenten, auch den Transport der synaptischen Vesikel regulieren, der in Neuronen bei der

Neurotransmission essentiell ist. Rab3A, B und C z.B. sind an synaptischen Vesikeln zu finden (Fischer von Mollard et al., 1994; Jahn & Südhof, 1999). Die Deletion des Rab3A beeinflusst nicht die Anzahl und Verteilung der synaptischen Vesikel, aber unterdrückt ihre Rekrutierung zur aktiven Zone nach Depolarisation der Neuronen (Leenders et al., 2001).

Es bleibt zu analysieren, a) welche kleinen G-Proteine in veränderter Menge in CtsD-defizienten Mäusen exprimiert werden, b) ob und welche weiteren regulatorischen Proteine wie GAPs, GEFs und GDIs in ihrer Konzentration und Funktion verändert sind, c) welche Transportschritte zu Lysosomen beeinflusst sind und d) welcher Zusammenhang zwischen der CtsD-Defizienz und der Neurodegeneration und Speicherung von sub c besteht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL), auch als „Batten disease“ bezeichnet, stellen die häufigste Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter dar. Genetisch und klinisch lassen sich mindestens 8 Formen unterscheiden, deren zugrunde liegender Pathomechanismus weitgehend unbekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die 2D-Elektrophoresetechnik mit anschließender Massenspektrometrie und verschiedenste biochemische und zellbiologische Methoden eingesetzt, um Proteine zu identifizieren und zu charakterisieren, die in ihrer Expression in kultivierten Zellen oder Geweben bei der spätinfantilen Variante der NCL mit Defekten im *CLN6*-Gen und bei einer Defizienz der lysosomalen Protease Cathepsin D (CtsD) verändert sind. Beide autosomal-rezessiv vererbten Gendefekte führen zu einer lysosomalen Speicherkrankheit mit spezifischen ZNS-Veränderungen.

- ◆ Im Hirngewebe und kultivierten Fibroblasten von CLN6-Patienten, sowie in den Geweben des Southhampshire-Schafes, eines natürlich vorkommenden Tiermodells dieser Erkrankung mit ähnlichem Phänotyp (OCL6), konnte ein 4,4- bis 20-facher Anstieg der Proteinmenge der mitochondrialen Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (MnSOD) nachgewiesen werden. Die Aktivität der MnSOD liegt 2- bis 3-fach über der in Kontrollen. Die Veränderung der MnSOD-Expression ist CLN6-spezifisch.
- ◆ Die Quantifizierung der MnSOD mRNA zeigte, daß der Anstieg der MnSOD-Proteinmenge auf eine erhöhte Synthese und nicht auf verminderten Abbau zurückzuführen ist.
- ◆ Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen an kultivierten Fibroblasten als auch immunhistochemische Färbungen an Hirnschnitten beweisen die mitochondriale Lokalisation der MnSOD und dessen erhöhte Expression in Neuronen und reaktiven Astrozyten.
- ◆ Die veränderte MnSOD-Expression in Geweben von CLN6-Patienten und in OCL6-Material kann als Folge oxidativen Stresses aufgrund erhöhter Bildung von „reactive oxygen species“ angesehen werden. Peroxynitrit-

induzierte Inaktivierung und anschließende Induktion der MnSOD-Synthese können ein Ausdruck für umfassendere Modifikationen anderer mitochondrialer Proteine sein, die mit gleichzeitiger Lipidoxidation und Membranzerstörung zur Apoptose und zu neurodegenerativen Prozessen bei CLN6 beitragen.

- ◆ Die Prozessierung und der Transport des neusynthetisierten CtsD zu den Lysosomen ist unbeeinträchtigt, während die Endozytose eines [¹²⁵J]-markierten lysosomalen Enzyms, der Arylsulfatase A, bei gleicher Menge an 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, in OCL6-Fibroblasten erhöht ist.
- ◆ Expressionsstudien mit Wildtyp und mutierten CLN6p-Formen in BHK-Zellen weisen auf eine ER-Lokalisation hin. Der N-Terminus des CLN6p liegt im Zytoplasma, während der C-Terminus dem ER-Lumen zugewandt ist. Der Zusammenhang zwischen möglicher ER-Lokalisation von mutiertem CLN6p, veränderter Endozytose lysosomaler Enzyme und lysosomaler Akkumulation von Speichermaterial ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt spekulativ.
- ◆ Analyse des Proteinmusters von Lysosomenfraktionen, die aus Hirngewebe von Kontroll- und CtsD-defizienten Mäusen durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden, weisen auf veränderte Expression von GTP-bindenden Proteinen hin. Die α -Untereinheit des heterotrimeren G_z-Proteins und drei weiterer kleiner, monomerer GTP-bindender Proteine sind in CtsD-defizienten Mäusen in ihrer Konzentration verändert. Die Identifizierung von veränderten Transportwegen, an denen diese G-Proteine möglicherweise beteiligt sind, und die Bedeutung von enzymatischen und nicht-enzymatischen Funktionen von CtsD sind Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aridor M, Rajmilevich G, Beaven MA, Sagi-Eisenberg R. (1993). Activation of exocytosis by the heterotrimeric G protein Gi3. *Science* 262, 1569-72.
- Ashcom JD, Tiller S, Dickerson K, Cravens JL, Argraves WS, Strickland DK. (1990). The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin. *J Cell Biol* 110, 1041-8.
- Barrett AJ, Starkey P. (1973). The interaction of alpha-2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 181, 401-18.
- Beauchamp C, Fridovich I. (1971). Superoxide Dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamid gels. *Anal Biochem* 44, 276-87.
- Berchem G, Glondu M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E. (2002). Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 21, 5951-5.
- Berkelman T, Stenstedt T. (1998). 2-D Electrophoresis. Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Berman DM, Gilman A. (1998). Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate. *J Biol Chem* 273, 1269-72.
- Beutler E (1997). Enzyme replacement therapy for Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol* 10, 751-63.
- Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Boldrini R, Biselli R, Santorelli FM, Bosman C. (2001). Neuronal ceroid lipofuscinosis: an ultrastructural, genetic, and clinical study report. *Ultrastruct Pathol* 25, 51-8.
- Bonner WM, Laskey R. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem* 46, 83-8.

- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Braulke T (1996). Origin of lysosomal proteins, *Subcell Biochem* 27, 15-49.
- Braulke T, Tippmer S, Chao H-J, von Figura K. (1990). Insulin-like growth factors I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts. *J Biol Chem* 265, 6650-5.
- Braun M, Waheed A, von Figura K. (1989). Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J* 8, 3633-40.
- Breuer P, Braulke T. (1998). Stabilization of mutant 46-kDa mannose 6-phosphate receptors by proteasomal inhibitor lactacystin. *J Biol Chem* 273, 33254-8.
- Breuer P, Körner C, Boker C, Herzog A, Pohlmann R, Braulke T. (1997). Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for transport to the plasma membrane in Madin-Darby canine kidney and mouse fibroblast cells. *Mol Biol Cell* 8, 567-76.
- Bronson RT, Donahue L, Johnson KR, Tanner A, Lane PW, Faust JR. (1998). Neuronal ceroid lipofuscinosis (nclf), a new disorder of the mouse linked to chromosome 9. *Am J Med Genet* 77, 289-97.
- Bronson RT, Lake B, Cook S, Taylor S, Davisson MT. (1993). Motor neuron degeneration of mice is a model of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *Ann Neurol* 33, 381-5.
- Broom MF, Zhou C. (2001). Fine mapping of ovine ceroid lipofuscinosis confirms orthology with CLN6. *Eur J Paediatr Neurol* 5, 33-5.
- Broom MF, Zhou C, Broom JE, Barwell KJ, Jolly RD, Hill DF. (1998). Ovine neuronal ceroid lipofuscinosis: a large animal model syntenic with the human neuronal ceroid lipofuscinosis variant CLN6. *J Med Genet* 35, 717-21.
- Bu G, Geuze H, Strous GJ, Schwartz AL. (1995). 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J* 14, 2269-80.
- Bu G, Maksymovitch E, Geuze H, Schwartz AL. (1994). Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 269, 29874-82.

- Camp LA, Verkruyse L, Afendis SJ, Slaughter CA, Hofmann SL, (1994). Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase. *J Biol Chem* 269, 23212-9.
- Canfield WM, Johnson K, Ye RD, Gregory W, Kornfeld S. (1991). Localisation of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 266, 5682-8.
- Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* 86, 831-43.
- Carroll KS, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR. (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* 292, 1373-6.
- Cho S, Dawson PE, Dawson G, (2000). In vitro depalmitoylation of neurospecific peptides: implications for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosci Res* 62, 32-38.
- Clarke GD, Stoker MG, Ludlow A, Thornton M. (1970). Requirement of serum for DNA synthesis in BHK 21 cells: effects of density, suspension and virus transformation. *Nature* 227, 798-801.
- Claussen M, Kübler B, Wendland M, Neifer K, Schmidt B, Zapf J, Bräulke T. (1997). Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D. *Endocrinology* 138, 3797-803.
- Conibear E, Pearce B. (1994). A chimera of the cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/IGF-II receptor and lysozyme localizes to the TGN rather than prelysosomes where the bulk of the endogenous receptor is found. *J Cell Sci* 107, 923-932.
- Cook RW, Jolly R, Palmer DN, Tammen I, Broom MF, McKinnon R, (2002). Neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep. *Aust Vet J* 80, 292-7.
- Crow JP, Sampson J, Zhuang Y, Thompson JA, Beckman JS. (1997). Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. *J Neurochem* 69, 1936-44.

- Dell'Angelica EC, Klumperman J, Stoorvogel W, Bonifacino JS. (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* 280, 431-4.
- Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* 3, 11-21.
- Diaz E, Pfeffer S. (1998). TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* 93, 433-43.
- Dintzis SM, Pfeffer S. (1990). The mannose 6-phosphate receptor cytoplasmic domain is not sufficient to alter the cellular distribution of a chimeric EGF receptor. *EMBO J* 9, 77-84.
- Dintzis SM, Velculescu V, Pfeffer SR, (1994). Receptor extracellular domains may contain trafficking information. Studies of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 269, 2159-12166.
- Dittmer F, Ulbrich EJ, Hafner A, Schmahl W, Meister T, Pohlmann R, von Figura K. (1999). Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *J Cell Sci* 122, 1591-7.
- Doray B, Bruns K, Ghosh P, Kornfeld S. (2002). Interaction of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor with GGA proteins. *J Biol Chem* 277, 18477-82.
- Dyken PJ. (1989). The neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Child Neurol* 4, 165-174.
- Elleder M, Sokolova J, Hrebicek M. (1997). Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase (SCMAS) in Batten disease and in unrelated lysosomal disorders. *Acta Neuropathol* 93, 379-90.
- Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Kominami E. (2000). Tripeptidyl peptidase I, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product, initiates the lysosomal degradation of subunit c of ATP synthase. *J Biochem (Tokyo)* 128, 509-16.

- Ezaki J, Tanida I, Kanehagi N, Kominami E. (1999). A lysosomal proteinase, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene (CLN2) product, is essential for degradation of a hydrophobic protein, the subunit c of ATP synthase. *J Neurochem* 72, 2573-82.
- Ezaki J, Wolfe LS, Higuti T, Ishidoh K, Kominami E. (1995). Specific delay of degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *J Neurochem* 64, 733-41.
- Ezaki J, Wolfe LS, Kominami E. (1996). Specific delay in the degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is derived from cellular proteolytic dysfunction rather than structural alteration of subunit c. *J Neurochem* 67, 1677-87.
- Fahn S, Cohen G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32, 804-12.
- Faust JR, Rodman JS, Daniel PF, Dice JF, Bronson RT. (1994). Two related proteolipids and dolichol-linked oligosaccharides accumulate in motor neuron degeneration mice (mnd/mnd), a model for neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 269, 10150-5.
- Feng Y, Press B, Wandinger-Ness A, (1995). Rab 7: An important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* 131, 1435-52.
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RH Jr, Beal MF. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69, 2064-74.
- Fischer von Mollard G, Stahl B, Li C, Südhof TC, Jahn R. (1994). Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem* 19, 164-9.
- Fridovich I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 264, 7761-4.
- Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112.
- Fujita H, Tanaka Y, Kono A, Himeno M, Kato K. (1991). Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding rat liver cathepsin D and the structure of three forms of mature enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 179, 190-6.

- Fukunaga K, Suzuki T, Takama K. (1993). Highly sensitive high-performance liquid chromatography for the measurement of malondialdehyde in biological samples., *J Chromatogr* 621, 77-81.
- Fürst W, Sandhoff K. (1992). Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochem Biophys Acta* 1126, 1-16.
- Gao H, Boustany RM, Espinola JA, Cotman SL, Srinidhi L, Antonellis KA, Gillis T, Qin X, Liu S, Donahue LR, Bronson RT, Faust JR, Stout D, Haines JL, Lerner TJ, MacDonald ME. (2002). Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse. *Am J Hum Genet* 70, 324-35.
- Gardiner RM. (2000). The molecular genetic basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurol Sci* 21, S35-S41.
- Gieselmann V. (1995). Lysosomal storage diseases. *Biochem Biophys Acta* 1270, 103-36.
- Gieselmann V, Hassilik A, von Figura K. (1985). Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *J Biol Chem* 260, 3215-20.
- Glickman JN, Kornfeld S. (1993). Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J Cell Biol* 123, 99-108.
- Granger BL, Green SA, Gabel CA, Howe CL, Mellmann I, Helenius A. (1990). Characterisation and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem* 265, 12036-43.
- Gray F, Chretien F, Adle-Biassette H, Dorandeu A, Ereau T, Delisle MB, Kopp N, Ironside JW, Vital C. (1999). Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 321-8.
- Guanieri FG, Arterburn LM, Penno MB, Cha Y, August JT. (1993). The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem* 268, 1941-6.
- Hall NA, Lake BD, Dewji NN, Patrick AD, (1991). Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in Batten's disease (ceroid lipofuscinosis). *Biochem J* 275, 269-272.
- Harris ED. (1992). Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase. *J Nutr* 122 (3 Suppl), 636-40.

- Haskell RE, Carr CJ, Pearce DA, Bennett MJ, Davidson BL, (2000). Batten disease: evaluation of CLN3 mutations on protein localization and function. *Hum Mol Genet* 9, 735-44.
- Hellsten E, Vesa J, Olkkonen VM, Jalanko A, Peltonen L, (1996). Human palmitoyl protein thioesterase: evidence for lysosomal targeting of the enzyme and disturbed cellular routing in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *EMBO J* 15, 5240-5.
- Helms JB, Helms-Brons D, Brugger B, Gkantiragas I, Eberle H, Nickel W, Nurnberg B, Gerdes H-H, Wieland FT. (1998). A putative heterotrimeric G protein inhibits the fusion of COPI-coated vesicles. Segregation of heterotrimeric G proteins from COPI-coated vesicles. *J Biol Chem* 273, 15203-8.
- Hendry IA, Kelleher KL, Bartlett SE, Leck KJ, Reynolds AJ, Heydon K, Mellick A, Megirian D, Matthei KI. (2000). Hypertolerance to morphine in G(z α)-deficient mice. *Brain Res* 870, 10-9.
- Herva R, Tyynelä J, Hirvasniemi A, Syrjäkallio-Ylitalo M, Haltia M. (2000). Northern epilepsy: a novel form of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain Pathol* 10, 215-22.
- Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS. (1991). 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 266, 21232-8.
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500 kDa liver membrane protein closely related to the LDL receptor suggests a physiological role as a lipoprotein receptor. *EMBO J* 7, 4119-27.
- Ho MKC, Wong YH (2001). G(z) signaling: emerging divergence from Gi signaling. *Oncogene* 20, 1615-25.
- Höning S, Hunziker W. (1995). Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-1) in MDCK cells. *J Cell Biol* 128, 464-73.
- Höning S, Sandoval IV, von Figura K. (1998). A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J* 17, 1304-14.

- Howard GC, DeCamp D, Misra UK, Pizzo SV. (1996). Identification of residues in alpha-macroglobulins involved in activation of the alpha 2-macroglobulin signaling receptor. *Biochim Biophys Acta* 1297, 111-4.
- Isosomppi J, Vesa J, Jalanko A, Peltonen L. (2002). Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. *Hum Mol Genet* 11, 885-91.
- Jahn R, Südhof TC. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863-911.
- Janes RW, Munroe PB, Mitchison HM, Gardiner RM, Mole SE, Wallace BA, (1996). A model for Batten disease protein CLN3: functional implications from homology and mutations. *FEBS Lett* 399, 75-77.
- Järplid B, Haltia M. (1993). An animal model of the infantile type of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *J Inher Metab Dis* 16, 274-7.
- Jarvela I, Lehtovirta M, Tikkinen R, Kyttälä A, Jalanko A, (1999). Defective intracellular transport of CLN3 is the molecular basis of Batten disease (JNCL). *Hum Mol Genet* 8, 1091-8.
- Jarvela I, Sainio M, Rantmäki T, Oikarinen VM, Carpen O, Peltonen L, Janes RW, (1998). Biosynthesis and intracellular targeting of the CLN3 protein defective in Batten disease. *Hum Mol Genet* 7, 265-71.
- Jeong SW, Ikeda S. (1998). G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. *Neuron* 21, 1201-12.
- Johnson KF, Kornfels S. (1992a). The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* 119, 249-57.
- Johnson KF, Kornfeld S. (1992b). A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J Biol Chem* 267, 17110-5.
- Jolly RD, Brown S, Das AM, Walkley SU. (2002). Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Neurochem Int* 40, 565-71.

- Jolly RD, Shimada A, Dopfmer I, Slack PM, Birtles MJ, Palmer DN. (1989). Ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis and sequential neuropathological changes in the ovine model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15, 371-83.
- Jolly RD, Walkley SU. (1999). Ovine ceroid lipofuscinosis (OCL6): postulated mechanism of neurodegeneration. *Mol Genet Metab* 66, 376-80.
- Kagedal K, Johansson U, Ollinger K. (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 15, 1592-4.
- Karlsson K, Carlsson S. (1998). Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose-6-phosphate receptor/g-Adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 273, 18966-73.
- Klose J, Kobalz U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034-59.
- Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K, Uchiyama Y. (2000). Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 20, 6898-906.
- Kominami E, Ezaki J, Muno D, Ishido K, Ueno T, Wolfe LS, (1992). Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *J Biochem (Tokyo)* 111, 278-82.
- Kornfeld S, Mellman I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5, 483-525.
- Koutsilieri E, Scheller C, Grunblatt E, Nara K, Li J, Riederer P. (2002). Free radicals in Parkinson's disease. *J Neurol* 249 Suppl 2, 1-5.
- Lang. (1999). Molecular mechanism and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259, 3-17.
- Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol (Berl)* 89, 35-41.

- Le Borgne R, Alconada A, Bauer U, Hoflack B. (1998a). The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 273, 29451-61.
- Le Borgne R, Hoflack B. (1998b). Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1404, 195-209.
- Le Borgne R, Schmidt A, Mauxion F, Griffiths G, Hoflack B. (1993). Binding of AP-1 Golgi adaptors to membranes requires phosphorylated cytoplasmic domains of mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J Biol Chem* 268, 22552-6.
- Leenders AG, Lopes da Silva F, Ghijsen WE, Verhage M. (2001). Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol Biol Cell* 12, 3095-102.
- Leyte A, Barr FA, Kehlenbach RH, Huttner WB. (1992). Multiple trimeric G-proteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *EMBO J* 11, 4795-4804.
- Lin L, Sohar I, Lackland H, Lobel P. (2001). The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *J Biol Chem* 276, 2249-55.
- Linder ME, Middleton P, Hepler JR, Taussig R, Gilman AG, Mumby SM. (1993). Lipid modifications of G proteins: alpha subunits are palmitoylated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3675-9.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (1996). Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 86, 147-57.
- 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.
- Lorent K, Overbergh L, Delabie J, VanLeuven F, Van den Berghe H. (1994). Distribution of mRNA coding for alpha-2-macroglobulin, the murinoglobulins, the alpha-2-macroglobulin receptor and the alpha-2-macroglobulin receptor associated protein during embryogenesis and in adult tissues. *Differentiation* 55, 213-23.

- Macmillan-Crow LA, Cruthirds D. (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 34, 325-36.
- MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. (1996). Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11853-8.
- Mayhew IG, Jolly R, Pickett BT, Slack PM. (1985). Ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis in blindness in the ovine model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 11, 273-90.
- Messer A, Flaherty L. (1986). Autosomal dominance in late-onset motor neuron disease in the mouse. *J Neurogenet* 3, 345-55.
- Mettenburg JM, Webb DJ, Gonias SL. (2002). Distinct binding sites in the structure of alpha 2-macroglobulin mediate the interaction with beta-amyloid peptide and growth factors. *J Biol Chem* 277, 13338-45.
- Meyer C, Eskelinen EL, Guruprasad MR, von Figura K, Schu P. (2001). μ 1A deficiency induces a profound increase in MPR300/IGF-II receptor internalization rate. *J Cell Sci* 114 (Pt 24), 4469-76.
- Misra UK, Akabani G, Pizzo SV. (2002). The role of cAMP-dependent signaling in receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin-induced cellular proliferation. *J Biol Chem* 277, 36509-20.
- Misra UK, Gawdi G, Pizzo SV. (1999). Ligation of low-density lipoprotein receptor-related protein with antibodies elevates intracellular calcium and inositol 1,4, 5-trisphosphate in macrophages. *Arch Biochem Biophys* 1999 Dec 15;372(2):238-47 372, 238-47.
- Misra UK, Pizzo SV. (1998a). Binding of receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin to the alpha2-macroglobulin signaling receptor activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 273, 13399-402.
- Misra UK, Pizzo SV (1998b). Ligation of the alpha2M signaling receptor with receptor-recognized forms of alpha2-macroglobulin initiates protein and DNA synthesis in macrophages. The effect of intracellular calcium. *Biochim Biophys Acta* 1401, 121-8.

- Mitchell WA, Wheeler RB, Sharp JD, Bate SL, Gardiner RM, Ranta US, Lonka L, Williams RE, Lehesjoki AE, Mole SE. (2001). Turkish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN7) may be allelic to CLN8. *Eur J Paediatr Neurol* 5 *Suppl A*, 21-7.
- Moestrup SK, Gliemann J. (1991). Analysis of ligand recognition by the purified alpha 2-macroglobulin receptor (low density lipoprotein receptor-related protein). Evidence that high affinity of alpha 2-macroglobulin-proteinase complex is achieved by binding to adjacent receptors. *J Biol Chem* 266, 14011-7.
- Mokuno H, Brady S, Kotite L, Herz J, Havel RJ. (1994). Effect of the 39-kDa receptor-associated protein on the hepatic uptake and endocytosis of chylomicron remnants and low density lipoproteins in the rat. *J Biol Chem* 269, 13238-43.
- Mole S, Gardiner M. (1999). Molecular genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Epilepsia* 3, 29-32.
- Morales J, Fishburn C, Wilson PT, Bourne HR. (1998). Plasma membrane localization of G alpha z requires two signals. *Mol Biol Cell* 9, 1-14.
- Mumby SM, Heukeroth RO, Gordon JI, Gilman AG. (1990). G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 728-32.
- Muschol N, Matzner U, Tiede S, Gieselmann V, Ullrich K, Braulke T. (2002). Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. *Biochem J* 368, 845-53.
- Nagahama M, Usui S, Shinohara T, Yamaguchi T, Tani K, Tagaya M. (2002). Inactivation of G alpha Z causes disassembly of the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 115, 4483-93.
- Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, von Figura K, Peters C, Yamamoto K, Saftig P, Uchiyama Y. (2001). Involvement of nitric oxide released from microglia-macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. *J Neurosci* 21, 7526-33.

- Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G. (1997). Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell-surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem* 69, 1904-11.
- Neer EJ. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-57.
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 28, 239-42.
- Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, Sue CM, Yamamoto A, Murakami N, Shanske S, Byrne E, Bonilla E, Nonaka I, DiMauro S, Hirano M. (2000). Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 406, 906-10.
- Oberley LW, St Clair DK, Autor AP, Oberley TD. (1987). Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys* 254, 69-80.
- Ogier-Denis E, Houri J-J, Bauvy C, Codogno P. (1996). Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein control autophagic sequestration in HT-29 cells. *J Biol Chem* 271, 28593-600.
- Ohara-Imaizumi M, Karneyama K, Kawae N, Takeda K, Muramatsu S, Kumakura K. (1992). Regulatory role of the GTP-binding protein, Go, in the mechanism of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 58, 2275-84.
- Ohnishi H, Ernst SA, Yule DI, Baker CW, Williams JA. (1997). Heterotrimeric G-protein Gq/11 localized on pancreatic zymogen granules is involved in calcium-regulated amylase secretion. *J Biol Chem* 272, 16056-61.
- Orlando RA, Kerjaschki D, Kurihara H, Biemesderfer D, Farquhar MG. (1992). gp330 associates with a 44-kDa protein in the rat kidney to form the Heymann nephritis antigenic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6698-702.
- Paduch M, Jelen F, Otlewski J. (2001). Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48, 829-50.

- Palmer DN, Fearnley IM, Medd SM, Walker JE, Martinus RD, Bayliss SL, Lake BD, Wolfe LS, Wolfe LS, Jolly RD. (1990). Lysosomal storage of DCCD reactive proteolipid subunit of mitochondrial ATP synthase in human and ovine ceroid-lipofuscinosis. in: Lipofuscin and Lipopigment (New York: Plenum), pp.211-23.
- Palmer DN, Fearnley IM, Walker JE, Hall NA, Lake BD, Wolfe LS, Haltia M, Martinus RD, Jolly RD. (1992). Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Med Genet* 42, 561-7.
- Palmer DN, Jolly RD, van Mil HC, Tyynelä J, Westlake VJ. (1997). Different patterns of hydrophobic protein storage in different forms of neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL, Batten disease). *Neuropediatrics* 28, 45-8.
- Palmer DN, Martinus RD, Cooper SM, Midwinter GG, Reid JC, Jolly RD. (1989). Ceroid-lipofuscinosis in sheep: The major lipopigment protein and the lipid binding subunit of mitochondrial ATP synthase have the same NH₂-terminal sequence. *J Biol Chem* 264, 5736-5740.
- Pardo CA, Rabin BA, Palmer DN, Price DL. (1994). Accumulation of the adenosine triphosphate synthase subunit C in the *mnd* mutant mouse. A model for neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Pathol* 144, 829-35.
- Partanen S, Storch S, Löffler H-G, Hasilik A, Tyynelä J, Bräulke 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 DA, Ferea T, Nosel SA, Das B, Sherman F. (1999). Action of BTN1, the yeast orthologue of the gene mutated in Batten disease. *Nature Genetics* 22, 55-8.
- Pearce DA, Sherman F. (1997). BTN1, a yeast gene corresponding to the human gene, responsible for Batten's disease, is not essential for viability, mitochondrial function, or degradation of mitochondrial ATP synthase. *Yeast* 13, 691-7.
- Pena JA, Cardozo JJ, Montiel CM, Molina OM, Boustany R. (2001). Serial MRI findings in the Costa Rican variant of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Pediatr Neurol* 25, 78-80.

- Persaud-Sawin D-ANW, VanDongen A, Boustany RMN, (2002). Motifs within the CLN3 protein: modulation of cell growth rates and apoptosis. *Hum Mol Genet* 11, 2129-42.
- Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P. (1994). The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem* 269, 16638-42.
- Pimplikar SW, Simons K. (1993). Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein. *Nature* 362, 456-8.
- Powell KL, Matthaei KI, Heydon K, Hendry IA. (2002). G(z alpha) deficient mice: enzyme levels in the autonomic nervous system, neuronal survival and effect of genetic background. *Int J Dev Neurosci* 20, 39-46.
- Puranam KL, Guo WX, Qian WH, Nikbakht K, Boustany RM. (1999). CLN3 defines a novel antiapoptotic pathway operative in neurodegeneration and mediated by ceramide. *Mol Genet Metab* 66, 294-308.
- Ranta S, Zhang Y, Ross B, Lonka L, Takkunen E, Messer A, Sharp J, Wheeler R, Kusumi K, Mole S, Liu W, Soares MB, Bonaldo MF, Hirvasniemi A, de la Chapelle A, Gilliam TC, Lehesjoki AE. (1999). The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and mnd mutant mice are associated with mutations in CLN8. *Nat Genet* 23, 233-6.
- Richter C, Park JW, Ames BN. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465-7.
- Robinson MS, Bonifacino J. (2001). Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13, 444-53.
- Rohrer J, Schweizer A, Johnson KF, Kornfeld S. (1995) A determinant in the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor prevents trafficking to lysosomes. *J Cell Biol* 130, 1297-306.
- Rosorius O, Issinger O, Braulke T. (1993). Phosphorylation of the cytoplasmic tail of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for the interaction with a cytosolic protein. *J Biol Chem* 268, 21470-3.

- Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Koster A, Hess B, Evers M, von Figura K, et al. (1995). Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 14, 3599-608.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Savukoski M, Klockars T, Holmberg V, Santavuori P, Lander ES, Peltonen L, (1998). CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277, 1802-5.
- Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68, 2092-7.
- Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA 3rd, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, Balow JE, Brady RO. (2001) Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 285, 2743-9
- Schulze-Garg C, Böker C, Nadimpalli SK, von Figura K, Hille-Rehfeld A. (1993). Tail-specific antibodies that block return of 46,000 Mr mannose-6-phosphate receptor to the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 122, 541-51.
- Schwaninger R, Plutner H, Bokoch GM, Balch WE. (1992). Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *J Cell Biol* 119, 1077-96.
- Schweizer A, Kornfeld S, Rohrer J. (1997). Proper sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in endosomes depends on a pair of aromatic amino acids in its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14471-6.
- Shieh J-J, Terzioglu M, Hiraiwa H, Marsh J, Pan C-J, Chen L-Y, Chou JY. (2002). The molecular basis of glycogen storage disease type 1a. *J Biol Chem* 277, 5047-53.

- Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17, 2653-7.
- Sottrup-Jensen L. (1989a). Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 264, 11539-42.
- Sottrup-Jensen L, Sand O, Kristensen L, Fey GH. (1989b). The alpha-macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 264, 15781-9.
- Sprang SR. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66, 639-78
- Stengel C. (1826). Account of a singular illness among four siblings in vicinity of Roraas. In *Ceroid lipofuscinosis (Batten's disease)*. K. N. Armstrong D, Rider JA, ed. (Amsterdam, Elsevier Biomedical Press), pp. 17-19.
- Storch S, Braulke T. (2001). Multiple C-terminal motifs of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor tail contribute to efficient binding of medium chains of AP-2 and AP-3. *J Biol Chem* 276, 4298-303.
- Strickland DK, Ashcom J, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. (1990). Sequence identity between alpha2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 265, 17401-4.
- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-6.
- Thongboonkerd V, McLeish KR, Arthur JM, Klein JB. (2002). Proteomic analysis of normal human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int* 62, 1461-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.

- Tsai P, Lipoton JM, Sahdev I (1992). Allelic bone marrow transplantation in severe Gaucher disease. *Pediatr Res* 31, 503-7.
- Tyynela J, Palmer DN, Baumann M, Haltia M, (1993). Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *FEBS Lett* 330, 8-12.
- Tyynela J, Sohar I, Sleat DE, Gin RM, Donnelly RJ, Baumann M, Haltia M, Lobel P. (2000). A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration. *EMBO J* 19, 2786-92.
- Tyynelä J, Suopanki J, Santavuori P, Baumann M, Haltia M. (1997). Variant late infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis: Pathomorphology and biochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 369-75.
- Verkruyse LA, Hofmann SL. (1996). Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase. *J Biol Chem* 1996 Jun 28;271(26):15831-6 271, 15831-6.
- Vesa J, Chin MH, Oelgeschläger K, Isosomppi J, DellAngelica EC, Jalanko A, Peltonen L. (2002). Neuronal ceroid lipofuscinosis are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol Biol Cell* 13, 2410-20.
- Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garcia M, Rochefort H. (1986). Autocrine growth stimulation of the MCF 7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52 K protein. *Endocrinology* 118, 1537-45.
- Vines D, Warburton MJ. (1998). Purification and characterisation of a tripeptidyl aminopeptidase I from rat spleen. *Biochim Biophys Acta* 1384, 233-42.
- Vines D, Warburton MJ. (1999). Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I. *FEBS Lett* 443, 131-135.
- Visner GA, Dougall WC, Wilson JM, Burr IA, Nick HS. (1990). Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J Biol Chem* 265, 2856-64.
- Vlaicu R, Niculescu F, Rus HG, Cristea A. (1985). Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque. *Atherosclerosis* 57, 163-77.

- von Figura K, Hasilik A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* 55, 167-93.
- Wada R, Tiffet CF, Proia RL. (2000). Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10954-9.
- Wan L, Molloy SS, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Rybak SL, Thomas G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* 94, 205-16.
- Weitzel JM, Kutz S, Radtke C, Grott S, Seitz HJ, (2001). Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene. *Eur J Biochem* 268, 4095-4103.
- Wheeler RB, Sharp JD, Schultz RA, Joslin JM, Williams RE, Mole SE. (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, 537-42.
- Williams SE, Ashcom JD, Argraves WS, Strickland DK. (1992). A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. *J Biol Chem* 267, 9035-40.
- Willnow TE, Armstrong S, Hammer RE, Herz J. (1995). Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4537-41.
- Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. (1994). Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* 264, 1471-4.
- Winchester BG. (2001). Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 5 (Suppl A), 11-9.
- Wong GH, Goeddel D. (1988). Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242, 941-4.
- Wong YH, Conklin BR, Bourne HR. (1992). Gz-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science* 255, 339-42.

- Yamaguchi T, Nagahama N, Itoh H, Hatsuzawa K, Tani K, Tagaya M. (2000). Regulation of the Golgi structure by the alpha subunits of heterotrimeric G proteins. *FEBS Lett* 470, 25-8.
- Yoshioka T, Homma T, Meyrick B, Takeda M, Moore-Jarrett T, Kon V, Ichikawa I. (1994). Oxidants induce transcriptional activation of manganese superoxide dismutase in glomerular cells. *Kidney Int* 46, 405-13.
- Zeman W, Dyken P. (1969). Neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease): relationship to autotrophic family idiocy. *Pediatrics* 44, 570-583.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ASA	Arylsulfatase A
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	Copy-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
cpm	Impulse pro Minute
CtsD	Cathepsin D
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
M6P	Mannose-6-Phosphat
ML-Fraktion	Mitochondrien- und Lysosomen-Fraktion
MnSOD (SOD2)	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
MPR300	300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
NCL (CLN)	Neuronale Ceroid Lipofuszinose
OCL6	Ovine Form der Neuronalen Ceroid Lipofuszinose
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	para-Formaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sub c	c-Untereinheit der ATP-Synthase
tGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Bei einigen Begriffen, wie z.B. Blot, steady-state, Loop oder Chase, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

9 ANHANG

9.1 Primer

GFP-CLN6for	5'CGGGATCCGCGATGGAGGCGACGCGGAGG'3
GFP-CLN6rev	5'CGGAATTCCGTCAGTGCCGACTGCTGAC'3
β -Actinfor	5'GCGGGAAATCGTGCGTGACATT'3
β -Actinrev	5'GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG'3
MnSODfor	5'AGCCTCCCCGACCTGCCCTACG'3
MnSODrev	5'TGAAACCAAGCCAACCCCAACCTGAG'3
SOD1for	5'TGTGGGGAAGCATTAAAGGACTGACTGA'3
SOD1rev	5'ATCCCAATTACACCACAAGCCAAACGA'3
CtsDfor	5'AGACTAACAGGCCTGTTCCC'3
CtsDrev	5'TCAGCTGTAGTTGCTCACATG'3
Neofor	5'ATGATTGAACAAGATGGATTGCACG'3
Neorev	5'TTCGTCCAGATCATCCTGATCGAC'3
Del154for	5'CGTGAGAACCCCATCAAGAATCTCAAGCCG'3
Del154rev	5'CGGCTTGAGATTCTTGATGGGGTTCTCACG'3
G123Dfor	5'TCTTCATCATGGATGCCAGCATCC'3
G123Drev	5'GGATGCTGGCATCCATGATGAAGA'3

PCR-Bedingungen:

Primer	Denaturierung		Annealing		Extension		Zyklen
	Zeit (s)	°C	Zeit (s)	°C	Zeit (s)	°C	
GFP-CLN6for/ rev	30	95	30	60	60	68	34
β -Actinfor/ rev	10	95	10	65	20	72	50
MnSODfor/ rev	5	95	5	65	20	72	50
SOD1for/ rev	5	95	5	65	20	72	50
CtsDfor/ rev	30	96	30	58	60	72	34
Neofor/ rev	30	96	30	58	60	72	34

Primer	Denaturierung		Annealing		Extension		Zyklen
	Zeit (s)	°C	Zeit (s)	°C	Zeit (s)	°C	
Del154for/ rev	60	94	60	45	780	68	18
G123Dfor/ rev	60	94	60	45	780	68	18

9.2 Bereits vorgestellte Ergebnisse

Abstracts

- **C. Heine**, B. Kübler, P. Saftig, D. Brömme, T. Braulke. Proteolysis of IGFBPs by cathepsin K *in vitro* and in cathepsin K-deficient mice. Biological Chemistry 381; S120; GBM-Tagung 2000, München, Deutschland
- **C. Heine**, M. Ackmann, P. Saftig, D. Palmer, A. Kohlschütter, J. Tyynelä, and T. Braulke. Lysosomal proteomics of different NCL-diseases using 2D-electrophoresis and mass spectrometry. 13. ESGLD-Meeting 2001, Woudschoten, The Netherlands.

Vorträge

- „Frühjuvenile Neuronale Ceroid Lipofuszinose: Analyse veränderter Proteine“ beim Eppendorfer Nachmittag, Dezember 2001, Uniklinik Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- „Early juvenile ceroid lipofuscinosis“ beim NCL-Seminar, Mai 2002, Helsinki, Finnland

Manuskript

- **C. Heine**, J. Tyynelä, J. Cooper, D. Palmer, A. Kohlschütter, M. Elleder, and T. Braulke. Enhanced expression of manganese-dependent superoxid dismutase in human and ovine *CLN6* tissue. Neurobiology of Disease. Oktober 2002 eingereicht.

Lebenslauf

Claudia Heine

Persönliche Informationen

Geburtsdatum: 16.03.1973

Geburtsort: Stadthagen

Familienstand: ledig

Ausbildung

1979 - 1983

Grundschule Niedernwöhren

1983 - 1985

Orientierungsstufe Helpsen

1983 - 1992

Ratsgymnasium Stadthagen; Abschluss: Abitur

Okt. - Sept. 1999

Studium Dipl. Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen

Hauptfach Zoologie

Nebenfächer Biochemie, Organische Chemie

Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung zur Ausbildung und Funktion eines Hdm2/L5-5S rRNA Komplexes“ am Institut für Biochemie, Universität Göttingen, AG Prof. Dr. T. Pieler

seit Dez 1999

Doktorarbeit in der Biochemie der Kinderklinik, Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg, AG Prof. Dr. T. Braulke

Thema: Neuronale Ceroid Lipofuszinosen

Tätigkeiten neben dem Studium

Jan. - Sept. 1997

Studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Molekulare Neuroendokrinologie in Göttingen

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Thomas Braulke für die Vergabe des Themas und die Betreuung der Arbeit danken. Es tut mir leid, wenn die vielen Fragen manchmal etwas zu penetrant gewesen sein sollten...

Ich möchte ebenfalls Prof. Dr. Schäfer danken, der freundlicherweise die Begutachtung übernommen hat.

Wenn da nicht Bernd, Karin, Stephan & Stephan, Sandra, Nicola, Lili, Sanna, Nicole, Sabrina, Elke, Folke (wo bleibt der Cocktail?), Chris, Denise, Bettina, Hans, Andrea, Judith und all die anderen gewesen wären, wäre diese Arbeit wohl nie fertig geworden. Ich danke allen für ihre Hilfe, Unterstützung und den Spaß bei der Arbeit und danach.

Weiterhin danke ich Olaf für die Einführung in die Light-Cycler-Geschichten und Gabriela für die Hilfe beim konfokalen Mikroskop.

Barbara Finck wies mich geduldig in die Bestimmung der Lipidoxidation ein. Vielen Dank!

Und dann war da auch noch Jaana, die mich nicht nur in die hohe Kunst der Immunhistochemie eingewiesen hat, sondern auch –leider erfolglos- die Kunde gebracht hat, daß nur ein entspannter Mitarbeiter ein guter Mitarbeiter sei.

In Jon Cooper´s Labor durfte ich netterweise einige Schafshirnschnitte färben.

Und natürlich wären die Arbeiten an den Cathepsin D-knock out Tieren ohne Paul Saftig, der freundlicherweise die Mäuse zur Verfügung gestellt hat, und Frau Damann und Frau Kessler, die sich um die Haltung und Zucht der Tiere gekümmert haben, nicht möglich gewesen.

Weitere humane und ovine Materialien stammten von David Palmer, Alfried Kohlschütter und Milan Elleder. Vielen Dank.

Den „Immunologen“ sei natürlich ebenfalls für wahre Nachbarschaftshilfe gedankt.

Ich danke Lothar und meiner Familie für ihre Unterstützung und Geduld.

DANKE