

**Mechanismen der rezeptorabhängigen Endozytose von
Liganden: Untersuchungen am *nc1f*-Mausmodell
(*Mus musculus*, Linneaus 1758)
der varianten Form spät infantiler
Neuronaler Ceroid-Lipofuszinose**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

im Department Biologie,

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dipl.-Biologin

Anna-Katharina Kurze

aus Warburg

Hamburg 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herr Professor Dr. T. BRAULKE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 09. Juli 2010

Hamburg, den 24. Juni 2010



Axel Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braulke

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Wienand

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen	1
1.1.1	CLN6, die spät infantile Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen	3
1.1.2	Die <i>ncif</i> -Maus und andere CLN6-Tiermodelle	5
1.1.3	Mechanismen der Neurodegeneration in NCL	6
1.2	Endozytose	10
1.2.1	Komponenten der clathrinabhängige Endozytose	10
1.2.2	Funktion der Phosphatidylinositolphosphate PI(4,5)P2 und PI(3,4,5)P3	12
1.2.2	Rezeptor-abhängige Endozytose	14
1.3	Zielsetzung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	DNA-Standards, Plasmide und Konstrukte	20
2.1.3	Enzyme und Nukleotide	20
2.1.4	Proteine, Protease/Proteasom-Inhibitoren und Proteinstandards	21
2.1.5	Chemikalien	21
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.7	radioaktive Substanzen	23
2.1.8	Kits und Assays	23
2.1.9	Geräte und Apparaturen	24
2.1.10	Software	25
2.1.11	Primärantikörper	26
2.1.12	Sekundärantikörper	27
2.1.13	Medien und Zusätze	27
2.1.13.1	Medien für die Anzucht von Bakterien	27
2.1.13.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur	28
2.1.14	Zell- und Mauslinien	28
2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung	28
2.2.2	DNA-Restriktionsspaltung	29
2.2.3	Klonierung der CLN6-Mutanten	29
2.2.4	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	30
2.2.4.1	Präparation von chemokompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	30
2.2.4.2	Anlegen eines Glycerinstocks	30
2.2.4.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	31

2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.5.1	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	32
2.2.6	DNA-Amplifizierung mittels PCR.....	32
2.2.7	Sequenzierung von DNA	32
2.2.8	RNA-Isolierung.....	33
2.2.9	cDNA-Synthese	34
2.2.10	Quantitative Real-Time PCR.....	34
2.2.10.1	Primer für Real-Time PCR	35
2.3	Zellbiologische Methoden	35
2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	35
2.3.2	Trypsinieren der Zellen	36
2.3.3	Isolierung und Kultivierung primärer Zellen aus Mäusen	36
2.3.3.2	Isolierung und Kultivierung von primären Astrocyten.....	37
2.3.4	Ernten der Zellen und Herstellung von Lysaten	38
2.3.5	Differentialzentrifugation	38
2.3.6	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen.....	39
2.3.7	Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen	39
2.3.8	Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA	40
2.3.9	Transfektion von primären hippocampalen Neuronen	40
2.3.10	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)	41
2.3.10.1	Cholesterinanfärbung mit Filipin.....	41
2.3.10.2	Endozytose von Arylsulfatase B für die Immunfluoreszenz- Analyse	42
2.3.10.3	Endozytose von AlexaFluor-546 Transferrin für die Immunfluoreszenz-Analysen.....	42
2.3.10.4	Internalisierung von CD4-Chimeren.....	43
2.3.11	Endozytose von [¹²⁵ I]-Arylsulfatase B	43
2.3.12	[¹²⁵ I]-Transferrin-Bindungsassay	44
2.3.13	Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen	44
2.3.14	Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]-Methionin.....	45
2.3.14.1	Immunpräzipitation von metabolisch markiertem CLN6 und Fluorographie.....	45
2.3.15	Crosslink von CLN6	47
2.4	Biochemische Methoden	48
2.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	48
2.4.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.4.3	Western-Blot-Analyse	49
2.4.3.1	Detektion Mannose-6-Phosphat markierter Proteine.....	50
2.4.4	Quantifizierung des Phosphatidylinositolphosphates PI(3,4,5)P3.....	50
3.	Ergebnisse	52
3.1	Untersuchung von CLN6-Mutanten	52
3.1.1	Expressionsanalyse und Dimerisierung verschiedener CLN6-Mutanten.....	52
3.1.2	Die CLN6-Mutanten weisen eine verringerte Stabilität auf.....	54

3.1.3	Inhibition des Proteasoms verhindert den Abbau der CLN6-Mutanten p.G123D und p.R106fsX26.....	55
3.1.4	Die CLN6-Mutante p.R106PfsX26 zeigt nur eine partielle Colokalisation mit dem ER.....	57
3.2	Untersuchung der Endozytosemechanismen.....	60
3.2.1	Etablierung des CLN6 Knock-downs in HeLa-Zellen.....	60
3.2.2	Untersuchung der Endozytose von Transferrin in HeLa Zellen mit verminderter CLN6-Expression und in <i>nclf</i> -Neuronen.....	61
3.2.3	Verminderte Epsin-abhängige Endozytose von ubiquitinylierten CD4-Chimären in <i>nclf</i> Neuronen.....	63
3.2.4	Verminderte Endozytose des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase B in CLN6-defizienten HeLa-Zellen.....	66
3.2.5	Endozytose von ASB in Neuronen und Astrozyten.....	69
3.2.6	Expressionsanalyse der Adaptorproteine AP2 und Epsin1.....	76
3.2.7	Bestimmung der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche und intrazelluläre Verteilung verschiedener Proteine der Clathrin-abhängigen Endozytosemaschinerie.....	78
3.2.8	Untersuchung der Membranzusammensetzung.....	81
3.2.9	Intrazelluläre Verteilung von PI(3,4,5)P3 und des endosomalen Proteins RAB4 in <i>nclf</i> Neuronen.....	84
3.2.10	Akkumulation von Cholesterin in <i>nclf</i> -Neuronen und in CLN6-downregulierten HeLa-Zellen.....	86
4.	Diskussion.....	91
4.1	Mutationen in CLN6 führen zu reduzierten Halblebenszeiten durch schnellen Abbau der Proteine.....	91
4.2	Analyse der rezeptorabhängigen Endozytose.....	95
4.2.1	Verminderte Endozytose in <i>nclf</i> -Neuronen und CLN6 siRNA behandelten HeLa-Zellen.....	95
4.2.2	Veränderungen der Membranzusammensetzung als mögliche Ursache für die reduzierte rezeptorabhängige Endozytose in CLN6-defizienten Zellen.....	101
5.	Zusammenfassung.....	109
6.	Literaturverzeichnis.....	111
7	Anhang.....	121
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	122
9.	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	124
	Danksagung.....	126

1. Einleitung

1.1 Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen

Die Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) sind die am weitesten verbreitete Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen im Kindesalter. Die NCLs werden autosomal rezessiv vererbt und treten weltweit mit einer Häufigkeit von 1:100.000 auf. In den USA und in skandinavischen Ländern ist eines von 12.500 Neugeborenen betroffen. Der erste klinische Fall der NCL wurde von Stengel bereits 1826 beschrieben (Stengel 1826). Um diese Erkrankung von Gangliosidosen abzugrenzen und aufgrund des im Hirn vorwiegend in Neuronen vorkommenden Speichermaterials, wurde 1969 der Begriff Neuronale Ceroid-Lipofuszinose eingeführt.

Bisher wurden ungefähr 260 krankheitsverursachende Mutationen in 8 humanen Genen identifiziert (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN7*, *CLN8* und *CLN10*) (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml>). Außerdem verursachen Mutationen in *CLCN7* Osteopetrosis und einen NCL-ähnlichen Phänotyp. Obwohl die NCLs genetisch eine heterogene Gruppe darstellen, haben sie histopathologische und klinische Gemeinsamkeiten. Ein Kennzeichen aller NCLs ist die Akkumulation von autofluoreszierenden Lipopigmenten und aggregierten Proteinen in den Lysosomen. Während in klassischen lysosomalen Speichererkrankungen Defekte eines Enzyms oder Transporters zur Ansammlung von spezifischen Substraten oder Metaboliten führen, ist die Hauptkomponente des Speichermaterials der NCL kein krankheitsspezifisches Substrat, sondern die Untereinheit C der mitochondrialen ATP-Synthase. Dabei handelt es sich um ein kleines, konserviertes, hydrophobes Protein von 7,5 kDa, das auf Grund seines Lösungsverhaltens auch als Proteolipid bezeichnet wird (Hall et al 1991). Bei *CLN1* und *CLN10* kommt es zur Akkumulation der Sphingolipid-Aktivator Proteine (SAP) A und D. Dabei handelt es sich um kleine hydrophobe Glykoproteine, die für den lysosomalen Abbau von Sphingolipiden benötigt werden (Tyynelä et al 1993). Obwohl das Speichermaterial ubiquitär vorkommt, wird der Verlust von Neuronen vorwiegend im zentralen Nervensystem und in der Retina beobachtet (Goebel & Wisniewski 2004). Diese fortschreitende Neurodegeneration äußert sich klinisch in einer Retinopathie gefolgt von Erblindung, Schlafproblemen, motorischen Störungen,

Epilepsie, Demenz und führt schließlich zum vorzeitigen Tod der Patienten (Haltia 2006; Williams et al 2006).

Ursprünglich wurden die NCL-Formen aufgrund des Erkrankungsbeginns in infantile, spät infantile, juvenile, adulte und variante Formen unterteilt (Dyken 1989). Seit 2000 wurden die NCLs nach dem betroffenen Genlocus eingeteilt und entsprechend bezeichnet (Gardiner 2000). Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der unterschiedlichen NCL-Formen. Detaillierte Daten über Genetik, Funktion der Genprodukte und Tiermodelle sind in aktuellen Übersichtsartikeln beschreiben (Cooper et al 2006; Haltia 2006; Jalanko & Braulke 2009; Kyttälä et al 2006).

Tabelle 1.1: Einteilung der NCLs

Gen	NCL-Form	Protein/Lokalisation	Krankheitsbeginn (Jahre)	Speicher-material
CLN1	Infantil	PPT1, Palmitoyl-Protein-Thioesterase (löslich)/Lysosom	0,5-1	SAP A und D
CLN2	Spät-infantil	TPP1, Tripeptidylpeptidase I (löslich)/Lysosom	2-4	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN3	Juvenil	CLN3, (Transmembranprotein)/Lysosom	5-10	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN4	Adult	?	11-55	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN5	Spät-infantil	CLN5 (löslich)/Lysosom	4-7	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN6	Spät-infantil	CLN6 (Transmembranprotein)/ Endoplasmatisches Retikulum	1,5-8	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN7	Spät-infantil	MFS8 (Transmembranprotein)/Lysosom	2-7	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN8	Spät-infantil	CLN8 (Transmembranprotein)/ Endoplasmatisches Retikulum	5-10	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN9	Juvenil	?	4-5	Untereinheit C der ATP-Synthase
CLN10	Congenital, spät-infantil	CTSD, Cathepsin D, (löslich)/Lysosom	0	SAP A und D
CLCN7	Infantile Osteopetrose und ZNS-Degeneration	CLC7, (Transmembranprotein, Chloridkanal)/Lysosom	0-1	Untereinheit C der ATP-Synthase

1.1.1 CLN6, die spät infantile Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen

Mutationen im CLN6-Gen verursachen die spät infantile variante Form der NCLs, die vorwiegend in Osteuropa, Pakistan und Portugal vorkommt. Vereinzelt treten auch Fälle in Frankreich, Italien, Brasilien und in der Türkei auf. Die Krankheit kann bereits mit 18 Monaten oder erst im 8. Lebensjahr beginnen und zeichnet sich durch einen progressiven Sehverlust, der bis zur Erblindung führt, Krämpfe und den Verlust sämtlicher motorischer Fähigkeiten aus. Die meisten Patienten sterben zwischen dem 5. und 12. Lebensjahr. Das Hirn der Patienten weist eine zur Symptombdauer proportionale Atrophie auf, die mit Neuronenverlust des Cortex verbunden ist. Ultrastrukturanalysen des Speichermaterials zeigen abhängig vom Gewebetyp oder Organ, rectilineare, curvilineare und „fingerprint“-Speichermuster der Untereinheit C der ATP-Synthase (Goebel & Wisniewski 2004).

Das humane *CLN6*-Gen ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert und umfasst ~22,7 kb mit 7 Exons. Bisher sind 41 krankheitsverursachende Mutationen identifiziert worden, die nicht auf einen gemeinsamen Ursprung hindeuten (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml>). Das Transkript von 2,4 kb kodiert ein 28 kDa nicht-glykosyliertes Membranprotein mit sieben putativen Transmembrandomänen, dass in allen Geweben exprimiert wird und dessen Funktion unbekannt ist (Heine et al 2007; Wheeler et al 2002). Die Aminosäuresequenz des Transmembranproteins ist unter Vertebraten stark konserviert und weist keine funktionellen Domänen oder Homologien zu anderen Proteinen auf (Drögemüller et al 2005; Gao et al 2002). CLN6 ist im ER lokalisiert, wobei sich der N-Terminus im Cytosol und der C-Terminus im ER-Lumen befinden (Abb. 1.1) (Heine et al 2004; Mole et al 2004). Mutationsanalysen konnten zeigen, dass sowohl die N-terminale cytosolische Domäne als auch das distale Paar der Transmembrandomänen Signale enthalten, die für die Retention im ER verantwortlich sind (Heine et al 2007). Durch Crosslink-Experiment konnte nachgewiesen werden, dass CLN6 Homodimere bilden kann (Heine et al 2004).

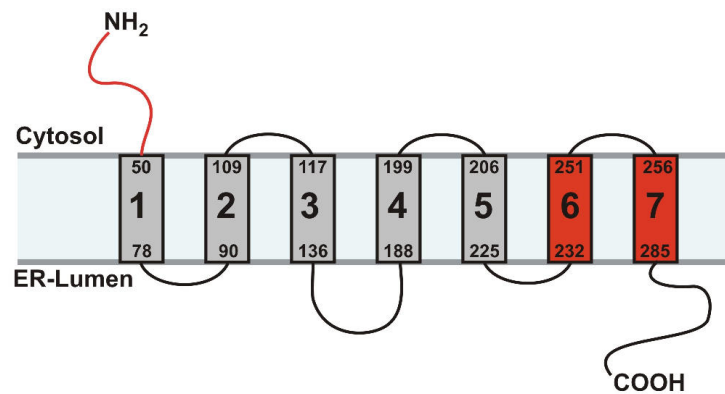


Abb. 1.1: Topologie des CLN6-Proteins. Das Schema zeigt CLN6 mit sieben Transmembrandomänen (1-7). Jeweils die erste und die letzte Aminosäure einer Transmembrandomäne sind nummeriert. Der N-Terminus von CLN6 ist cytosolisch lokalisiert und der C-Terminus im ER-Lumen. ER-Retentionssignale (rot) befinden sich im N-Terminus und in den Transmembrandomänen 6 und 7.

Bisher ist unklar, wie mutierte CLN6-Proteine zu einer lysosomalen Dysfunktion führen. Störungen im Biosyntheseweg lysosomaler Enzyme wurden als unwahrscheinlich angesehen, da weder der Transport noch die Prozessierung der lysosomalen Hydrolase Cathepsin D in CLN6-defizienten Fibroblasten verändert ist (Heine et al 2004). Dagegen ist der Abbau endozytierter Proteine in CLN6-defizienten Zellen vermindert, was auf eine reduzierte lysosomale Aktivität zurückzuführen ist (Heine et al 2004). Denkbar ist auch, dass CLN6 an der Assemblierung der NCL-Proteine CLN1, CLN2, CLN3 und CLN5 beteiligt ist, deren Transport und Aktivität durch defektes CLN6 sekundär beeinträchtigt wird (Lyly et al 2009).

Kürzlich wurde CRMP2 als möglicher Interaktionspartner von CLN6 postuliert (Benedict et al 2009). CRMP-2 ist an der Kontrolle des Axon-Wachstums und der Anzahl der Axone beteiligt. In CLN6-defekten neuronalen Kulturen konnte eine verminderte Differenzierung der Zellen beobachtet werden, die mit der neuronalen Dysfunktion in der CLN6-Erkrankung in Verbindung gebracht wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription), der Teil des JAK-STAT-Signalweges ist, am *CLN6*-Promotor binden kann und auf die *CLN6*-Expression inhibitorisch wirkt (Snyder et al 2008).

1.1.2 Die *nclf*-Maus und andere CLN6-Tiermodelle

Es existieren verschiedenen Tiermodelle mit natürlich Mutationen im homologen *CLN6*-Gen, wie die *nclf*-Maus, das Neuseeland South Hampshire Schaf und das Merino Schaf (OCLN6). Der Krankheitsverlauf in diesen Tieren ähnelt dem der humanen CLN6-Krankheit (Bronson et al 1998; Gao et al 2002; Jolly et al 1989; Tammen et al 2006; Wheeler et al 2002).

Das CLN6-Homolog der Maus liegt auf Chromosom 9 und kodiert für ein Polypeptid von 308 Aminosäuren. In der *nclf*-Maus führt eine *Frameshift*-Mutation (c.307insC) zur Synthese eines stark verkürzten CLN6-Proteins, bei dem es nach Prolin 102 zur Synthese von 61 neuen Aminosäuren kommt, bevor die Translation vorzeitig abbricht (Bronson et al 1998; Gao et al 2002). Speichermaterial ist bereits 11 Tage nach der Geburt im Hirn nachweisbar. Ab dem 4. Monat ist eine progressive retinale Atrophie zu beobachten. Motorische Funktionsstörungen mit spastischer Parese der hinteren Extremitäten treten ab dem 8. Monat auf und weiten sich zur vollständigen Lähmung aus. Diese Paralyse und Krämpfe, die zum Ende der Krankheit auftreten, führen zum vorzeitigen Tod der Tiere mit ca. 12 Monaten in Bezug zur normalen Lebenserwartung von 24 Monaten (Bronson et al 1998). Im cerebralen Cortex, Hippocampus, Thalamus und Hirnstamm von *nclf*-Mäusen wurden ab dem 6. Monat eine zunehmende Zahl aktivierter Astrozyten, was auf eine reaktive Gliose hindeutet. Lipidanalysen von *nclf*-Hirngewebe zeigten eine Anstiege im Gehalt der Ganglioside GM2 und GM3 ab einem Alter von ca. 20 Wochen (Jabs et al 2008). Des Weiteren wurden im Hirn Ablagerungen Lipid-gebundener Oligosaccharide, Intermediaten des Ceramidstoffwechsels, nachgewiesen, was auf Defekte im Abbau dieser Substanzen hindeutet (Cho et al 2005). Microarray-Analysen mit Cortex-Gewebe präsymptomatischer *nclf*-Mäuse zeigten eine reduzierte mRNA-Expressionen der GABA_{A2}- und GABA_B-Rezeptor-Untereinheit (Dr. A. Quitsch, UKE, nicht veröffentlichte Daten).

Das aus Neuseeland stammende South Hampshire Schaf und das australische Merino-Schaf sind weitere CLN6-Tiermodelle (Cook et al 2002; Jolly et al 1989). Während die krankheitsverursachende Mutation im South Hampshire Schaf noch nicht identifiziert werden konnte, führt eine *Missense*-Mutation im CLN6-Gen des Merino-Schafs (c.184C>T) zum Austausch von Arginin 62 durch Cystein (p.Arg62Cys) (Tammen et al 2006).

Beim South Hampshire Schaf wurde die Untereinheit C der ATP-Synthase erstmals im lysosomalen Speichermaterial identifiziert (Jolly et al 1989). Bereits 12 Tage nach der Geburt können in Cortex präsymptomatischer OCL6-Schafe aktivierte Astrozyten und Microglia nachgewiesen werden (Oswald et al 2005). Ab dem 2. Monat ist eine Atrophie des Cortex und eine zunehmende Neurodegeneration mit fortschreitender Astrozytose zu beobachten (Cook et al 2002; Jolly et al 1989; Jolly & Walkley 1999; Oswald et al 2005). Mit 4-12 Monaten treten Verhaltensstörungen auf, gefolgt von motorischen Defekten. Die Degeneration der Retina beginnt zwischen dem 10. bis 14. Monat (Jolly et al 1989). Die Tiere sterben schließlich vorzeitig im Alter von 27 Monaten, während die durchschnittliche Lebenserwartung gesunder Schafe bei ca. 10-12 Jahren liegt (Cook et al 2002; Mayhew et al 1985).

Biochemische Analysen CLN6-defekter humaner Fibroblasten und Hirnmaterials von OCL6-Schafen zeigten eine erhöhte Expression und Aktivität der Mn^{2+} -abhängigen Superoxid-Dismutase (MnSOD), die auf oxidativen Stress in diesen Zellen hindeutet und im Hirn mit der Aktivierung von Microglia in Verbindung gebracht wird (Heine et al 2003). Zusätzlich konnten metabolische Untersuchungen erhöhte Mengen an Glutamin und Succinat im Hirn dieser Schafe nachweisen. Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen von Aspartat, Acetat, Glutamat, N-Acetylaspartat und GABA erniedrigt (Pears et al 2007). Die Reduktion von GABA geht mit dem Verlust GABAerger Interneurone im OCL6-Hirn einher (Oswald et al 2008).

1.1.3 Mechanismen der Neurodegeneration in NCL

Vorraussetzung für die zukünftige Behandlung von NCL-Krankheiten, ist das Verständnis der Neurobiologie und der Mechanismen der NCLs. Tiermodelle dieser Erkrankungen erlauben die systematische Untersuchung aller Gewebe und die genaue Sequenz von pathologischen Ereignissen im Verlauf der Krankheit. Dabei kam in den letzten Jahren vor allem dem ER-Stress, der Autophagie und der toxischen Wirkung gespeicherter Substrate eine ansteigende Bedeutung in der Pathogenese der NCL zu, die im Folgenden kurz vorgestellt werden:

ER-Stress oder UPR (unfolded protein response)

In gesunden Zellen werden neusynthetisierte Proteine gefaltet bis sie ihre spezifische, native, funktionelle Konformation erhalten haben. Um das zu erreichen, besitzt die Zelle Mechanismen, die die Proteinfaltung kontrollieren und beschleunigen. UPR ist die Stressantwort der Zelle und wird ausgelöst, wenn fehlgefaltete Proteine im ER-Lumen akkumulieren. Zum einen wird durch das Auslösen der UPR die Proteinsynthese reduziert, zum anderen werden Signalwege aktiviert, die eine gesteigerte Produktion von Chaperonen einleiten.

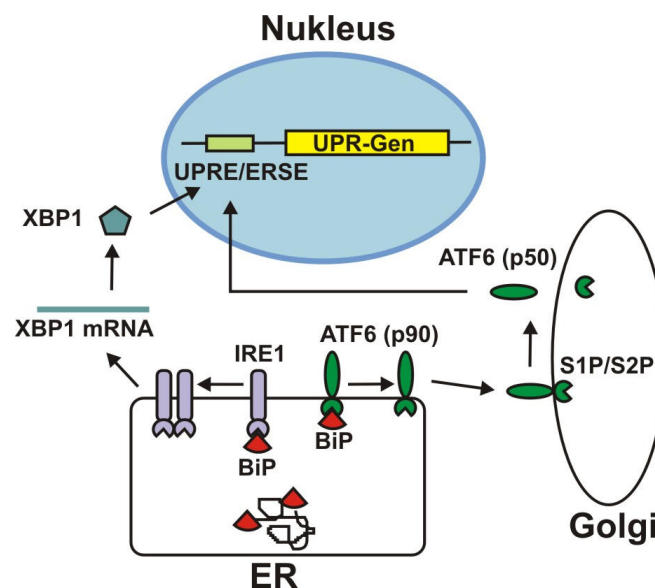


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Unfolded Protein Response (UPR). Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen verursacht die BiP-Dissoziation von den ER-Transmembranproteinen IRE1 und ATF6. Dies führt entweder über Dimerisierung von IRE1 zur Synthese von XBP1 oder über die proteolytische Spaltung von ATF6 (p90) im Golgi zur Entstehung des löslichen ATF6 (p50). XBP1 und ATF6 (p50) wirken als Transkriptionsfaktoren und modulieren die Expression von UPR-Genen (nach Zhang & Kaufman 2006).

UPR wird durch die Dissoziation des molekularen Chaperons BiP/Grp78 von Transmembranproteinkomplexen initiiert (Zhang & Kaufman 2006).

Dadurch wird die Synthese von zwei Transkriptionsfaktoren bewirkt und die Transkription vieler UPR-Zielgene induziert. Wenn die ausgelösten Mechanismen wirkungslos bleiben, kann über UPR die Apoptose initiiert werden. Dabei wird Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt und die Caspase-3 aktiviert (Morishima et al 2002). Im Hirn CLN1-defizienter Mäuse wurden Ansammlungen des palmitoylierten Protein GAP43 und anderen S-Acetylierter Proteine im ER nachgewiesen, die zur UPR Aktivierung führten (Zhang et al 2006). Im Mausmodell der neurodegenerativen, lysosomalen GM1-

Gangliosidose (β -Galaktosidase-Mangel) löst die Akkumulation von GM1-Gangliosiden UPR aus und führt zur Apoptose (Tessitore et al 2004).

In anderen lysosomalen Erkrankungen, wie der Niemann-Pick Typ C oder Mucopolysaccharidose Typ I, kommt es neben der Speicherung von Cholesterin- und Dermatansulfaten, sekundär zur Ansammlungen von GM1-Gangliosiden, so dass auch hier eine Aktivierung der UPR möglich ist (Ikonen & Holtta-Vuori 2004; Russell et al 1998). Vorläufige Untersuchungen zur Expression von UPR-Markerproteinen (BiP, eIF alpha, HSP70) in kultivierten Neuronen und im Hirngewebe von *nclf*-Mäusen weisen keine Unterschiede zu Kontrollmäusen auf (Dr. G. Galliciotti, UKE, unveröffentlichte Daten).

Autophagie

Lysosomen spielen eine entscheidene Rolle in einem Abbauweg, der als Autophagie bezeichnet wird, und am zellulären *Turnover* von Proteinen und Organellen beteiligt ist. Dabei ist die Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen der entscheidene Schritt. Die physiologische Relevanz der Autophagie wurde zuerst bei transgenen Mäusen nachgewiesen, bei denen essentielle Autophagie-Gene defekt waren, was in der Akkumulation von polyubiquitylierten Proteinaggregaten und Neurodegeneration resultierte (Hara et al 2006). Diese Arbeiten beweisen, dass eine basale Autophagie für das Überleben neuronaler Zellen benötigt wird.

Verschiedene Umstände, wie Nährstoffmangel, Wachstumsfaktoren oder oxidativer Stress, veranlassen die Zelle vermehrt Autophagosomen zu bilden. Die Kinase mTOR ist ein kritischer Regulator der Autophagie-Induktion. *Atg* (*autophagy-related genes*) kodieren Komponenten der Autophagie-Maschinerie, die u.a. für die Induktion der Autophagie (Beclin-1 (Atg6)), die autophagosomale Vesikelformierung (Atg12, Atg5 und LC3 (Atg8)) und die proteolytische Konvertierung von LC3-I zu LC3-II (Atg7, Atg4, Atg3) verantwortlich sind (Abb. 1.3, (Levine & Kroemer 2009; Mizushima & Klionsky 2007).

In primären granulären Neuronen von CLN3-defizienten Mäusen wurde eine fehlerhafte, unterbrochene Autophagie beobachtet (Cao et al 2006). Untersuchungen CLN6-defizienter *nclf*-Mäuse zeigten weder in verschiedenen Altersstadien, noch in kultivierten Neuronen Anzeichen einer veränderten Autophagie (Dr. Galliciotti, UKE, unveröffentlichte Daten).

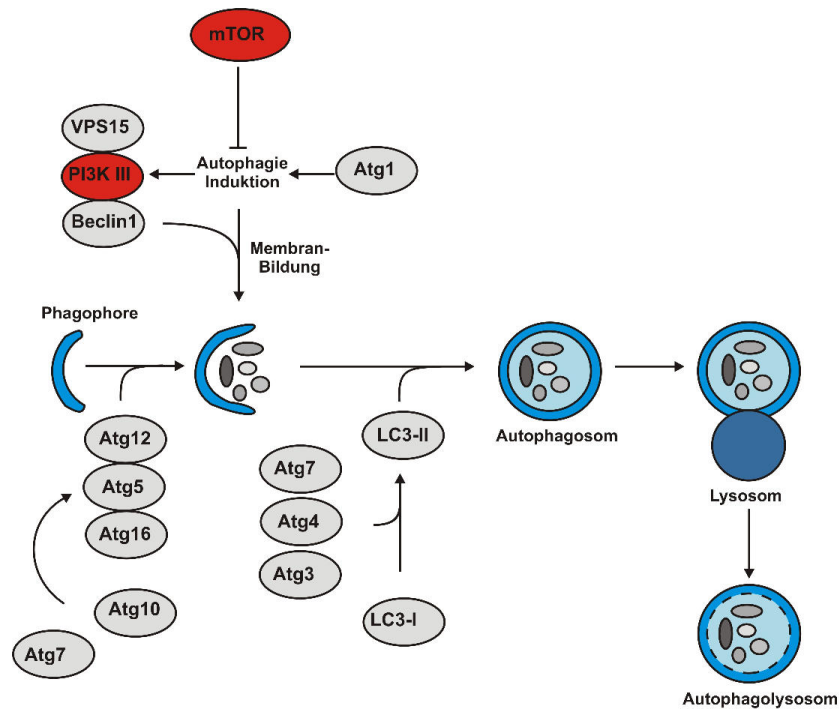


Abb. 1.3 Schematische Darstellung von Komponenten und Interaktionen, die zur Ausbildung von Autophagosomen führen (nach Levine & Kroemer 2009).

Bisher konnte eine gesteigerte Autophagie nur im Tiermodell für die schnell verlaufende CLN10 (Cathepsin D)-Erkrankung nachgewiesen werden (Shacka et al 2007). Es ist deshalb anzunehmen, dass Veränderungen im Prozess der Autophagie keinen allgemeinen Mechanismus der Neurodegeneration in NCLs darstellen.

Toxizität des Speichermaterials

Die Akkumulation der Untereinheit C der ATP-Synthase ist ein allgemeines Merkmal der NCL. Nur bei CLN1 besteht das Speichermaterial größtenteils aus den Sphingolipid-Aktivatorproteinen A und D. Es wurde vermutet, dass die Speicherung die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt und so exzitotoxisch wirkt (Walkley et al 1995). Dagegen spricht jedoch, dass keine Korrelation zwischen der Menge des Speichermaterials und der Degeneration der Neuronen besteht. So zeigen einige Zellen massive lysosomale Speicherung und nur minimale degenerative Anzeichen (Cooper 2003). Zudem ist das Speichermaterial auch in anderen Geweben nachweisbar, deren Funktion nicht beeinträchtigt ist.

1.2 Endozytose

Unter Endozytose versteht man die Aufnahme von extrazellulären Substanzen wie Makromolekülen, größeren Nahrungsteilchen oder anderen Organismen in die Zelle. Dabei stülpt sich die Plasmamembran ein und Vesikel werden in das Zellinnere abgeschnürt. Endozytotische Prozesse sind damit essentiell, um Membrankomponenten, Rezeptor-assoziierte Liganden und lösliche Moleküle zu verschiedenen Organellen (Lysosomen, Endosomen, Golgi-Apparat) zu bringen. Darüber hinaus können polarisierte Epithelzellen Moleküle durch Transzytose von einer Membran (z.B. der basolateralen Membran) über Endosomen zu anderen Membranen (z.B. der apikalen Membran) transportiert werden. Es gibt verschiedene Endozytosemechanismen, die als Phagozytose, Pinozytose, Clathrin-unabhängige und Clathrin-abhängige Endozytose bezeichnet werden. Letztere stellt den am besten charakterisierten Prozess dar. Eine besondere Bedeutung hat die Clathrin-abhängige Endozytose in Neuronen, da die Wiederaufnahme von Neurotransmittern und anderer Komponenten synaptischer Vesikel hauptsächlich über diesen Weg verläuft (Dittman & Ryan 2009).

1.2.1 Komponenten der clathrinabhängige Endozytose

Die Clathrin-abhängige Endozytose findet an spezialisierten Stellen der Plasmamembran statt, wo sich sogenannte *Clathrin Coated Pits* (CCPs) bilden, die aus unterschiedlichen Proteinen zusammengesetzt sind. Einige CCP-Komponenten wurden in dieser Arbeit untersucht, und werden deshalb genauer vorgestellt.

Clathrin

Der wichtigste Bestandteil der CCPs ist Clathrin. Dabei handelt es sich um eine Struktur aus drei leichten (*Light Chain*, je 35 kDa) und drei schweren (*Heavy Chain*, je 180 kDa) Proteinketten, die das Clathrin-Triskelion bilden (Abb. 1.4). Die leichte Kette hat vermutlich eine regulatorische Funktion bei der Zusammenlagerung des Triskelions (Brodsky et al 2001; Ybe et al 1998). Die schwere Kette lässt sich in drei Bereiche einteilen: proximale, distale und N-terminale Domäne (Abb. 1.4). Die proximale Domäne besitzt Bindungsstellen

für die leichten Ketten, während die N-terminale Domäne mit anderen Proteinen der Endozytosemaschinerie, wie der β -Untereinheit von AP2 oder Epsin1 interagieren kann (Kirchhausen 2000; ter Haar et al 2000). Die C-terminalen Domänen in der Mitte des Triskelions vermitteln die Trimersierung der schweren Ketten (Greene et al 2000; Schmid 1997). Mehrere der Triskelia setzen sich zu Fünf- und Sechsecken zusammen und bilden ein Gitternetz auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran, das schließlich das gesamte Vesikel bedeckt (*Clathrin Coated Vesicle*, CCV).

AP2-Adaptor

Das häufigste Protein in CCPs ist AP2. AP2 ist ein großer cytoplasmatischer Proteinkomplex, der aus 4 Untereinheiten besteht (α , β 2, μ 2, δ 2), die Adaptine genannt werden. Jede der großen α - und β 2-Untereinheiten (je 100 kDa) besteht aus einer N-terminalen Domäne (*Head*), und einer globulären C-terminalen Domäne (*Ear*), die über ein flexibles *Hindge* verbunden sind (Heuser & Keen 1988; Pearse et al 2000). Die α -Untereinheit ist am Transport von AP2 zur Plasmamembran und an der Interaktion mit anderen endozytotische Adaptorproteinen, wie z.B Eps15 oder Epsin1, beteiligt (Mousavi et al 2004). Für die Interaktion von AP2 und Clathrin sind zwei Bindungsstellen der β 2-Untereinheit wichtig: ein *Clathrin-Box*-Motiv (Leu-Leu-Asn-Leu-Asp) in der *Hindge*-Region und eine Bindungsstelle in der *Ear*-Domäne (Owen et al 2000). Die μ 2-Untereinheit (50 kDa) kann an Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat-(PI(4,5)P2) und an Tyrosin-basierende Motive der Cargo-Rezeptoren binden und ist für die Erkennung von Transmembranproteinen wichtig (Rohde et al 2002). Außerdem könnte die μ 2-Untereinheit für die Zusammenlagerung des AP2-Komplexes bedeutend sein (Aguilar et al 1997; Page & Robinson 1995). Die Funktion der σ 2-Untereinheit, die an α -Untereinheiten binden kann, ist bislang ungeklärt.

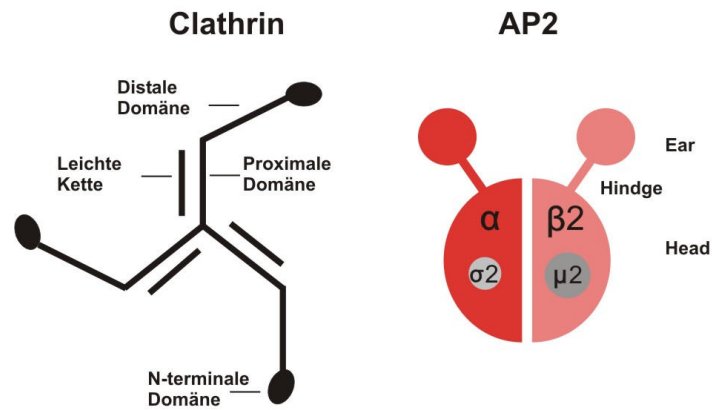


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Clathrin-Triskelions und des Adaptorproteins AP2. Das Triskelion setzt sich aus 3 schweren und 3 leichten Ketten zusammen. AP2 ist ein Heterotetramer, das von den Untereinheiten α , $\beta 2$, $\sigma 2$ und $\mu 2$ gebildet wird (aus (Mousavi et al 2004)).

Epsin1

Epsin1 ist ein weiteres Adaptorprotein, das eine besondere Funktion in der Endozytose ubiquitinylierter Transmembranproteine hat. Epsin1 hat in der N-terminalen Region eine ENTH-Domäne (*Epsin N-terminal Homology*), an die PI(4,5)P₂ binden kann. Darauf folgen zwei *Ubiquitin Interacting Motifs* (UIM) (Hofmann & Falquet 2001; Itoh et al 2001). Außerdem befindet sich in der zentralen Region eine Domäne über die Epsin1 an die α -Untereinheit von AP2 bindet. Für die Interaktion mit Clathrin und Eps15 verfügt das Protein über zwei *Clathrin-Box*-Motive und drei NPF-Motive (Asn-Pro-Phe).

1.2.2 Funktion der Phosphatidylinositolphosphate PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃

Das Phosphatidylinositolphosphat PI(4,5)P₂ hat eine wichtige Funktion in der Rekrutierung und Regulation von Proteinen der Endozytosemaschinerie (Legendre-Guillemin et al 2004). So können Adaptorproteine (z. B. AP2, Epsin1, AP180/CALM) und andere mit der Endozytose assoziierte Proteine (z. B. Dynamin) an PI(4,5)P₂ binden (Owen 2004; Wenk & De Camilli 2003). Veränderungen der intrazellulären PI(4,5)P₂ Konzentration beeinflussen die Rezeptor-vermittelte Endozytose verschiedener Liganden (Huang 2007; Skwarek & Boulianne 2009). So führt die Reduktion der PI(4,5)P₂-Konzentration zu einer verminderten Transferrin-Endozytose (Abe et al 2008).

Umgekehrt bewirkt ein erhöhter PI(3,4,5)P₃-Gehalt in der Zelle eine gesteigerte Transferrin-Internalisierung (Padron et al 2003).

Die Spaltung von PI(4,5)P₂ durch die Phospholipase C produziert zwei *Second Messenger* (Clapham 2007). Membrangebundenes Diacylglycerin (DAG) ist zusammen mit Ca²⁺ ein Aktivator der Ca²⁺-abhängigen Proteinkinase C (PKC), wodurch u.a. die Zellproliferation beeinflusst wird (Rosse et al 2010). Lösliches Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (Ins(1,4,5)P₃) verursacht durch Aktivierung von IP₃-Rezeptoren die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER.

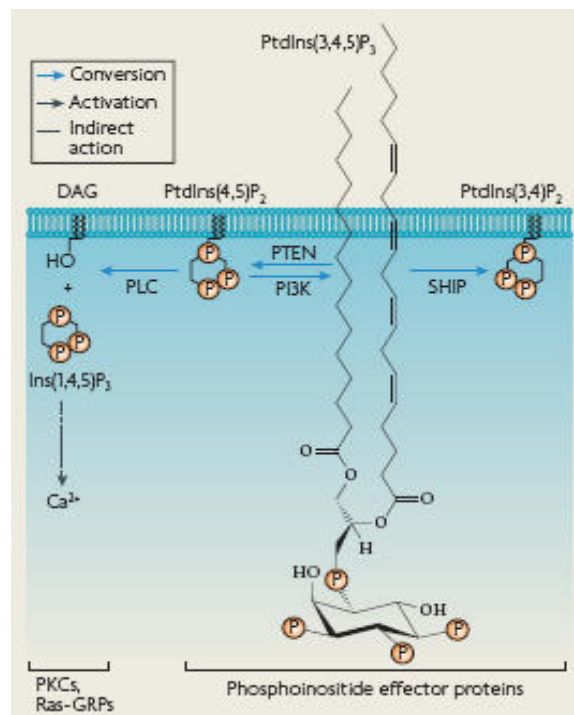


Abb. 1.5: Synthese und intrazelluläre Signalwirkung von Phosphatidylinositolphosphaten. Die *Second Messenger* DAG und Ins(1,4,5)P₃ entstehen durch die Phospholipase C (PLC) vermittelte Spaltung von PI(4,5)P₂ und bewirken den Ausstrom von Ca²⁺ aus dem ER, sowie die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). PI(3,4,5)P₃ wird von Klasse Phosphoinositol 3-Kinasen (PI3Ks) aus PI(4,5)P₂ synthetisiert. An der Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P₃ sind die Phosphatasen PTEN, SHIP1 und SHIP2 beteiligt (aus (Wymann & Schreiber 2008)).

Alternativ kann PI(4,5)P₂ durch die Klasse 1 Phosphoinositol 3-Kinasen (PI3Ks) zu PI(3,4,5)P₃ phosphoryliert werden (Wymann & Schreiber 2008). PI(3,4,5)P₃ beeinflusst die Zellproliferation, die Differenzierung, das Zellüberleben und Metabolismus über die Aktivierung des sogenannten AKT-Signalweges (Manning & Cantley 2007). PI(3,4,5)P₃ kann durch Mitglieder von zwei Phosphatase-Familien dephosphoryliert werden: die Phosphatase PTEN katalysiert die Dephosphorylierung an der dritten Position des Inositolringes und generiert PI(4,5)P₂. Die Phosphatasen SHIP1 und SHIP2 entfernen das

Phosphat an der fünften Position, so dass PI(3,4)P₂ entsteht, von dem ebenfalls vermutet wird, dass es eine Funktion als *Second Messenger* hat (Wymann & Schreiner 2008).

Es wird nicht ausgeschlossen, dass PI(3,4,5)P₃ an der Regulierung und Rekrutierung von Adaptorproteinen und anderen an der Endozytose beteiligter Proteinen beteiligt ist. Viele dieser Komponenten können sowohl an PI(4,5)P₂ als auch an PI(3,4,5)P₃ binden (Catimel et al 2009; Heo et al 2006). Zudem ist die Aktivität bestimmter Endozytose-regulierender Proteine (Arf-GAPs) von PI(3,4,5)P₃ abhängig ist (Campa et al 2009; Miura et al 2002).

1.2.2 Rezeptor-abhängige Endozytose

Bei der Rezeptor-abhängigen Endozytose wird die Aufnahme eines Liganden über einen Rezeptor an der Plasmamembran vermittelt und kann entweder konstitutiv erfolgen oder sie wird durch ein Signal (Wachstumsfaktoren, Cytokine) induziert.

Die cytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren enthalten Motive, die von Proteinen der Endozytosemaschinerie erkannt werden. Die häufigsten Motive sind das Tyrosin-basierende- und das Leucin-basierende Motiv. Bisher sind zwei Tyrosin-basierende Motive bekannt: Asn-Pro-X-Tyr, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht, und das in Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie identifiziert wurde (Davis et al 1986), und Tyr-X-X-X \emptyset , wobei \emptyset eine hydrophobe Aminosäure wie Leucin, Isoleucin oder Methionin bezeichnet. Über solch ein Motiv verfügt z.B. der Transferrin-Rezeptor (Tyr-Tyr-Arg-Phe) (Collawn et al 1990). Adaptorproteine können an diese Motive binden und rekrutieren so die Rezeptoren in die CCPs (Laporte et al 1999; Nesterov et al 1999; Ohno et al 1995). Auf diese Weise wird die Effizienz der Endozytose erhöht.

Der Mechanismus der Vesikelabschnürung lässt sich in vier Schritte einteilen: Das CCP-Assembly, die weitere Einstülpung der Membran (*Budding*), das Abschnüren des Vesikel und die anschließende Entfernung der Clathrin-Hülle (*Uncoating*). Die Einleitung der Clathrin-vermittelten Endozytose erfolgt möglicherweise über die Aktivierung des GTP-bindenden Proteins ARF6, das die Bindung von AP2 an der Plasmamembran reguliert. Die ARF6-Aktivität wird

wiederum von dem GTPase-aktivierende-Protein SMAP1 kontrolliert, das direkt an Clathrin bindet (Tanabe et al 2005). Die Bindung von AP2 an PI(4,5)P2 und die Phosphorylierung der μ 2-Untereinheit führen im Weiteren zu Konformationsänderungen im AP2-Komplex, wodurch die Bindung an die Endozytosemotive der Rezeptoren ermöglicht wird (Owen 2004). Im Verlauf des *Budding* bildet Clathrin ein stabilisierendes Gerüst. AP2 und andere Adapterproteine wie Eps15 und Epsin verbinden die Clathrinhülle mit Transmembranrezeptoren. Unter Einbeziehung der GTPase Dynamin werden schließlich die Vesikel abgeschnürt (Hinshaw & Schmid 1995; Takei et al 1995). Durch die Clathrinhülle können Vesikel nicht mit anderen Membranen verschmelzen. Deshalb werden in zwei unabhängigen Prozessen Clathrin und die Adaptorproteine entfernt (Hannan et al 1998). Das Entfernen der Hülle ist ein ATP-abhängiger Prozess, der von dem *Heat-Shock-cognate*-Protein Hsc70, und seinem Co-Chaperon Auxilin katalysiert wird (Rapoport et al 2008; Rothman & Schmid 1986). Die anschließende Fusion der Vesikel mit frühen endosomalen Kompartimenten wird durch EEA1, SNAREs und dem kleinen G-Protein RAB5 katalysiert (Clague 1999; Woodman 2000). Die Koordination von Andocken und Fusion geschieht auf zwei Ebenen. Zum einen über direkte Interaktion von dem RAB5-Effektor Rabenosyn 5 und dem SNARE-Regulator VPS45 (Morrison et al 2008; Nielsen et al 2000) und zum anderen über die Interaktion von EEA1 und Rabenosyn 5 mit den endosomalen SNAREs Syntaxin 6, -13 und -7 (McBride et al 1999; Simonsen et al 1999).

In den frühen Endosomen bzw. *Recycling*-Endosomen werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe für bestimmte Transportrouten sortiert. Einige Rezeptoren werden zusammen mit den Liganden wieder zur Plasmamembran transportiert (z.B. Transferrin-Rezeptor) (Dautry-Varsat et al 1983). Andere Liganden dissoziieren von ihrem Rezeptor und werden zu den Lysosomen transportiert, während der Rezeptor (z.B. LDL-Rezeptor) zur Zelloberfläche zurückkehren kann (Brown et al 1983). Wieder andere Rezeptorklassen z.B. der EGF-Rezeptor werden zusammen mit den Liganden im Lysosom abgebaut (Herbst et al 1994).

Internalisierung und endosomale Sortierung lysosomaler Enzyme und ubiquitinylierter Rezeptoren

Ein Teil neusynthetisierter lysosomaler Enzyme wird von der Zelle sezerniert. Diese Proteine können von derselben oder von benachbarten Zellen über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor MPR300 an der Plasmamembran gebunden und AP2-abhängig endozytiert werden (Abb. 1.6). Die Internalisierung ubiquitinylierter Rezeptoren wird hauptsächlich durch Epsin 1 vermittelt (Barriere et al 2006). In den frühen Endosomen werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe für den Weitertransport zu den späten Endosomen sortiert. Bei der Sortierung von Rezeptoren in *Multivesicular Bodies* (MVB) spielt die ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*)-Maschinerie, die aus mehreren Proteinkomplexen (ESCRT 0, ESCRT 1, ESCRT 2 und ESCRT 3) besteht, eine wichtige Rolle (Nickerson et al 2007). So werden die ESCRT-Komplexe für die Ausbildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs) benötigt (Raiborg & Stenmark 2009). Zudem rekrutiert die ESCRT-Maschinerie Enzyme, die Ubiquitin von Rezeptoren entfernen können, sogenannte Dubs, bevor diese in ILVs verpackt werden (Millard & Wood 2006). Der MPR300 bleibt hauptsächlich in der äusseren Membran der MVBs, während polyubiquitinylierte Rezeptoren für die spätere Degradation in den Lysosomen in ILVs sortiert werden (Abb 1.6). In späten endosomalen Kompartimenten dissoziieren aufgrund des niedrigen pH-Wertes die lysosomalen Enzyme von MPR300 und werden zu den Lysosomen befördert. Der Rezeptor wird entweder RAB9/RAB7b-abhängig zum *trans*-Golgi-Kompartiment transportiert oder er rezirkuliert an die Plasmamembran, wo er für neue Transportvorgänge zur Verfügung steht (Braulke & Bonifacino 2009; Progida et al 2010). Die Fusion der späten Endosomen und MVBs mit Lysosomen führt zum Abbau transportierter polyubiquitinylierter Rezeptoren (Sorkin & von Zastrow 2009).

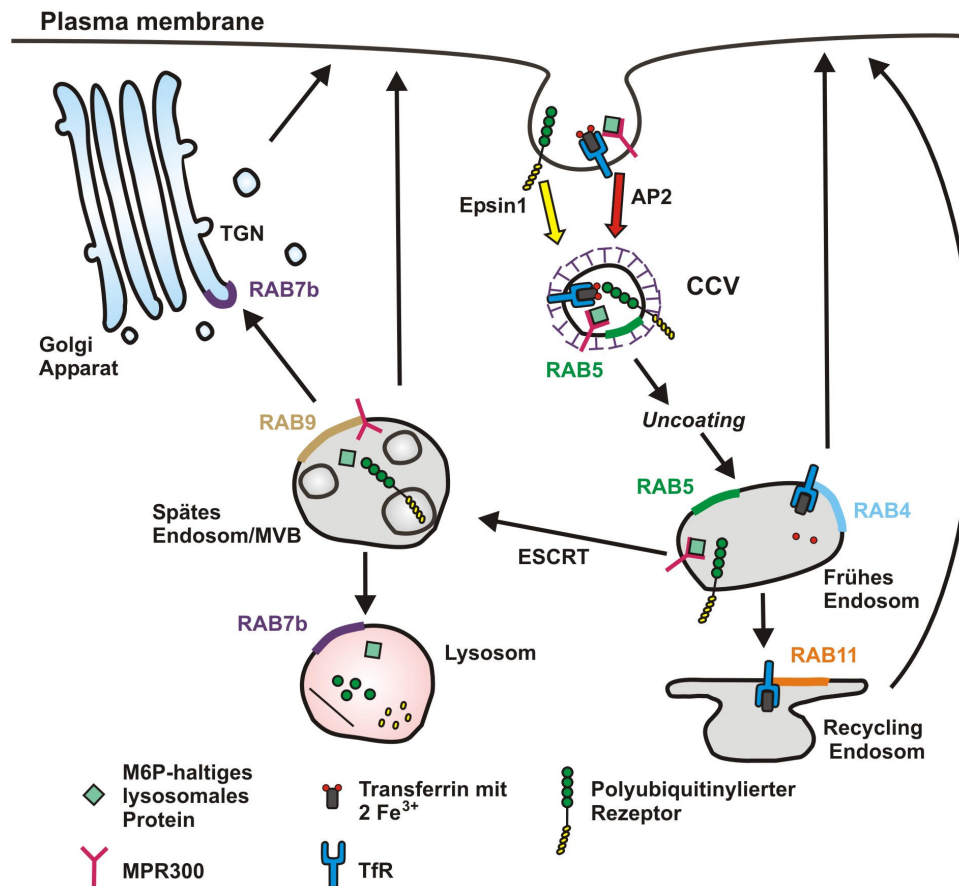


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Clathrin-vermittelten Endozytose von Ligand-Rezeptor-Komplexen. Die Lokalisation beteiligter RAB-Proteine ist gekennzeichnet. Die Ligand-Rezeptor-Komplexe werden an der Plasmamembran in Clathrin-beschichtete Bereiche (CCV) rekrutiert. Der Transferrin-Rezeptor (TfR) und der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR300) werden AP2-abhängig (roter Pfeil), ubiquitinierte Rezeptoren Epsin1-abhängig (gelber Pfeil) internalisiert. Von der Plasmamembran lösen sich schließlich *Clathrin coated vesicles* (CCV) ab, die nach kurzer Zeit ihre Clathrin-Hülle abstreifen. Nach dem Verschmelzen der Vesikel mit frühen endosomalen Kompartimenten dissoziiert Fe³⁺ vom TfR und der Rezeptor kann entweder RAB4-abhängig zur Plasmamembran zurücktransportiert werden oder der Rücktransport erfolgt vom Recycling-Endosom aus und wird über RAB11 vermittelt. Der MPR300 ist in der äußeren Membran der *Multi Vesicular Bodies* (MVB) nachweisbar, wo Liganden von den Rezeptoren dissoziieren, während ubiquitinierte Rezeptoren in intraluminalen Vesikeln sortiert werden. Ubiquitinierte Rezeptoren und lysosomale Proteine gelangen in die Lysosomen, wo die Ub-Rezeptoren abgebaut werden. Der MPR300 kann RAB7b- oder RAB9-vermittelt zur Plasmamembran oder zum *trans-Golgi-Kompartiment* (TGN) rezirkulieren.

Die Transferrin-Rezeptor vermittelte Endozytose

Der Transferrin-Rezeptor (TfR) wird konstitutiv über AP2 internalisiert und zeichnet sich durch einen schnellen Rücktransport zur Plasmamembran aus (Abb. 1.6, (Motley et al 2003)). Der humane TfR ist ein 90 kDa glykosyliertes Typ II Transmembranprotein und bildet über Disulfidbrücken verbundene Dimere aus (Schneider et al 1982). TfR binden und internalisieren Transferrin, ein glykosyliertes Transportprotein für Eisen. Transferrin kann zwei Fe³⁺-Ionen/Molekül binden und wird in dieser Form als Ferrotransferrin bezeichnet.

Der Transferrin-Rezeptor wird nicht in MVBs sortiert, sondern gelangt in RAB11-positive *Recycling*-Endosomen, wo aufgrund des sauren Milieus Fe^{3+} vom Transferrin dissoziiert (Zerial & McBride 2001) (Abb. 1.6). Das eisenfreie Transferrin bleibt am TfR gebunden und wird als Apotransferrin-Rezeptor-Komplex zurück zur Plasmamembran transportiert. Apotransferrin zeigt bei neutralem pH-Wert nur eine geringe Affinität zum TfR, was zur Dissoziation vom TfR führt. Der gesamte Zyklus benötigt ungefähr 16 min (Omary & Trowbridge 1981), wobei die Rezeptoren nach 10 min die Recycling-Endosomen verlassen (McGraw & Maxfield 1990)

1.3 Zielsetzung

Die Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) sind die häufigste Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen im Kindesalter. Die NCL sind lysosomale Speichererkrankungen, die sich durch lysosomale Einschlüsse in den meisten Körperzellen auszeichnen. Die variante Form der spät-infantilen NCL wird durch Mutationen im CLN6-Gen hervorgerufen, das für ein ER-residentes, polytopes Membranprotein unbekannter Funktion kodiert. Die *nclf*-Maus stellt ein natürlich auftretendes Tiermodell der CLN6-Krankheit dar. Der Krankheitsverlauf in *nclf*-Mäusen bei dem es zu Neurodegeneration, Erblindung, Krampfanfällen und progressiver mentaler Degeneration kommt, ähnelt dem der humanen CLN6-Erkrankung. Die Ursache für die Entstehung des lysosomalen Speichermaterials, sowie der Pathomechanismus der Neurodegeneration sind nicht bekannt.

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener krankheitsrelevanter Mutationen im *CLN6*-Gen auf die Stabilität, Dimerisierung und Lokalisation von CLN6 war deshalb ein Scherpunkt dieser Arbeit.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag auf Untersuchungen des intrazellulären Transport von Proteinen, besonders entlang des Endozytoseweges, und der Sortierung von Rezeptoren und Liganden im endosomalen Kompartiment von neuronalen Zellen aus Wildtyp und CLN6-defekten Mäusen und in CLN6 siRNA behandelten Zellen. Diese Untersuchungen sollten Auskunft geben über die Bedeutung des Transports von lysosomalen Proteinen, Substraten und Komponenten der Lysosomen für deren Funktion.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften
<i>Escherichia coli</i> TOP 10F	Rif ^r , F', proAB, lacIqz_M15, Tn10, Tet ^r

2.1.2 DNA-Standards, Plasmide und Konstrukte

	Firma / Referenz
DNA Standard 1 kb-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Standard 100 bp-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA3.1 A (-)myc/His	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA3.1-CD4TI-Ub(WT)	Prof. Lukacs, Abt. Physiologie, McGill University, Montreal, Kanada
pCDNA3.1-CD4CC-Ub(allRG)	Prof. Lukacs, Abt. Physiologie, McGill University, Montreal, Kanada

Die Konstrukte pcDNA3.1 A (-)myc/His-CLN6 (WT), pcDNA3.1 A (-)myc/His-CLN6 p.I154del und pcDNA3.1 A (-)myc/His-CLN6 p.G123D waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

2.1.3 Enzyme und Nukleotide

DNase I	Sigma-Aldrich, München
dNTP-Set (ultrapure)	Invitrogen, Karlsruhe
Papain	Sigma-Aldrich, München
<i>Pfu-Turbo</i> TM -Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Proteine, Protease/Proteasom-Inhibitoren und Proteinstandards

Asialo orosomucoid (ASOR)	Von Prof. Braulke, zu Verfügung gestellt
E64	Sigma-Aldrich, München
Lactacystin	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, München
Rekombinante humane Arylsulfatase B (ASB)	wurde von der Firma Biomarin (USA) zu Verfügung gestellt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Transferrin	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Transferrin-AlexaFluor®546	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
BS ³	Pierce, Bonn
BSA (bovine serum albumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloroform (CHCl ₃)	Sigma-Aldrich, München
Diäthylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dinatriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Diphenyloxazol (PPO)	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Filipin	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fucose, Galactose, Glucose	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalium-Acetat	Sigma-Aldrich, München

Kaliumchlorid (KCl)	J.T. Baker, Griesheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
Methionin	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Natura Flor, Töpfer GmbH, Dietmannsried
Mowiol	Hoechst, Frankfurt a.M.
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad, München
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Acetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-desoxycholat	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat(NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
p-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Protein A-Agarose-Macrobeads	Sigma-Aldrich, München
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich, München
Saccharose	J.T. Baker, Griesheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, München
Streptavidin-Agarose	Pierce, Rockford, USA
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Tri Reagent®	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Heckt KG, Sondheim
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalküvetten	Plastibrand, Wertheim
Einwegmaterial für Zellkultur	BD Falcon, Heidelberg Sarstedt, Nümbrecht Nunc, Wiesbaden
Einweg-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht

Filmkassetten	Rego, Augsburg
Filterschwämme	Amersham
Gel-Glasplatten	Amersham
Immersionsöl 518 C	Zeiss, Oberkochen
Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Objekträger	Engelbrecht, Kassel
Protran™ Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht Eppendorf, Hamburg Greiner, Essen
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Skalpelle	Braun, Melsungen
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	VWR, Darmstadt
Stripes/Deckel für Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Szintillationsröhrchen	Perkin-Elmer, Waltham, USA
Teflonkämme	Hofer, Holliston, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel

2.1.7 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin [1.000 Ci/mmol]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹²⁵ J]-Natriumjodid 100 mCi/ml trägerfrei in NaOH-Lösung pH 7-11	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹²⁵ J]-markierte ASB	Von Prof. T. Bräulke zu Verfügung gestellt.
[¹²⁵ J]-markiertes Transferrin	Von Prof. T. Bräulke zu Verfügung gestellt.

2.1.8 Kits und Assays

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem, Darmstadt
Microscale Antibody Labeling Kit- AlexaFluor®647	Molecular Probes, Invitrogen Karlsruhe
PIP3 Mass Strip Kit	Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA
QIAquick® gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAplasmid® Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAplasmid® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden

RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystem, Darmstadt

2.1.9 Geräte und Apparaturen

Gerät	Typ	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wetzlar
Blockthermostat	Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
	TM130-6	HLC, Bovenden
Chemi Doc XRS	Imager	Bio-Rad, München
Counter	β-Counter LS3801	Beckman Counter, Krefeld
	γ-Counter 1470 Wizard	Wallac, Finnland
Drehrad	Rotator	Neolab, Heidelberg
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer	Agagel Midi Wide	Biometra, Göttingen
	SE600	Hoefer, Holliston, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad, München
Horizontalschüttler	Rocky	Fröbel Labortechnik, Wasserburg
Inkubationsschrank	CO ₂ -Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
	Gasboy C20A	Labotect, Wiesbaden
	Innova CO-170	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Kryo-Einfriergerät	Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
	Olympus IX81	Olympus, Hamburg
	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
	Gelaire	Flow Laboratories, USA
Stickstoff-Einfriertank	Airpage 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen

	Real-Time MX3000P™	Stratagene, USA
	Mastercycler, Gradient	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	TE62 & TE22	Hofer, Holliston, USA
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	AC100	Mettler Toledo, Giessen
	BP2100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt Labortechnik, Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
	Speed Vac®	Savant
	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
	Minifuge RF	Heraeus, Hanau
	MC6 Centrifuge	Sarstedt, Nümbrecht
	Sorvall Discovery M120	Kendro Laboratory Products, Newtown, USA

2.1.10 Software

Name	Anwendung	Version	Firma
CellR	Bedienung TIRF-Mikroskop	3.2	Olympus, Hamburg
Leica Confocal Software	Bedienung Konfokal-Mikroskop	2.61	Leica, Wetzlar
MetaMorph	Quantifizierung von Fluoreszenzintensitäten	7.1	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
MxPro	Real-Time-PCR	4.6.1	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Quantity One	Western Blot-Auswertungen	2.61	Bio-Rad, München

2.1.11 Primärantikörper

Generiert in: Kaninchen (K), Maus (M), Ratte (R).

IF: Immunfluoreszenz, IPP:Immunpräzipitation, WB: Westernblot

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung		
			WB	IF	IPP
AKT	K	Cellsignaling, Danvers, USA	1:500		
Aktin	M	Santa Cruz, Heidelberg	1:500		
Alpha-Adaptin (AP2)	M	BD Biosciences, San Jose, USA	1:300	1:100	
ASB	K	(Steckel et al 1983)	1:100 0	1:250	
CD4	M	BD Biosciences, San Jose, USA		1:200	
Clathrin Heavy Chain	M	BD Biosciences, San Jose, USA		1:200	
Dynamin II	M	BD Biosciences, San Jose, USA		1:100	
EEA1	M	BD Biosciences, San Jose, USA		1:100	
Epsin1	K	Santa Cruz, Heidelberg	1:500	1:100	
GFAP	M	Sigma-Aldrich, München		1:500	
GFAP	K	Dako		1:500	
GM130	M	BD Biosciences, San Jose, USA		1:300	
Human CLN6 1747	K	(Mole et al 2004)	1:200 0	1:500	1:200
Human Lamp1 (H4A3)	M	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA		1:250	
Mannose-6-Phosphat <i>single chain</i>		((Müller-Loennies et al 2010)	1:100 0		
MAP2	M	Roche		1:300	
murines Lamp1 (1D4B)	R	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA		1:250	
myc	K	Sigma-Aldrich, München	1:500		
PDI	M	Stressgen, Ann Arbor, USA		1:500	
PI(3,4,5)P3-FITC	M	Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA		1:100	
PI(4,5)P2-FITC	M	Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA		1:100	

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung		
			WB	IF	IPP
Phospho-AKT (Ser473)	K	Cellsignaling, Danvers, USA	1:500		
RAB4	K	Santa Cruz, Heidelberg		1:100	
Rab5	M	Synaptic Systems, Goettingen		1:100	
Tau	K	Dako, Hamburg		1:500 0	
Transferrin Rezeptor	M	Invitrogen, Karlsruhe	1:200	1:100	
β -Tubulin E7	M	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA	1:500		

2.1.12 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung
Schaf α Maus Cy3	Dianova, Hamburg	1:500
Ziege α Maus Alexa Fluor 546	Invitrogen, Karlsruhe	1:500
Ziege α Kaninchen Alexa Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe	1:1000
Ziege α Kaninchen HRP	Dianova, Hamburg	1:5000
Ziege α Maus HRP	Dianova, Hamburg	1:2000

2.1.13 Medien und Zusätze

2.1.13.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

LB Vollmedium

10 g/l Bacto-Trypton;
 5 g/l Bacto-Hefeextrakt;
 8 g/l NaCl;
 pH= 7,2 mit NaOH einstellen

Vor Gebrauch Zugabe von 100 mg/l Ampicillin. Für die Herstellung von Festmedien erfolgte die Zugabe 15 g/L Agar

2.1.13.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

AraC Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
B27	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
DMEM ohne Methionin	PAA, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Österreich
Glutamat	Sigma-Aldrich, München
GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Neurobasalmedium A	GIBCO/BRL, Eggenstein
Optimem®-1 + GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
Phosphate Buffered Saline(PBS (10X; 100mM))	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Pferdeserum	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	GIBCO/BRL, Eggenstein

2.1.14 Zell- und Mauslinien

<i>ncf</i> –Mäuse	B6.Cg-Cln6 ^{<i>ncf</i>} ; Mausstamm mit homozygoter Mutation im <i>CLN6</i> , gezüchtet in der Tierhaltung des UKE, Hamburg	Jackson Laboratories, Maine, USA
BHK	Baby hamster kidney Zellen	Prof. Figura, Institut für Biochemie 2, Georg-August-Universität, Göttingen
HeLa	menschliche Cervixkarzinomzellen	ATCC, Rockville, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzspitzen zur Genotypisierung

Lysispuffer: 100 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl

SDS-Lösung: 10 % (w/v) SDS

Proteinase K-Lösung 10 mg/ml in Lysispuffer

Zur Kontrolle wurde der Genotyp einiger Tiere *ncf*-Mauszucht regelmäßig bestimmt. Dazu wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen isoliert. Die Schwanzspitzen wurden dazu in je 500 µl Lysispuffer, 15 µl SDS-Lösung und

20 µl Proteinase K-Lösung im Schüttler bei 56 °C ü.N. inkubiert. Die Proben wurden für 5 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol (100 %) zum Überstand gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die pelletierte DNA mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen. Anschließend wurde die DNA für 20 min bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl ddH₂O gelöst und die Konzentration am Photometer bei 260 nm gemessen.

Zur Genotypisierung wurde *CLN6* über PCR mit Hilfe der Primer CLN6Intron4for und CLN6Exon4rev amplifiziert und sequenziert. Die Sequenz der benutzten Primer befindet sich im Anhang.

2.2.2 DNA-Restriktionsspaltung

Die DNA-Restriktionsspaltung ist einerseits eine Methode zur Analyse von DNA und andererseits ein vorbereitender Schritt für eine anschließende Ligation. Für eine Inaktivierung wurde eine Kombination von alternierender Hitze-/Kälte-Einwirkung (-80°C/65-95°C, je nach Herstellerangaben) durchgeführt. Ließ sich ein Enzym nicht durch eine Hitze-Kälte-Behandlung inaktivieren, oder sollte der Ansatz für die weitere Verwendung frei von Enzymen sein, wurde eine Aufreinigung mittels QIAquick® PCR Purification Kit durchgeführt. Ein 20 µl Restriktionsansatz wurde beispielsweise wie folgt zusammenpipettiert:

x µl DNA (ca. 0,1-1 µg)
2 µl 10 x Reaktionspuffer
1-2 µl Restriktionsenzym (10 U/µl)
x µl dH₂O (ad 20 µl)

2.2.3 Klonierung der CLN6-Mutanten

Die Mutationen CLN6 p.G123D (c.368G>A), CLN6 p.I154del (c.460_462delATC) und CLN6 p.R106PfsX26 (c.316insC) wurden mittels des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* nach Angaben des Herstellers und mit den Primern Del154for, Del154rev, G123Dfor, G123rev 316insCfor und 316insCrev in das humane *CLN6*-Gen eingebracht. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Primer befinden sich im Anhang. Die mutierten Konstrukte wurden mittels Restriktion und Sequenzierung überprüft.

2.2.4 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemokompetente TOP10-*E.coli*-Zellen (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,7 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Unterschiedlich große Mengen des Transformationsansatzes wurden auf zwei LB-Agarplatten ausplattiert, die ein entsprechendes Selektionsantibiotikum enthielten, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium (inkl. Antibiotikum) angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glycerinkulturen verwendet.

2.2.4.1 Präparation von chemokompetenten *E.coli*-Zellen

Lösungen:

Tfbl:

100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM KAc; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 mit Essigsäure (0,2 M) eingestellt

TfbII: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin
pH 7,0 mit NaOH eingestellt

5 ml LB-Medium wurden mit einer *E. coli* TOP10 F Kolonie von einer Stammplatte angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 37 inkubiert und anschließend in einen 1 l Schüttelkolben mit 200 ml LB-Medium überimpft.

Die Kultur wurde bis zur frühlogarithmischen Phase (OD₆₀₀ 0,3) angezogen und anschließend durch schnelles Abkühlen in diesem Zustand „arretiert“. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4 °C pelletiert. Das Sediment wurde in 30 ml Tfbl (4 °C) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 4 ml TfbII resuspendiert und in Aliquots von je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.4.2 Anlegen eines Glycerinstocks

Plasmidtragende und rekombinante Stämme wurden selektiv angezogen. Zur dauerhaften Stammkonservierung wurden Glycerinkulturen von

Einzelkolonieausstrichen angelegt. Dafür wurden 600 µl einer Vorkultur mit 300 µl sterilem 87 %igem Glycerin vermischt. Die so hergestellten Glycerinkulturen können bei -80°C gelagert werden

2.2.4.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Plasmid-Mini- und Midipräparationen wurden mittels des *Plasmid-Mini-Kits* (bis 20 µg DNA) und *Plasmid-Midi-Kits* (für 20-100 µg DNA) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

In einer Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente verschiedener Größe aufgetrennt werden. Durch Vergleiche mit einem Längenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Größe, kann auf die Größe unbekannter DNA-Fragmente zurückgeschlossen werden

Agarosegel

Agarose in TAE-Gelpuffer	1-3% (w/v)
Ethidiumbromid	Endkonzentration 0,5 µg/ml

DNA-Ladepuffer:

Saccharose	40 % (w/v)
EDTA	1 mM
Bromphenolblau	0,25 %

TAE-Gelpuffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	2 mM

in ddH₂O lösen; mit HCl auf pH 8,5 einstellen

Es wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht und nach Abkühlen auf ca. 55 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Das eingelagerte Ethidiumbromid erlaubt die Sichtbarmachung der DNA-Fragmente

unter UV-Licht. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einer Digitalkamera aufgenommen.

2.2.5.1 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des *Qiaquick-Spin-Gel-Extraction Kits* nach Anweisung des Herstellers aus der Agarose extrahiert.

2.2.6 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction) ist eine in vitro Methode zur gezielten enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Als Template dienen in dieser Arbeit genomische DNA, die aus Schwanzspitzen isoliert wurde oder bakterielle Plasmid-DNA. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler unter Mitführung einer Negativ-Kontrolle ohne Template.

DNATemplate	Primer 3´ und 5´ (10 pmol/µl)	dNTP (10 mM je Nukleotid)	10 x PCR- Puffer	Taq- Polymerase (5 U/µl)	H ₂ O ad
50 ng	je 2,5 µl	2 µl	5 µl	1 µl	50 µl

PCR-Programm für *Taq*-Polymerase

1. 94°C 3-10 min Vorlauf
 2. 94°C 30 sec Denaturieren
 3. * °C 30 sec Annealing
 4. 72°C ** Polymerisation
 5. 72°C 3 min finale Polymerisation
 6. 8°C bis zur Aufbewahrung
- } 35 Zyklen

*abhängig von den verwendeten Primern; ** abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes

2.2.7 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA-Proben erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens. Für eine Sequenzreaktion wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

x μ l Plasmid-DNA (ca. 1 μ g)
1 μ l sequenzspezifischer Primer (10 pmol/ μ l)
6 μ l Puffer
2 μ l Big Dye-Terminator-Mix
x μ l ddH₂O (ad 20 μ l)

Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden nach 5 min Denaturierung bei 96 °C folgende Bedingungen für 25 Zyklen gewählt:

1. Denaturierung: 95 °C 10 sec
2. Anlagerung („annealing“): 50 °C 5 sec
3. Elongation: 60 °C 4 min

Nach der Amplifikation wurde die DNA durch Zugabe von 2 μ l 3 M Na-Acetat (pH 4,6) und 50 μ l Ethanol (95 %) 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 16.000 x g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 200 μ l Ethanol (70 %) gewaschen, nochmals 10 min zentrifugiert und bei 60 °C für 5 min getrocknet, bevor es der Sequenz-Analyse durch das Sequenzierlabor des UKEs zugeführt wurde.

2.2.8 RNA-Isolierung

Das Medium von Zellen einer 3,5 cm-Kulturschale wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml *Tri Reagent* auf die Platte gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform und 15-sekündigem Vortexen wurde erneut für 5 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden 15 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Interphase zu berühren, und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von einem Volumen 70 % Ethanol wurde eine RNeasy Mini Spin-Säule mit dem Gemisch beladen und die weitere Isolierung der RNA mit dem RNeasy® Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Quantität der RNA wurde photometrisch und die Qualität durch Auftrennung im Agarosegel überprüft.

2.2.9 cDNA-Synthese

Da RNA keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt, ist es notwendig, sie mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in eine zur RNA komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die entstehende cDNA diente als Ausgangsmatrize für die Amplifikation mittels PCR. Die cDNA wurde mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* nach Angaben des Herstellers synthetisiert.

2.2.10 Quantitative Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ist eine Methode zur Nukleinsäurequantifizierung, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Für die quantitative Analyse der RNA-Expression von CLN6 in HeLa-Zellen nach CLN6 siRNA Transfektion, wurden *TaqMan® Gene Expression Assays* verwendet. Die Sonde besitzt hierbei an ihrem 3'-Ende einen Quencher (TAMRA) und an ihrem 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM). Liegt der Quencher in ausreichende Nähe zu dem Reporterfarbstoff (max. 17-20 Basen), wird die Energie des Reporterfarbstoffs direkt an den Quencher weitergeleitet (Cardullo *et al.*, 1988). Wenn die Polymerase während der Extension des Primers auf die Sonde trifft, verdrängt sie diese und die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase baut die Sonde ab. Dadurch wird das Fluorophore frei, entfernt sich vom Quencher und es kann eine steigende Fluoreszenz gemessen werden. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der Konzentration des Amplifikationsproduktes. Da entstehenden Produktmengen zunächst gering sind, kann für eine gewisse Anzahl an Zyklen keine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Der *cycle of threshold* (Benedict *et al*) einer Probe gibt den Zyklus der PCR an, bei dem erstmals eine exponentielle Zunahme des PCR-Produkts bzw. der Fluoreszenz auftritt. Dieser Wert ist die Grundlage für die weitere Auswertung, mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Für die relative RNA-Quantifizierung wurde die Differenz zwischen dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens und dem Kontrollgen, β -Actin gebildet. Die relative Expression wurde aus dem Vergleich von HeLa-Zellen, die mit Kontroll siRNA

bzw. mit *CLN6* siRNA transfiziert wurden und untransfizierten Zellen nach der folgenden Gleichung ermittelt: relative Expression: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dabei ist

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{CLN6}}$$

$$\text{und } \Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{CLN6 siRNA transfizierte Zellen}} - \Delta Ct_{\text{Kontroll siRNA transfizierte Zellen}}$$

Für die graphische Auswertung wurde die relative Expression der Kontrolle gleich 1 gesetzt. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem 20 µl PCR-Ansatz in PCR Stripes. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000P™.

Real-time PCR-Ansatz:

10 µl *Maxima™ Probe qPCR Master Mix*

7 µl H₂O

1 µl *TaqMan® Gene Expression Assay*

2 µl Template-cDNA

PCR:

95°C 10 min

95°C 30 sec

60°C 1 min } 40 Zyklen

2.2.10.1 Primer für Real-Time PCR

Es vorgefertigte TaqMan®-Primer von der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Oligonukleotidsequenzen sind nicht erhältlich.

Gen TaqMan®-Gene Expression Assay

CLN6: Hs00608557_m1

ACTB: Hs99999903_m1

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. BHK- und HeLa-Zellen wurden in DMEM + GlutaMax™ + 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle 3 Tage wurden die Zellen passagiert.

2.3.2 Trypsinieren der Zellen

Der Zellrasen wurde mit 10 mM PBS gespült, um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin/EDTA 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.

2.3.3 Isolierung und Kultivierung primärer Zellen aus Mäusen

2.3.3.1 Isolierung und Kultivierung von primären hippocampalen Neuronen

Hank´s gepufferte Salzlösung (HBSS)	MgCl ₂	1 mM
	Glukose	5,5 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	5,4 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	2,7 mM
	NaHCO ₃	4,2 mM
	MgSO ₄	0,8 mM
	CaCl	1,7 mM

Papain-Lösung (5 ml)	PBS	10 mM
	Glukose	10 mM
	DNase I	50 µl
	Papain	2,5 mg

Ausplattiermedium: 0,6 % Glukose, 10 % Pferdeserum in MEM

Neurobasalmedium 1:	B27	2 %
	GlutaMax™	0,5 mM
	Penicillin	20 U/ml
	Streptomycin	20 µg/ml
	Glutamat	25 µM

Neurobasalmedium 2:	B27	2 %
	GlutaMax™	0,5 mM
	Penicillin	20 U/ml
	Streptomycin	20 µg/ml
	AraC	10 µM

Neurobasalmedium 3:	B27	2 %
	GlutaMax™	0,5 mM
	Penicillin	20 U/ml
	Streptomycin	20 µg/ml

Zellkulturplatten wurden mit Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml) beschichtet und bis zur Verwendung bei RT inkubiert. Primäre Neurone wurden aus P0-P1 Tage alten Mäusen isoliert. Hierzu wurde das Hirn herauspräpariert. In kaltem HBSS wurden die Hemisphären abgetrennt und die Hippocampi isoliert. Anschließend wurden die Hippocampi von Hirnhäuten befreit und in 5 ml Papain-Lösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellkulturplatten 3 x mit PBS gewaschen.

Nach Absaugen der Lösung wurden die Zellen 3 x mit 5 ml warmen Ausplattiermedium gewaschen. Die Zellen wurden durch Resuspendieren mit einer 1 ml-Spitze und 200 µl-Spitze in 2 ml Ausplattiermedium vereinzelt und ausplattiert. Da im Laufe der Neuronendifferenzierung viele Zellen, wie z.B. Astrozyten absterben, wurden die Zellen vor dem Ausplattieren nicht gezählt. Für Immunfluoreszenzen wurden die isolierten Zellen von 2 Tieren, für Zelllysate und Lipidextraktionen, wurden die Zellen von 3 Tieren auf eine 12 Well-Platte ausplattiert.

4-5 h später wurde das Medium gegen 1 ml Neurobasalmedium 1 gewechselt. Bereits am nächsten Tag wurden 500 µl des Mediums abgenommen und 500 µl des Neurobasalmedium 2 zugegeben. Weitere 3-4 Tage später wurden wieder 500 µl abgenommen und 500 µl des Neurobasalmedium 3 zugegeben. 12-14 Tage nach der Präparation waren die Neurone ausdifferenziert und die Experimente wurden durchgeführt.

2.3.3.2 Isolierung und Kultivierung von primären Astrocyten

Astrozytenmedium:	DMEM	
	FKS	10 %
	Glukose	0,6 %
	NaHCO ₃	25 mM
	Glutamin	200 nM
	Penicillin	50 U/ml
	Streptomycin	50 µg/ml

Papainlösung Siehe 2.3.3.1

Zellkulturplatten wurden mit Poly-L-Lysin (0,1mg/ml) beschichtet und während der Präparation bei RT inkubiert. Für die Isolierung primärer Astrocyten wurden P0-P1 Tage alte Mäuse verwendet. Das Hirn wurde herauspräpariert bzw. das übrig gebliebene Gewebe von der Neuronenisolierung verwendet (siehe 2.3.3.1). In kaltem HBSS wurden die Hirnhäute entfernt und die Hirne in kleine Stücke geschnitten. Der Papainverdau und die Dissoziation wurden wie bei der Neuronenisolation durchgeführt (siehe 2.3.3.1). Allerdings wurde das Gewebe nach dem Verdau mit Astrozytenmedium gewaschen. Die isolierten Zellen von zwei Tieren wurden auf sechs 12-Wellplatten ausplattiert. Am nächsten Tag wurde vorsichtig das Medium gewechselt.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Bei Bedarf wurden die Zellen trypsinisiert und im Verhältnis von 1:5 ausplattiert. Nach 12-14 Tagen wurden die Experimente durchgeführt.

2.3.4 Ernten der Zellen und Herstellung von Lysaten

HeLa- und BHK-Zellen sowie Astrozyten wurden 3 x mit kaltem PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 1000 x g und 4 °C sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis in Lysispuffer (0,1 % Triton X-100, 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail in PBS) inkubiert bevor sie für 10 min bei 14.000 x g und 4 °C erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen.

Neuronen wurden 3 x mit kaltem PBS gewaschen und im Well durch Zugabe des Lysispuffers für 10 min auf Eis lysiert. Danach wurden sie zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter benutzt.

2.3.5 Differentialzentrifugation

BHK-Zellen wurden auf 6 cm Zellkulturplatten kultiviert und für 24 h mit Konstrukten, die entweder Wildtyp-CLN6 oder eine der drei CLN6-Mutanten kodierten, transfiziert. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 2 min bei 1000 x g und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 100 µl Saccharose/EDTA (250 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 1x Protease-

Inhibitorcocktail) resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen wurden sie 25 x durch eine Kanüle gezogen (\varnothing 0,55 mm). Die Zellkerne (P1) wurden abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dadurch trennten sich Membranen vom Cytosol. Das Membranpellet (P2) und das Zellkernpellet (P1) wurden in 100 µl Lysispuffer für 10 min auf Eis gelöst (0,1 % TritonX-100, 1 x Proteaseinhibitorcocktail in PBS und anschließend erneut zentrifugiert (14.000 x g, 10 min, 4 °C). Die Überstände von P1 und P2 sowie die Cytosolfraction wurden mit Solubilisierungspuffer (4 x) versetzt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im CLN6-Western Blot analysiert.

2.3.6 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium 10 % DMSO, 10 % FKS in DMEM

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000 x g 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 in einem „Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container“ (Nalgene, Rochester, NY, USA) bei -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen und zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt. Die Zellsuspension wurde entnommen und in 4 ml Medium überführt und 5 min bei 1.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Um DMSO-Reste und tote Zellen zu entfernen wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt.

2.3.7 Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Sollten die Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen verwendet werden, wurden sie bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert. Zur DNA-Transfektion wurde Lipofectamine®2000 verwendet. Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA und Transfektionsreagenz

richtete sich nach der Größe der Kulturschale (siehe unten). Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden in Antibiotika-freiem DMEM/FKS für 24 h bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert

Kulturschale	DNA	<i>Lipofectamine</i> ®2000
12-Well	1,25 µg	2,5 µg
3,5-cm	2,5 µg	5,0 µg
6-cm	5 µg	10,0 µg

2.3.8 Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA

HeLa-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50 % kultiviert. Das Medium wurde durch antibiotikafreies Medium ersetzt und die Zellen mit 32 pmol/ml Kontroll- oder *CLN6* siRNA und 1,6 µl/ml Lipofectamine 2000 transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt (Abb. 2.1). Nach weiteren 24 h wurde erneut das Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 96 h nach der ersten Transfektion geerntet und die *CLN6*-Expression durch Real-Time PCR und im *CLN6*-Western Blot untersucht. Auf diese Weise wurde die Effizienz von drei vorgefertigten *CLN6* siRNAs der Firma Invitrogen ausgetestet. Die Sequenzen dieser Oligonukleotide befinden sich im Anhang. Die Kontroll siRNA wurde ebenfalls von Invitrogen bezogen. Die Sequenz ist nicht verfügbar.

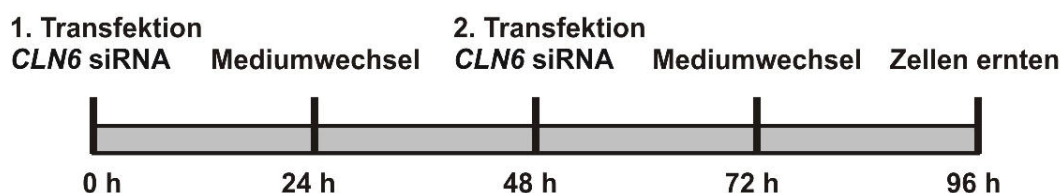


Abb. 2.1: Schema der *CLN6* siRNA Transfektion.

2.3.9 Transfektion von primären hippocampalen Neuronen

Neurone wurden in einer 12-Well-Platte 12-13 Tage kultiviert. 2-3 Tage vor der Transfektion wurde 50 % des Mediums gegen Medium ohne Antibiotikum ausgetauscht. Zur Transfektion der CD4-Konstrukte wurde *Lipofectamine*®2000 und 1,25 µg DNA verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach 4-6 h wurde 50 % des Mediums durch antibiotikafreies

Medium ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen für die Internalisierungsassays verwendet.

2.3.10 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)

BHK-Zellen, HeLa-Zellen, primäre Neurone und Astrozyten wurden auf Deckgläschen in einer 12- oder 24-Well-Gewebekulturschale kultiviert. Die IFA wurde bei primären Neuronen und Astrozyten 12-14 Tage nach der Isolation durchgeführt. Transfizierte Neurone und BHK-Zellen wurden nach 24 h Transfektion benutzt, mit siRNA behandelte HeLa-Zellen nach 96 h. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen bevor sie 20 min mit 4 % Paraformaldehyd bei RT fixiert wurden. Anschließend wurden die Zellen 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Plasmamembran erfolgt mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 min. Um unspezifische Proteinwechselwirkungen zu reduzieren, wurden die Zellen für 30 min in 2 % BSA/PBS inkubiert. Die Glasplättchen wurden auf einem Streifen Parafilm zusammen mit feuchtem Filterpapier in eine entsprechend große Schale mit Deckel gelegt. Die Primärantikörper wurden mit der Blockierlösung verdünnt und entweder für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit den entsprechenden, in Blockierlösung verdünnten, sekundären Antikörpern inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min in einer DAPI-Lösung (Verdünnung 1:1000) inkubiert und erneut 2 x mit PBS gewaschen. Um eventuelle Salze zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen. Mit Hilfe des Eindeckmediums Mowiol wurden die Deckgläser auf Objektträgern fixiert und ü.N. bei RT getrocknet. Die Zellen wurden durch konfokale Laser-Scan-Mikroskopie (Vergrößerung: 63x, Leica DMIRE2) untersucht. Bei Doppel-Immunfluoreszenzanalysen erfolgte nach Einzelaufnahme der Fluoreszenz-Signale eine Überlagerung der digitalen Bilder.

2.3.10.1 Cholesterinfärbung mit Filipin

Filipin ist ein Antibiotikum, das aus dem Aktinomyzeten *Streptomyces filipinensis* gewonnen wird. Da es spezifisch an unverestertes Cholesterin in

Membranen bindet und im UV-Licht fluoresziert, ist die Filipinfärbung eine sensitive Methode um dieses Sterol in fixierten Gewebeschnitte oder Zellen nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden siRNA behandelte HeLa-Zellen und kultivierte hippocampale Neurone mit Filipin angefärbt. Dazu wurde eine Filipinstocklösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml DMSO angelegt und diese mit 2 % FKS/PBS 1:100 verdünnt. Anschließend wurden die Primärantikörper, ihrer Verdünnung entsprechend, hinzugegeben und die Zellen 1 h mit dieser Lösung im Dunkeln bei RT inkubiert. Da Filipin die Zellen permeabilisiert, müssen keine zusätzlichen Detergenzien verwendet werden. Die weitere Durchführung entspricht der für Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (Abschnitt 2.3.7). Die Zellen wurden durch Epifluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Vergrößerung 63 x). Die Detektion des Filipins erfolgte im UV-Bereich bei 360/460 nm.

2.3.10.2 Endozytose von Arylsulfatase B für die Immunfluoreszenz-Analyse

HeLa-Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturschalen auf Deckgläschen kultiviert und mit Kontroll- und siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit AlexaFluor647-Arylsulfatase B (1:50 in DMEM/10 % FKS) für 10 min. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen 3 x mit kaltem PBS gewaschen und für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse präpariert. Neurone und Astrozyten wurden für 16 h mit 200 nM ASB im jeweiligen Medium inkubiert (siehe 2.3.3.1 + 2.3.3.2). Bei Neuronen wurden dazu 50 % des Mediums durch Medium mit 400 nM ASB ersetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 x mit kaltem PBS (10 mM) gewaschen und fixiert. Die weitere Durchführung entspricht der für Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (siehe 2.3.8).

2.3.10.3 Endozytose von AlexaFluor-546 Transferrin für die Immunfluoreszenz-Analysen

Neurone und mit Kontroll- bzw. *CLN6* siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturschalen auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 10 und 20 min im jeweiligen Kultivierungsmedium mit AlexaFluor546-Transferrin (20 µg/ml) bei 37 °C. Nach dem Entfernen des

Mediums wurden die Zellen 3 x mit kaltem PBS gewaschen und für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse präpariert (siehe 2.3.8).

2.3.10.4 Internalisierung von CD4-Chimeren

Wildtyp- und *nclf*-Neurone wurden in 12-Well-Zellkulturschalen kultiviert und für 24 h mit Konstrukten, die die CD4-Chimeren kodieren, transfiziert. Die Zellen wurden 2 x mit vorgekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 4 °C in 400 µl Neuronenmedium inkubiert, das CD4-Antikörper (1:200 verdünnt) enthielt.

Die Zellen wurden bei 4 °C 3 x mit kaltem PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Internalisierung der gebundenen Antikörper wurde durch die Inkubation der Zellen in 1 ml vorgewärmtem Medium für 5 min bei 37 °C ermöglicht. Das Medium wurde daraufhin abgenommen und die Zellen 2 x mit kaltem PBS gewaschen und für Immunfluoreszenz-Analysen fixiert.

2.3.11 Endozytose von [¹²⁵I]-Arylsulfatase B

Rekombinante humane Arylsulfatase B (ASB) stand als [¹²⁵I]-markiertes Protein in der Abteilung zur Verfügung. Neurone wurden 14 Tage in 12-Well-Zellkulturschalen kultiviert. Die Zellen wurden 3 x mit PBS (10 mM) gewaschen und für 20 bis 90 min in 250 µl Neuronenmedium mit [¹²⁵I]-ASB (400.000 cpm/ml) inkubiert. Als Kontrolle diente ein Aufnahmeexperiment für 90 min in Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P) (10 mM). Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen auf Eis 5 x mit 300 µl kaltem PBS gewaschen und oberflächengebundene ASB durch 2 Waschschriffe mit M6P (2 mM) für 5 min entfernt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 100 µl Lysispuffer (0,2 % Triton X-100 in PBS) lysiert und die Radioaktivität wurde bestimmt. 10 µl des Lysates wurden zur Messung der Proteinkonzentration abgenommen. Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

Astrozyten und mit Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden für 15 bis 60 min mit [¹²⁵I]-ASB (340.000 cpm/ml bzw. 280.000 cpm/ml) im jeweiligen Kulturmedium inkubiert. Um die Prozessierung der endozytierten ASB zu untersuchen, wurde bei einigen Zellen nach 30 min das [¹²⁵I]-ASB-

haltige Medium durch nicht-radioaktives Medium ersetzt. Die weiteren Schritte wurden, wie bei den Neuronen beschrieben, durchgeführt.

2.3.12 [¹²⁵I]-Transferrin-Bindungsassay

Der Anteil der Transferrin-Rezeptoren, der an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wurde mit Hilfe [¹²⁵I]-markiertem Transferrin bestimmt. Mit Kontroll- oder CLN6 siRNA behandelte HeLa-Zellen (siehe 2.3.6) wurden auf 4 °C abgekühlt (3 x waschen mit kaltem PBS) und für 2 h mit [¹²⁵I]-Transferrin (400.000 cpm/ml in DMEM/BSA mit 20 mM HEPES, pH 7,4) inkubiert. Einige Ansätze erhielten zusätzlich 60 µg/ml Transferrin.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen 5 x mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und für 2 min bei 1.000g und 4 °C abzentrifugiert. Die Radioaktivität der Zellpellets wurde gemessen. Die Zellpellets wurden lysiert (0,1 % Triton X-100 in PBS) und die Proteinkonzentrationen wurden bestimmt. Für die Auswertung wurde die Radioaktivität auf den Proteingehalt bezogen.

2.3.13 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Biotinlösung: 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin in 10 mM PBS

Untransfizierte und mit Kontroll- oder CLN6 siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden auf 4 °C abgekühlt und 3 x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit der Biotinlösung für 2 h bei 4 °C auf einem Schüttler. Daraufhin wurden die Zellen 4 x für je 5 min mit PBS gewaschen, um ungebundenes Biotin zu entfernen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS abgeschabt und durch Zentrifugation für 2 min bei 1.000g und 4 °C sedimentiert. Die Zellpellets wurden in jeweils 100 µl Lysispuffer (0,1 % Triton X-100 in PBS und 1 x Inhibitorcocktail) resuspendiert (Input). Für die Präzipitation der biotinylierten Proteine wurden je 200 µg Totalprotein in einem Volumen von 300 µl eingesetzt und mit 70 µl Streptavidin-Agarose für 1 h auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die *Beads* wurden 5 x mit PBS/0,1 % Tween gewaschen und anschließend in reduzierendem 1 x SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert (Eluat). 10 % des Inputs (20 µg) und

25 % des Eluats wurden durch SDS-Page aufgetrennt. Die Detektion des Transferrin-Rezeptors, von MPR300, CLN6 und Tubulin erfolgte im Western Blot mit Hilfe der entsprechenden Antikörper (siehe 2.1.11).

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

Hungermedium	Methionin-freies DMEM BSA	0,1 %
<i>Pulse</i> -Medium	Methionin-freies DMEM dialysiertes FKS (hitze-inaktiviert) [³⁵ S]-Methionin	1 % (v/v) 150 µCi/ml
<i>Chase</i> -Medium	DMEM BSA Methionin	0,1 % 0,25 mg/ml

Als metabolische Markierung bezeichnet man den Einbau radioaktiver Aminosäuren in neu-synthetisierte Proteine.

Dazu wurden die Zellen in Zellkulturschalen (35 mm Ø) kultiviert und mit dem entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert (2.3.5). Am Tag darauf wurden die Zellen 3 x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit Hungermedium inkubiert, bevor das Medium gegen 0,75 ml *Pulse*-Medium ausgetauscht wurde. Der Einbau in neu-synthetisierte Proteine erfolgte für 2 h (*Pulse*). Zur Bestimmung der Halblebenszeit von Proteinen wurde das *Pulse*-Medium abgenommen und durch *Chase*-Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 2 bis 24 h inkubiert (*Chase*). Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt und für 2 min bei 1.000g und 4 °C abzentrifugiert.

2.3.14.1 Immunpräzipitation von metabolisch markiertem CLN6 und Fluorographie

Neufeld-Puffer	Tris (pH 8,5)	10 mM
	NaCl	0,6 M
	SDS	0,1 %
	NP-40	0,05 %
IMM-Puffer	Triton X-100	1 %
	Na-desoxycholat	0,5 %
	in 10 mM PBS	

Lysispuffer	Triton X-100	1 %
	Protease-Inhibitor-Cocktail	
	BSA	1 %
	in 10 mM PBS	

Die Zellpellets (siehe 2.3.8) wurden in jeweils 800 µl Lysispuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellysate wurden mit Präimmenserum aus Kaninchen und 50 µl Protein A-Agarose versetzt und für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein A-Agarose und daran gebundene unspezifische Proteine wurden für 15 sec bei 3000 x g und 4°C abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 4 µl des *CLN6*-Antikörpers gegeben und ü.N. bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl Protein A-Agarose zu den Proben pipettiert und nochmals für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert (15 s, 3000 x g, 4°C) und wie folgt gewaschen:

- 1 x 800 µl Neufeldpuffer
- 1 x 800 µl IMM-Puffer
- 1 x 800 µl IMM-Puffer + 2 M KCl
- 2 x 800 µl 0,1 x PBS

Zwischen den Waschschritten wurden die Proben für 15 sec bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine durch 5-minütiges Erhitzen in Solubilisierungspuffer bei 95 °C von der Protein A-Agarose gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der mit [³⁵S]-Methionin-markierten Proteine, wurden die Gele zur Signalverstärkung für 1 h in DMSO inkubiert, wodurch ihnen Wasser entzogen wird. Das DMSO wurde während dieser Zeit 2 x gewechselt. Anschließend wurden die Gele ü.N. in 20 % PPO/DMSO leicht geschwenkt. Das in die Gele diffundierte PPO wurde durch Wässern des Gels ausgefällt. Die Trocknung der Gele zwischen Cellophan-Folien erfolgte für 2 Stunden in einem Gelrockner. Auf die getrockneten Gele wurden Röntgenfilme aufgelegt und bis zur Entwicklung (1 bis 10 Tage) bei -80 °C gelagert.

2.3.15 Crosslink von CLN6

Proteine können durch chemische Crosslinker kovalent vernetzt werden. Diese Verknüpfung erfolgt bei geeigneten Bedingungen nur innerhalb bereits vorhandener Proteinkomplexe. Nicht-kovalente Wechselwirkungen werden auf diese Weise durch kovalente Bindung ersetzt, und sind somit leichter nachweisbar. Der Crosslinker BS³ gehört zu den N-Hydroxysuccinimid-Estern und kann mit primären Aminen reagieren und stabile Amidbindungen bilden. Die reaktiven Gruppen sind durch einen nur 11.4 Å langen Spacer miteinander verbunden. Die Quervernetzbarkeit ist somit ein Merkmal für räumliche Nähe.

Bindungspuffer	HEPES (pH 7,6)	0,1 M
	NaCl	120 mM
	MgSO ₄	1,8 mM
	KCl	5 mM
	Glukose	8 mM
	Saponin	0,25 %
	Triton X-100	1 %

Um die Dimersierung von Wildtyp-CLN6 und mutierten CLN6-Proteinen zu untersuchen, wurden transfizierte BHK-Zellen 3 x mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden durch eine 2-minütige Zentrifugation von 1000 x g bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl Bindungspuffer resuspendiert und nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wiederum 10 min bei 4 °C und 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zu einem Ansatz wurden 500 µM des *Crosslinkers* BS³ gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet der *Crosslinker* an Proteine und kann diese kovalent vernetzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 M Tris/HCl (pH 7,4) gestoppt, da die primären Amine von Tris die *Crosslinker*-Bindung an Proteine blockieren. Anschließend wurden die Proben in einem SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit dem *Bio-Rad Protein Assay*, der auf dem Prinzip der Bradford-Färbemethode basiert, bestimmt.

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

Sammelgel	Acrylamid	4 %
	Tris/HCl (pH 6,8)	0,1 M
	SDS	0,1 %
	APS	0,1 %
	TEMED	0,1 %
Trenngel	Acrylamid	12,5 %
	Tris/HCl (pH 8,8)	0,375 M
	SDS	0,1 %
	APS	0,016 %
	TEMED	0,08 %
Solubilisierungspuffer (2 x)	Tris/HCl (pH 6,8)	250 mM
	SDS	2 %
	Glycerin	20 %
	Coomassie® Blue G	
Bei reduzierendem Puffer:	DTT	20 mM
Anodenpuffer	Tris/HCl, pH 8,6	25 mM
	Glycin	192 mM
Kathodenpuffer	Tris/HCl, pH 8,6	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

Proteine wurden nach ihrer Größe durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Auftrennung in großen Gelen erfolgte bei RT und 55 mA/Gel für ca. 2 h. Minigele liefen für 15 min zunächst bei 80 Volt bis die Lauffront die Grenze zum Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde die Spannung für weitere 45 min auf 180 Volt erhöht.

2.4.3 Western-Blot-Analyse

Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
Blockpuffer	1 x PBS (10 mM)	
	Tween 20	0,1 %
	Milchpulver	5 %
Waschpuffer	1 x PBS (10 mM)	
	Tween 20	0,1 %
<i>Enhanced Chemilumineszenz (ECL)</i>		
Lösung 1	Luminol	2,7 mM
	p-Cumarinsäure	0,44 mM
	Tris/HCl (pH 8,5)	111 mM
	H ₂ O	x ml (ad 5 ml)
Lösung 2	30 % H ₂ O ₂	10 µl
	Tris/HCl (pH 8,5)	0,1 mM
	H ₂ O	x ml (ad 5 ml)

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der Transfer von Proteinen aus großen Gelen auf Nitrocellulosemembran wurde für 2 h bei 900 mA in einer Elektroblot-Apparatur durchgeführt. Minigele wurden für 1 h bei 400 mA geblottet.

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran zum Absättigen unspezifischer Bindungen 1 h in Blockpuffer geschwenkt. Der Primärantikörper wurde in Blockpuffer entsprechend verdünnt (siehe 2.1.11) und entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Danach wurde 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen und die Membran anschließend für 1 h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (in Blockpuffer verdünnt) bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 3 x 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion der Banden wurden die Lösung 1 und Lösung 2 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Die Signale wurden entweder mit einem Röntgenfilm oder mit der ChemiDoc detektiert.

2.4.3.1 Detektion Mannose-6-Phosphat markierter Proteine

Lösliche lysosomale Proteine werden nach der Synthese mit einem Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rest versehen. Dies ermöglicht die Bindung an M6P-Rezeptoren und den Transport ins Lysosom. Die Detektion dieser markierten Proteine ermöglicht ein *Single Chain*-Antikörper, der spezifisch M6P-Reste erkennt. Der Antikörper wiederum lässt sich über einen fusionierten *myc-Tag* nachweisen.

Die Durchführung entsprach mit einigen Besonderheiten der für Western Blot-Analysen: Für den Block- und Waschpuffer wurden TBS anstatt PBS verwendet. Zudem erfolgte die Detektion über 3 Antikörper. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit dem in Blockpuffer verdünnten anti M6P-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x mit Waschpuffer gewaschen und dann 1 h bei RT mit einem polyklonalen anti myc-Antikörper inkubiert. Es folgten wieder 3 Waschschrte und die Inkubation mit einem anti Kaninchen-HRP-Antikörper. Nachdem die Membran gewaschen wurde, folgte die Entwicklung über ECL.

2.4.4 Quantifizierung des Phosphatidylinositolphosphates PI(3,4,5)P3

Die Untersuchungen des Phosphatidylinositolphosphates PI(3,4,5)P3 in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen und Astrozyten sowie in HeLa-Zellen, die mit Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfiziert waren, erfolgte in dieser Arbeit zum einen über indirekte Immunfluoreszenz-Analysen (IFA) mit einem spezifischen monoklonalen anti PI(3,4,5)P3-Antikörper und zum anderen unter Verwendung des PIP3-Mass-Strip-Kit der Firma Echelon.

Alle Zentrifugationsschritte wurden für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in 0,5 M TCA abgeschabt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde 2 x mit TCA/EDTA (0,5 % TCA, 1 mM EDTA) gewaschen. Zwischen den Waschschrten wurden die Zellen abzentrifugiert. Die neutralen Lipide wurden Zugabe von 3 ml MeOH: CHCl₃ (2:1) und Inkubation für 10 min bei RT extrahiert. Danach wurde zentrifugiert und die Extraktion wiederholt. Die Überstände enthielten die neutralen Lipide und wurden nicht weiter benötigt. Die Pellets wurden mit 2.25 ml CHCl₃: MeOH: HCl (12 M) (80:40:1) für 15 min bei RT inkubiert um die

sauren Lipide zu extrahieren. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände in ein neues 15 ml Falcon überführt und mit 0,75 ml CHCl_3 gemischt bevor 1,35 ml HCl (0.1 M) hinzugegeben wurden. Die Proben wurden mit einem Vortex geschüttelt, bis sich zwei Phasen bildeten. Danach wurde zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde mit einer Spritze abgezogen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in der Speed Vac unter Vakuum getrocknet.

Die getrockneten Lipide wurde in 5 μl CHCl_3 : MeOH: H_2O (1:2:0,8) gelöst und 3 x 30 sec im Eiswasserbad mit Ultraschall behandelt. Die gesamte Probe wurde auf die PIP3-Mass-Membran des Kits gespottet und die Detektion des Lipids nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Nachweis erfolgte dabei über ein Detektorprotein, das spezifisch an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ bindet. Das Detektorprotein wird über einen Primär- und Sekundärantikörper nachgewiesen und die Membran wird mit ECL entwickelt.

3. Ergebnisse

Alle bekannten Formen der Neuronalen Ceroid-Lipofuszinose zeichnen sich durch das Auftreten lysosomalen Speichermaterials aus. Die von den betroffenen Genen kodierten Proteine sind in der Zelle unterschiedlich lokalisiert. Im Fall von CLN6 stellt sich somit die Frage, wie ein ER-residentes Protein die Funktion der Lysosomen beeinflusst. Deshalb wurde zum einen die Stabilität, Dimerisierung und Lokalisation von krankheitsrelevanten CLN6-Mutanten untersucht. Ein anderer Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Analyse von Mechanismen der Endozytose und des Transports lysosomaler Enzyme in murinen CLN6-defekten Neuronen und Astrozyten, und in CLN6 siRNA behandelten Zellen.

3.1 Untersuchung von CLN6-Mutanten

3.1.1 Expressionsanalyse und Dimerisierung verschiedener CLN6-Mutanten

Um den Einfluss verschiedener krankheitsverursachender Mutationen auf die Stabilität des CLN6 Proteins zu untersuchen, wurden BHK-Zellen mit cDNAs transient transfiziert, die entweder das Wildtyp oder drei mutierte CLN6-Proteine codieren. Bei der ersten Mutante wurde Aminosäure Glycin123, das sich in der dritten Transmembrandomäne von CLN6 befindet, durch Asparaginsäure ersetzt (p.G123D). Eine Deletion von drei Nukleotiden (c.460-462delATC) führt in der zweiten Mutante zum Verlust des Isoleucins154 in der zweiten luminalen Schleife (p.I154del) (Abb. 3.1 A). Durch die Insertion eines Nukleotids (c.316insC) kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, wodurch das Arginin106 durch Prolin ersetzt wird und es im Weiteren zur Synthese von 25 neuen Aminosäuren kommt, bevor ein frühzeitiges Stop-Codon die Translation beendet (p.R106PfsX26) (Abb. 3.1 A). Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h geerntet und die Lysate im Western Blot analysiert. Im Fall des Wildtyp-Proteins und der Mutanten p.I154del und p.G123D zeigt sich eine dominante ca. 32 kDa Bande, die in untransfizierten Zellen nicht sichtbar ist (Abb. 3.1 B). Die beiden kleineren immunreaktiven Banden (26 und 22 kDa)

könnten Abbauprodukte von CLN6 darstellen. Auch die Mutante p.R106PfsX26 ist als verkürztes Protein mit einer molekularen Masse von 14 kDa detektierbar (Abb. 3.1 B).

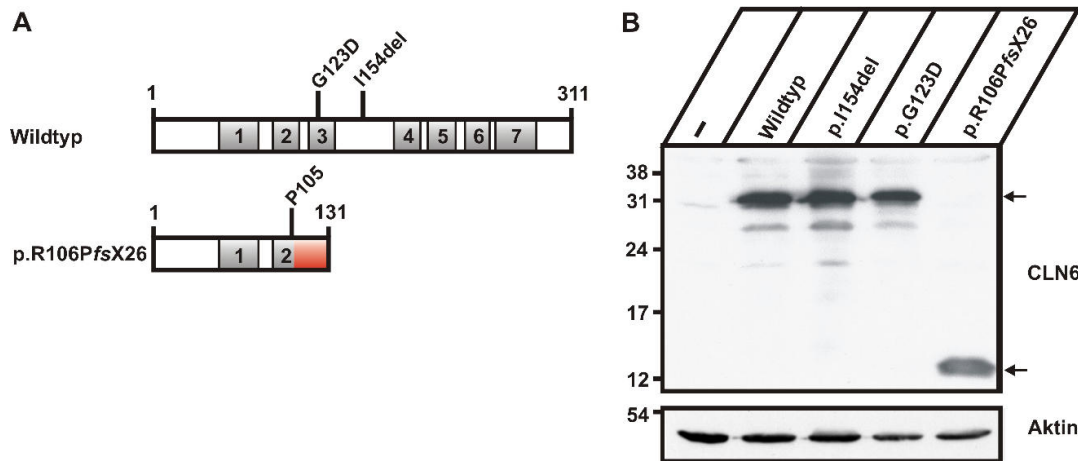


Abb. 3.1: Expressionsanalysen von Wildtyp- und mutantern CLN6. (A) Schematische Darstellung des Wildtyp-CLN6, das aus 311 Aminosäuren besteht und sieben Transmembrandomänen aufweist (grau). Die Position der mutierten Aminosäuren ist gekennzeichnet (G123 und I154). Die Mutation c.316insC resultiert in einer Verschiebung des Leserasters, durch die ein verkürztes Protein mit 25 neuen Aminosäuren synthetisiert wird (rot). (B) Western Blot-Analyse des Wildtyp-CLN6 und der drei CLN6-Mutanten. Transfizierte BHK Zellen wurden mit untransfizierten Zellen im CLN6-Western Blot verglichen. Die Position der CLN6-immunreaktiven Banden ist durch Pfeile markiert. Der β -Aktin Blot zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden. Es wurde der Einbuchstabencode für Aminosäuren verwendet.

CLN6 liegt in Membranen als 64 kDa Dimer vor. Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit zur Bildung von Dimeren durch die verschiedenen Mutationen verändert wird, wurden Crosslink-Experimente mit dem nicht spaltbaren Quervernetzer BS³ durchgeführt. Da die Quervernetzbarkeit ein Kriterium für räumliche Nachbarschaft ist, lassen sich Crosslinker zur Aufklärung der Struktur von biologischen Makromolekülen einsetzen. BHK Zellen wurden mit der cDNA von Wildtyp- oder mutiertem CLN6 für 24 h transfiziert, anschließend geerntet und lysiert. Ein Teil eines Lysate wurde mit BS³ inkubiert und im CLN6-Western Blot jeweils mit dem unbehandelten Lysat verglichen (Abb. 3.2).

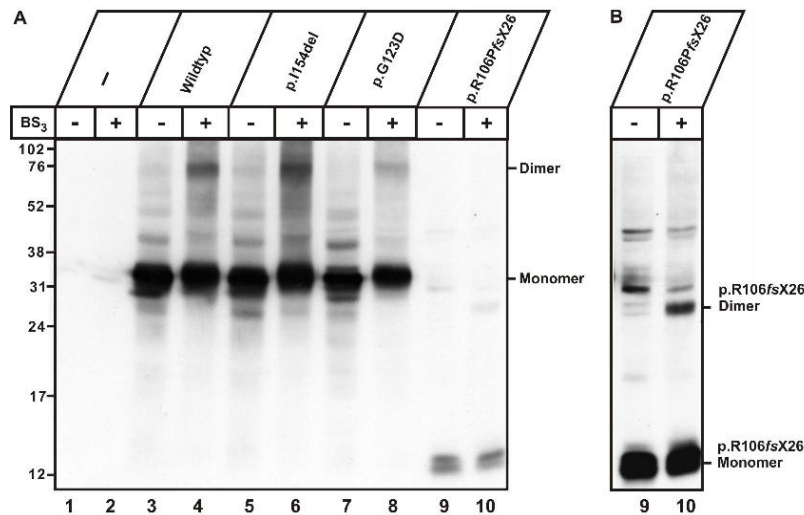


Abb. 3.2: Dimerisierung von Wildtyp- und mutantern CLN6. (A) Homogenate von transfizierten BHK-Zellen wurden in An- (+) und Abwesenheit (-) des *Crosslinker* BS³ inkubiert. Im CLN6-Western Blot konnten bei allen CLN6-Proteinen Dimere nachgewiesen werden (Bahnen 4,6,8). (B) Aufgrund der niedrigen Expression der Mutante p.R106PfsX26 musste eine 10-fach längere Expositionszeit gewählt werden. Die Identität der übrigen immunreaktiven Polypeptide ist unbekannt.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten CLN6-Mutanten zur Dimerisierung fähig sind. Sowohl die Wildtyp-Proteine als auch die Mutanten CLN6 p.I154del und CLN6 p.G123D bilden Dimere mit einer Größe 64 kDa. Da die Expression der Mutante p.R106PfsX26 deutlich schwächer war, musste eine längere Expositionszeit gewählt werden, um die 28 kDa dimere Form sichtbar zu machen.

3.1.2 Die CLN6-Mutanten weisen eine verringerte Stabilität auf.

Western Blot-Analysen zeigten, dass die Mutante p.R106PfsX26 eine stark verringerte Expression aufwies. Um die Stabilität der Mutanten zu untersuchen, wurden BHK-Zellen, die CLN6 oder eine der CLN6-Mutanten exprimieren, für 2 h mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert. Nach diesem *Pulse* wurde ein Teil der Zellen geerntet, während der andere Teil bis zu 24 h mit nicht-radioaktivem Medium weiter inkubiert wurde (*Chase*). CLN6 wurde anschließend immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert (Abb. 3.3 A).

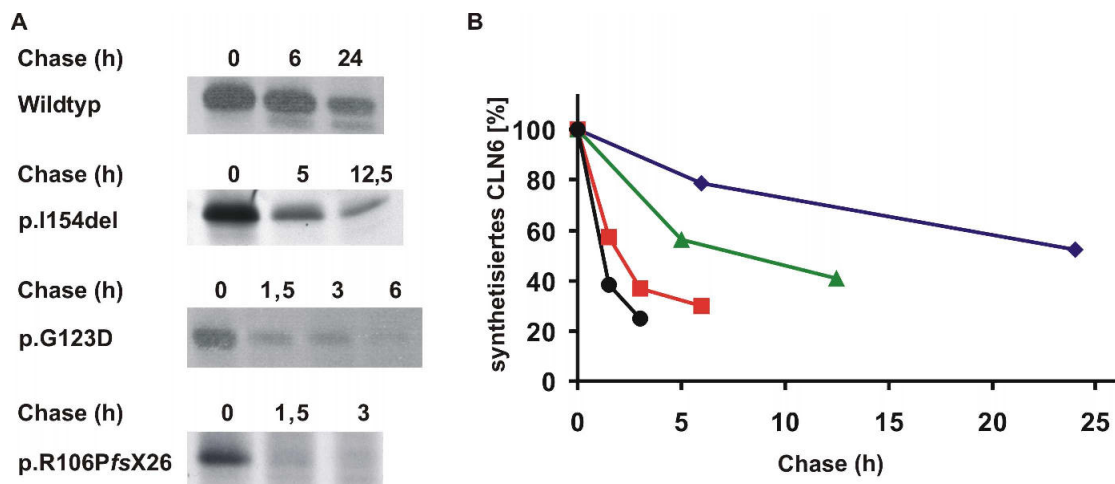


Abb. 3.3: Bestimmung der Halblebenszeiten von Wildtyp- und mutiertem CLN6. (A) BHK-Zellen, die entweder mit Wildtyp-CLN6 oder mutierter CLN6 cDNA transfiziert wurden, wurden 2h mit [³⁵S]-Methionin (150 µCi/ml) markiert und anschließend geerntet (Zeitpunkt 0 h) oder unterschiedlich lange mit nicht-radioaktivem Medium, das einen 150-fachen Überschuss an Methionin enthielt inkubiert (*Chase*). CLN6 wurde immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Dargestellt sind repräsentative Fluorogramme von zwei bis drei Experimenten. (B) Die Intensitäten der CLN6-Banden wurden durch Densitometrie quantifiziert und der Wert direkt nach dem *Pulse* als 100 % gesetzt. ■, Wildtyp; ▲, p.I154del; ■, p.G123D; ●, p.R106PfsX26

Nach densitometrischer Auswertung wurden die mittleren Halblebenszeiten berechnet. Diese beträgt beim Wildtyp-CLN6 etwa 26 h, während sie bei den Mutanten deutlich reduziert ist. Die stabilste Mutante, mit einer Halblebenszeit von ca. 10 h, ist p.I154del (Abb. 3.3 B). Bei den Mutanten p.G123D und p.R106PfsX26 hingegen ist die Hälfte des synthetisierten Proteins bereits nach 3 bzw. 1,5 h abgebaut.

3.1.3 Inhibition des Proteasoms verhindert den Abbau der CLN6-Mutanten p.G123D und p.R106fsX26

Alle untersuchten CLN6-Mutanten weisen eine stark reduzierte Halblebenszeit auf, die für einen vermehrten Abbau dieser Proteine in der Zelle spricht. Daher wurden Protease-Inhibitionsexperimente durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation des Abbaus zu identifizieren. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion der BHK-Zellen mit den entsprechenden CLN6-Konstrukten, erfolgte eine 16-stündige Inkubation mit dem Proteasomen-Inhibitor Lactacystin oder mit einer Kombination der lysosomalen Protease-Inhibitoren E64 und Pepstatin A. Als Kontrolle dienten Zellen, die während der 16 h keinen Inhibitor erhalten haben. Die Zelllysate wurde im SDS-PAGE aufgetrennt und im CLN6-

Western Blot analysiert (Abb. 3.4 A). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch, wobei die Signalstärke der unbehandelten Zellen als 1 gesetzt wurde (Abb. 3.4 B).

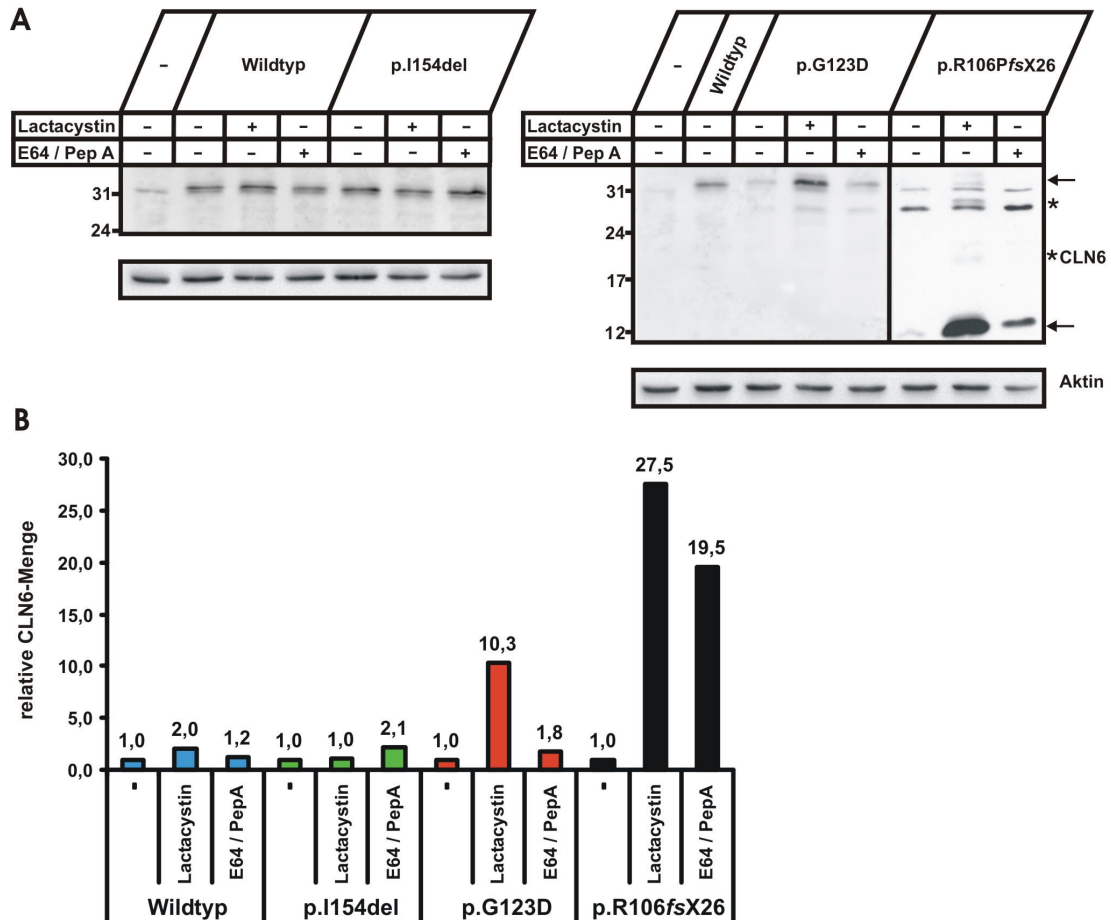


Abb. 3.4: Lactacystin inhibiert die Degradation der CLN6 Mutanten p.G123D und p.R106PfsX26. (A) CLN6 Western Blot. BHK-Zellen wurden für 24 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 16 h in An-oder Abwesenheit der lysosomalen Protease-Inhibitoren E64 (30 μ M) und Pepstatin A (100 μ M) oder des Proteasomen-Inhibitors Lactacystin (5 μ M) inkubiert und im CLN6-Western Blot analysiert. Für die Darstellung der Mutante p.R106PfsX26 wurde eine 6-fach längere Belichtungszeit gewählt. Als Ladekontrolle dient β -Aktin. Die Positionen der CLN6-Proteine sind mit Pfeilen markiert. Die Identität der mit (*) gekennzeichneten Banden ist unbekannt. (B) Densitometrische Auswertung des Western Blots. Die zur Ladekontrolle relativierte Intensität der jeweils unbehandelten transfizierten Zellen wurde als 1 gesetzt.

Die Protease-Inhibitoren E64 und Pepstatin A können nur den Abbau der Mutante p.R106PfsX26 effizient inhibieren (19,5-fache Erhöhung). Sowohl die Menge des Wildtyp-CLN6, als auch die Menge der Mutanten p.I154del und p.G123D wird von diesen Substanzen nur schwach beeinflusst (maximal 2,1-fache Erhöhung). Der Proteasomen-Inhibitor Lactacystin ist hingegen wesentlich wirkungsvoller. Er bewirkt im Vergleich mit den unbehandelten Zellen eine massive Akkumulation der CLN6-Mutanten p.G123D (10,3-fach)

und p.R106fsX26 (27,5-fach). Dieses Experiment zeigt, dass der Abbauort von der Mutationsart beeinflusst wird und sowohl proteasomal als auch lysosomal erfolgen kann.

3.1.4 Die CLN6-Mutante p.R106PfsX26 zeigt nur eine partielle Colokalisation mit dem ER

Die beschriebenen Mutationen im CLN6-Protein könnten neben der Stabilität auch die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen.

Da bereits im Vorfeld gezeigt werden konnte, dass sich sowohl CLN6 p.I154del als auch CLN6 p.G123D im endoplasmatischen Retikulum befinden (Claudia Heine publiziert in (Kurze et al 2010), wurde im Weiteren nur die Lokalisation von CLN6 p.R106PfsX26 untersucht. Zunächst sollte eine Differentialzentrifugation Auskunft darüber geben, ob die C-terminal verkürzte CLN6-Mutante in Membranen integriert wird, oder ob es cytoplasmatisch vorliegt, wofür der Abbau durch das Proteasom spricht.

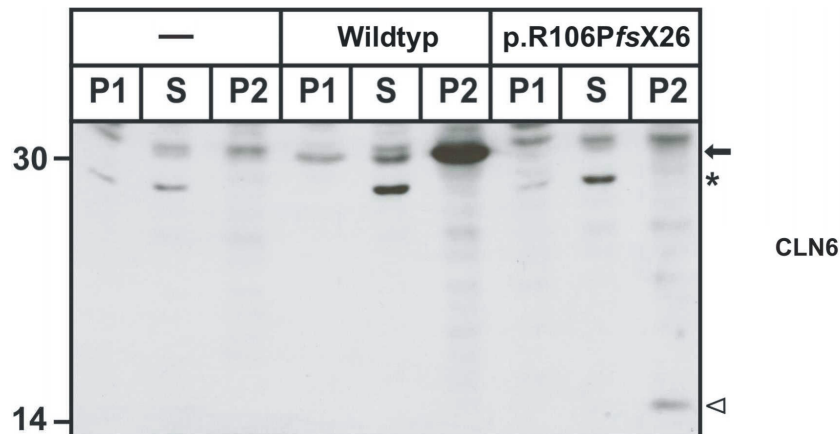


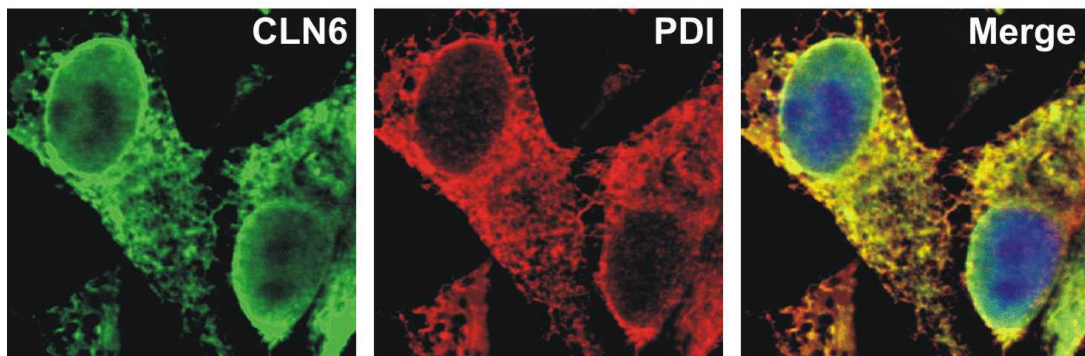
Abb. 3.5: Die verkürzte Mutante p.R106PfsX26 wird in Membranen integriert. Aus BHK-Zellen, die CLN6-Wildtyp oder CLN6 p.R106PfsX26 exprimieren wurden Homogenate hergestellt. Die Zellkerne (P1), das Cytoplasma (S) und Membranen (P2) wurden über verschiedene Zentrifugationschritten voneinander getrennt. Der Pfeil und das weiße Dreieck markieren das Wildtyp-CLN6 bzw. CLN6 p.R106PfsX26. Die Identität der mit (*) markierten Bande und der übrigen Banden ist unklar.

Hierfür wurden BHK Zellen, die CLN6-Wildtyp oder CLN6 p.R106PfsX26 exprimieren nach 24 h geerntet. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte, ohne Zusatz von Detergenzien. Durch Zentrifugieren bei 3000 rpm für 10 min wurden zunächst die Zellkerne entfernt (P1). Mit der anschließenden Zentrifugation des Überstands bei 100.000 x g ließ sich eine Membranfraktion (P2) vom Cytosol

(S) trennen. Die Proteine wurden aus dem Membranpellet durch Zugabe eines detergentenhaltigen Lysis-puffers extrahiert und im CLN6-Western Blot analysiert (Abb. 3.5). Wildtyp-CLN6 als auch die CLN6-Mutante p.R106PfsX26 sind vollständig im Membranpellet detektierbar. Das Wildtyp-Protein ist als 30 kDa dominante Bande im Pellet 2 sichtbar, während das Signal der verkürzten, 14 kDa Mutante eine deutlich geringere Intensität aufweist. In untransfizierten Zellen fehlen die entsprechenden Banden. Die Identität der übrigen detektierten Banden, insbesondere der mit (*) markierten Bande, ist unklar (Abb. 3.5).

CLN6 p.R106PfsX26 ist instabil, aber offensichtlich noch fähig in Membranen zu integrieren. Um eine genauere Aussage über die Lokalisation treffen zu können, wurden Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopien von transfizierten BHK-Zellen durchgeführt (Abb. 3.6). Das Wildtyp-Protein zeigt eine nahezu vollständige Colokalisation mit dem ER-Marker Protein Disulfid Isomerase (PDI). Die Mutante hingegen ist nur partiell im ER nachweisbar und zeigt zusätzlich teilweise eine Überlagerung mit EEA1, einem Marker der frühen Endosomen. Die Färbung wirkt jedoch diffuser als die des Wildtyps und lässt vermuten, dass ein Teil cytoplasmatisch vorliegt. Weder das mutierte- noch das Wildtyp-CLN6 colokalisieren mit GM130, einem Markerprotein des *cis*-Golgi-Netzwerks.

Wildtyp



p.R106PfsX26

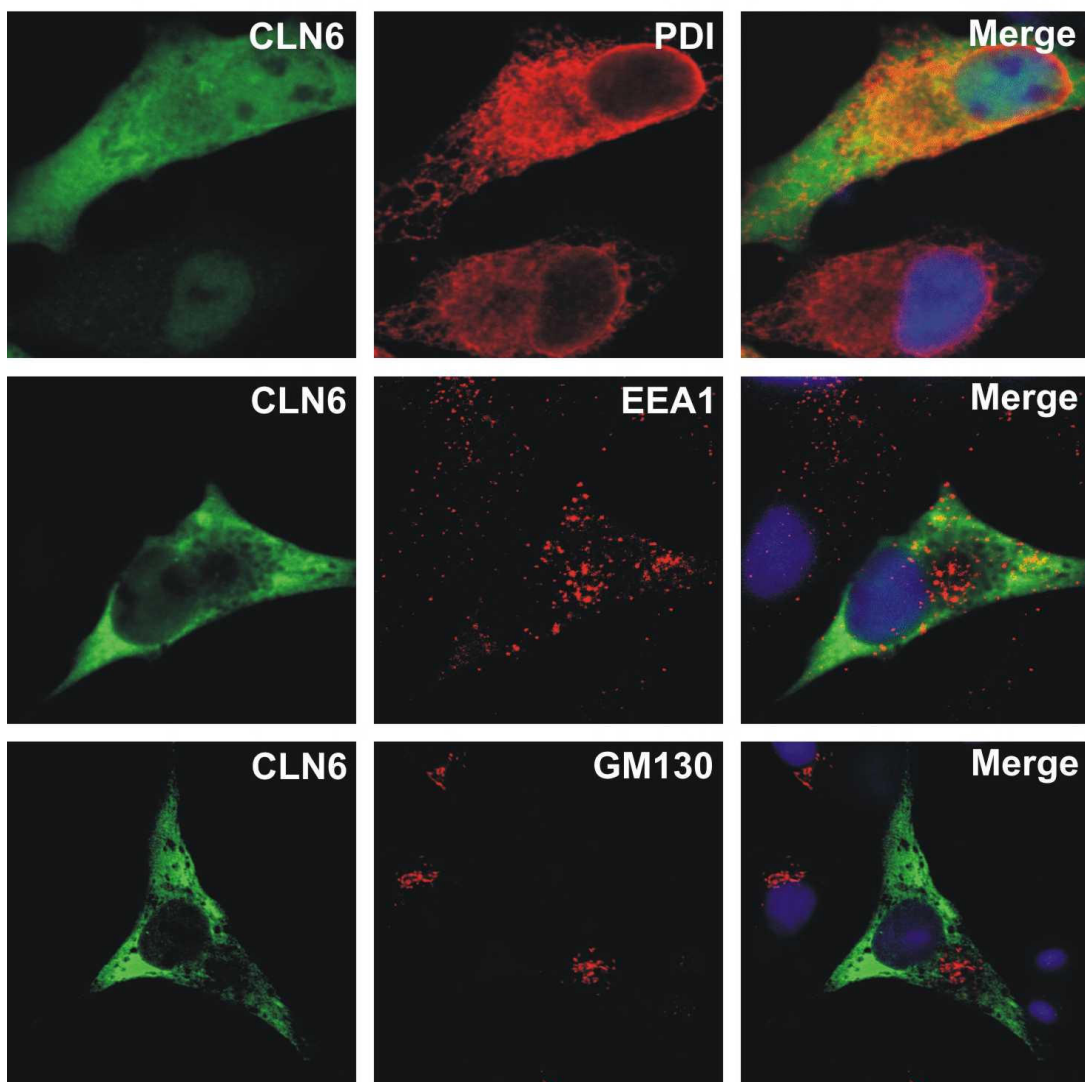


Abb. 3.6: Die CLN6-Mutante p.R106PfsX26 zeigt eine partielle Colokalisation mit dem ER und frühen Endosomen. BHK-Zellen wurden transient mit cDNAs des Wildtyps oder der Mutante p.R106PfsX26 transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den Primärantikörpern CLN6 (grün), PDI (rot), EEA1 (rot) und GM130 (rot) und entsprechend Zweitantikörpern inkubiert. Die Überlagerung der Bilder ist jeweils rechts dargestellt. Gelb gibt die Colokalisation an.

3.2 Untersuchung der Endozytosemechanismen

Bisherige Versuche lysosomale Dysfunktionen, die auf Defekte im ER-residenten Membranproteine CLN6 zurückzuführen sind, zu erklären, beschränkten sich auf Untersuchungen zum Transport der neusynthetisierten lysosomaler Protease Cathepsin D und auf die Endozytose der lysosomalen Arylsulfatase A (ASA) in CLN6-defekten Fibroblasten (Heine et al 2004). Der Transport von Cathepsin D und die Enzymaktivitäten der lysosomalen β -Hexosaminidase und von ASA, waren unverändert im Vergleich zu gesunden Zellen. Auch die vergleichende Proteomanalyse lysosomaler Proteine aus Hirnbiopsien eines CLN6-Patienten mit denen von gesunden Kontrollen zeigte keine Unterschiede (Sohar et al 1999). Nur die Menge an endozytierter [125 I]-ASA in CLN6-defekten Fibroblasten war erhöht, was hauptsächlich auf reduzierten lysosomalen Abbau zurückzuführen war (Heine et al 2004). Aus anderen Experimenten an CLN3-defekten Fibroblasten kann geschlossen werden, dass dieser Transportweg empfindlich für Defekte in NCL-Proteinen ist und soll deshalb detaillierter an neuronalen Zellen von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen untersucht werden. Zusätzlich wurden die Folgen verminderter CLN6-Expression auf die Endozytose von Liganden in HeLa-Zellen untersucht.

3.2.1 Etablierung des CLN6 Knock-downs in HeLa-Zellen

Fibroblasten von CLN6-Patienten eignen sich nicht für bestimmte biochemische Untersuchungsmethoden, weil sie genetisch nicht einheitlich sind und mit längerer Kultivierungszeit und erhöhter Passagenzahl sekundären Veränderungen erliegen. Primäre kultivierte Neuronen aus Kontroll- und CLN6-defizienten Mäusen (*nclf*) stellen einen hohen experimentellen Aufwand dar, der sich aus der Präparation neugeborener Tiere und aus der längeren Zeit der Kultivierung bzw Differenzierung der Neurone ergibt. Als Methode der Wahl, um akute Defekte eines Gen-/Genprodukt-Verlustes auf zelluläre, biochemische Prozesse zu messen, hat sich der siRNA-vermittelte *Knock-down* eines Gens von Interesse in HeLa-Zellen erwiesen.

Daher wurde der *CLN6-Knock-down* mittels siRNA in HeLa-Zellen etabliert. Dazu wurde zunächst 3 verschiedene *CLN6* siRNAs getestet. Die Zellen wurden auf 60 mm Zellkulturschalen kultiviert und mit jeweils 160 pmol siRNA

transfiziert. 48 h nach der ersten Transfektion wurde ein zweites Mal transfiziert und die Zellen wurden nach weiteren 48 h Stunden für Expressionsanalysen durch Real-Time PCR geerntet. Als Kontrolle dienten HeLa-Zellen, die nach dem gleichen Schema mit einer Kontroll siRNA transfiziert wurden.

Die CLN6-Expression verringerte sich durch Transfektion mit jeweiligen siRNAs auf 50, 32 und 17 %. Aufgrund der Effizienz wurden alle weiteren Untersuchungen mit siRNA#3 durchgeführt. Abbildung 3.7 zeigt die CLN6-Expression nach Transfektion mit siRNA#3 oder Kontroll siRNA im Vergleich zu untransfizierten Zellen auf mRNA- und Proteinebene. Die herunterregulierte mRNA Menge von 15 % (Abb.3.7 A) zeigt sich auch im reduzierten CLN6-Proteingehalt der Zellen (Abb. 3.7 B).

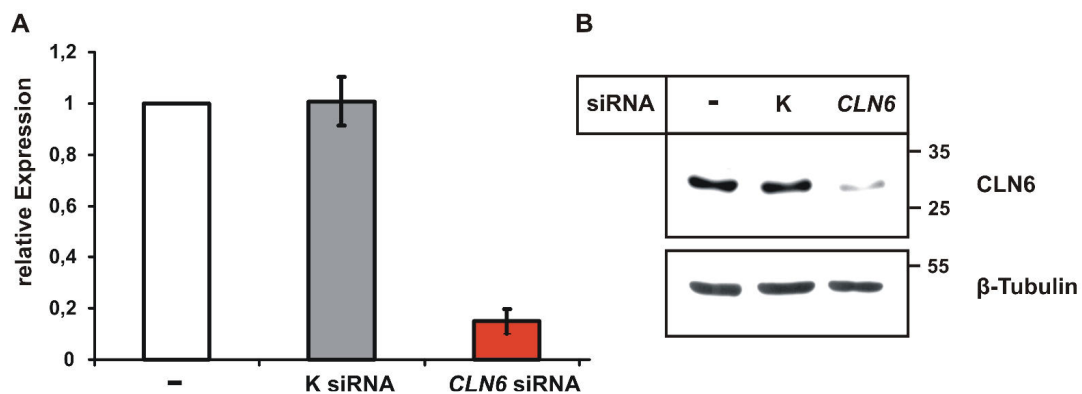


Abb. 3.7: Relative CLN6-Expression in HeLa Zellen nach Transfektion mit CLN6 siRNA#3. (A) Die Genexpression von CLN6 in untransfizierten HeLa-Zellen (-) und in Kontroll- oder CLN6 siRNA transfizierten HeLa Zellen wurde mittels Real-Time PCR als Dreifachwert bestimmt. Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Expression von β -Aktin. Das Diagramm zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen RNA-Isolationen. Die Expression der untransfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. (B) CLN6-Western Blot: Die Zellextrakte wurden durch SDS-PAGE separiert und im CLN6-Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle dient β -Tubulin.

3.2.2 Untersuchung der Endozytose von Transferrin in HeLa Zellen mit verminderter CLN6-Expression und in nclf-Neuronen

Zunächst wurde die Internalisierung von Transferrin als Beispiel für die Adaptorprotein AP2-vermittelte, rezeptorabhängige Endozytose untersucht. Das mit Eisen beladene Transferrin (Holo-Transferrin) bindet hierbei an den Transferrin-Rezeptor und wird zu den frühen Endosomen transportiert. Dort dissoziiert das gebundene Eisen, während das eisenfreie Transferrin (Apo-

Transferrin) zusammen mit dem Rezeptor zurück zur Plasmamembran befördert wird, wo es vom Rezeptor entlassen wird.

Um zu untersuchen, ob ein Verlust oder eine Verringerung der CLN6-Proteinmenge einen Einfluss auf die Transferrin-Endozytose hat, wurden mit Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfizierte HeLa Zellen zunächst für 10 min mit Alexa546-Transferrin-haltigem Medium inkubiert und anschließend gewaschen und fixiert. Die Analyse der intrazellulären Fluoreszenz-Intensität erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

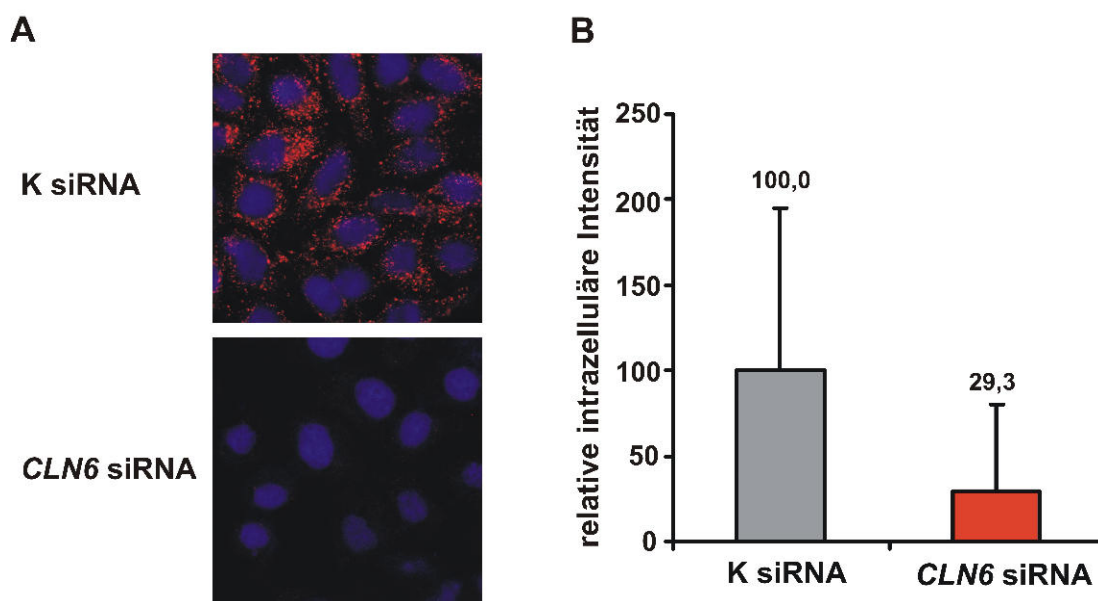


Abb. 3.8: Verminderte Endozytose von Transferrin in mit *CLN6* siRNA behandelten HeLa-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden für 10 min in Medium mit 20 µg/ml Alexa-546-Transferrin inkubiert. (A) Fluoreszenz-Mikroskopie des internalisierten Transferrins (B) Quantifizierung der intrazellulären Intensität: Es wurde die Intensität von 142 Kontroll-Zellen und 75 HeLa transfiziert mit *CLN6* siRNA mit Hilfe der Software Metamorph ausgewertet. Die Balken repräsentieren den Median ± Standardabweichung. $p = 7,2 \times 10^{-9}$

Das internalisierte Transferrin ist in HeLa Zellen in kleinen vesikulären Strukturen lokalisiert, die in der gesamten Zelle verteilt sind (Abb. 3.8 A). Die Menge des aufgenommenen Transferrins ist nach *CLN6* siRNA Transfektion, gegenüber den Kontrollzellen, um 70 % reduziert (Abb. 3.8 B). Das gleiche Experiment wurde an kultivierten Neuronen wiederholt. Dazu wurden neuronale Zellen aus P0-Tieren von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen isoliert und für 2 Wochen auf Glasplättchen kultiviert. Für den Endozytoseassay wurde das Medium durch Alexa546-Transferrin-haltiges Medium ersetzt und die Zellen damit für 10 und 20 min inkubiert.

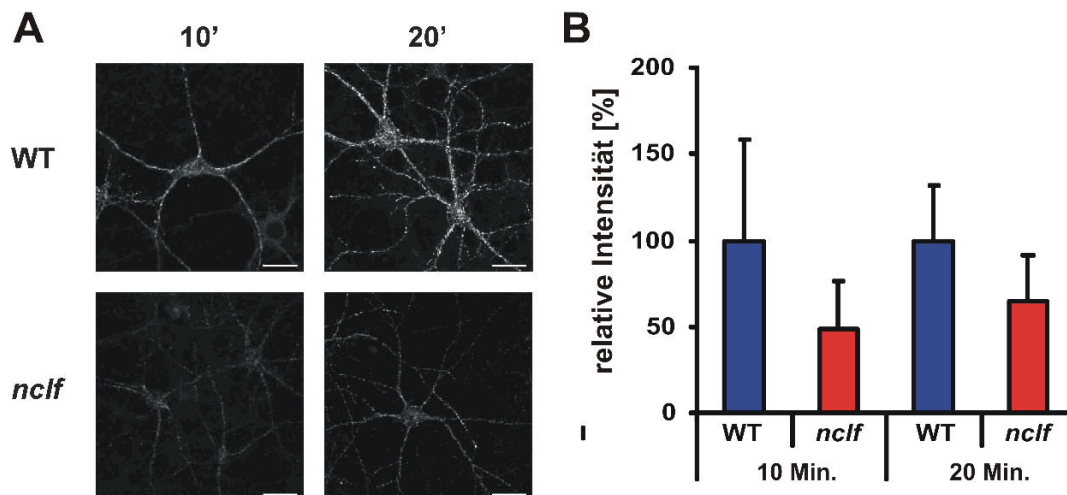


Abb. 3.9: Reduzierte Alexa546-Transferrin-Aufnahme in *nclf*-Neuronen. Wildtyp- und *nclf* Neuronen für 10 min und 20 min in Medium inkubiert, das mit 20 µg/ml Alexa-546-Transferrin versetzt war. (A) Fluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen des internalisierten Transferrins (B) Quantifizierung der intrazellulären Fluoreszenz-Intensität: Für die Auswertung nach 10 min Endozytose wurden 18 Wildtyp- und 20 *nclf*-Neuronen, für die Auswertung nach 20 min wurden 18 Wildtyp- und 18 *nclf*-Neuronen mit der Software Metamorph ausgewertet: Die Balken repräsentieren den Median ± Standardabweichung. $P(10 \text{ min}) = 0,0032$, $p(20 \text{ min}) = 0,024$

Die Lokalisation des intrazellulären Transferrins ist in Wildtyp- und in *nclf*-Neuronen ähnlich (Abb.3.9 A). Nach 10 min ist das Transferrin bereits im gesamten Neuron verteilt. Es sind kleine vesikuläre Strukturen im Soma und in den Ausläufern erkennbar. Nach 20 min Inkubation hat die Fluoreszenz-Intensität weiter zugenommen, was zeigt, dass sich das Gleichgewicht noch nicht oder gerade eingestellt hat. In CLN6-defekten *nclf*-Neuronen war die Endozytoserate von Alexa546-Transferrin deutlich vermindert (Abb. 3.9 B). Sowohl nach 10, als auch nach 20 min betrug die aufgenommene Menge Alexa546-Transferrins in *nclf*-Neuronen 49 % bzw. 63 % der Transferrinaufnahme in Wildtyp-Neuronen.

3.2.3 Verminderte Epsin-abhängige Endozytose von ubiquitinylierten CD4-Chimären in *nclf* Neuronen

Um zu untersuchen, ob auch Rezeptor-Internalisierungsmechanismen betroffen sind, an denen andere Adaptorproteinen beteiligt sind, wurde die Internalisierung von CD4-Rezeptor-Chimären untersucht, die über den Ubiquitin-Epsin1-vermittelten Weg internalisiert werden. Bei der Ubiquitinylierung von Proteinen entsteht eine Peptidbindung aus der Carboxygruppe des terminale Glycins im Ubiquitin und einer Amingruppe eines

Lysin-Restes des Zielproteins. Über die Lysine des Ubiquitins können weitere Ubiquitinmoleküle an ein bereits gebundenes Ubiquitin angehängt, und so eine Ubiquitinkette gebildet werden. Je nach Anzahl der verbundenen Ubiquitin-Moleküle unterscheidet man zwischen einer Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung. Abhängig davon, welcher der 7 Lysin-Reste im Ubiquitin dafür benutzt wird, entstehen unterschiedliche Verknüpfungsarten. Sind bei dieser die Moleküle durch das Lysin 48 miteinander verknüpft, wird das Zielprotein hauptsächlich dem Abbau durch das Proteasom zugeführt (Hershko & Ciechanover 1992). Verbindung durch Lysin 63 kann zum lysosomalen Abbau des Proteins führen (Barriere et al 2007). Der CD4-Rezeptor wird in Neuronen nicht exprimiert, sondern nur von Zellen des Immunsystems. Internalisierungsexperimente mit transfizierten CD4-Konstrukten mit Hilfe von CD4-Antikörpern werden somit nicht von endogen exprimierten CD4-Rezeptoren beeinflusst. Die luminale Domäne der hierfür verwendeten CD4-Rezeptor-Chimäre entspricht dem Wildtyp-CD4. Die cytosolischen C-terminalen Domäne ist jedoch mehrfach modifiziert. In dem Konstrukt CD4TI-Ub(WT) sind die Lysin-Reste der intrazellulären C-terminalen Sequenz durch Arginin ersetzt worden, um das Anhängen von Ubiquitinen zu verhindern. An den C-Terminus wurde über einen Linker ein Wildtyp-Ubiquitin fusioniert., das die weitere Ubiquitinlylierung in der Zelle ermöglicht. Das Konstrukt CD4-CC-Ub(allRG) besitzt anstatt der cytosolischen Domäne eine *Coiled-Coiled*-Domäne, die die Tetramerisierung dieser Rezeptoren erlaubt, gefolgt von einem Ubiquitin, bei dem die Lysin-Reste durch Arginin ersetzt wurden und das terminale Glycin deletiert ist. An dieses CD4-Rezeptor-Chimär können deshalb keine weiteren Ubiquitine angehängt werden.

Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung dieser CD4-Chimären hauptsächlich von dem Adaptorprotein Epsin1 abhängig ist und, dass Monoubiquitylierung kein ausreichendes Internalisierungssignal für diese CD4-Chimären darstellt (Barriere et al 2006). Ein CD4-Rezeptor-Chimär, das ein Lysin-freies Ubiquitin besitzt, wird nicht internalisiert. Erst wenn durch das Einfügen einer *Coiled-Coiled*-Domäne in diese CD4-Chimäre die Tetramerisierung der Rezeptoren, und damit auch die Zusammenlagerung von vier Lysin-freien Ubiquitinen ermöglicht wird, kann die Endozytose erfolgen.

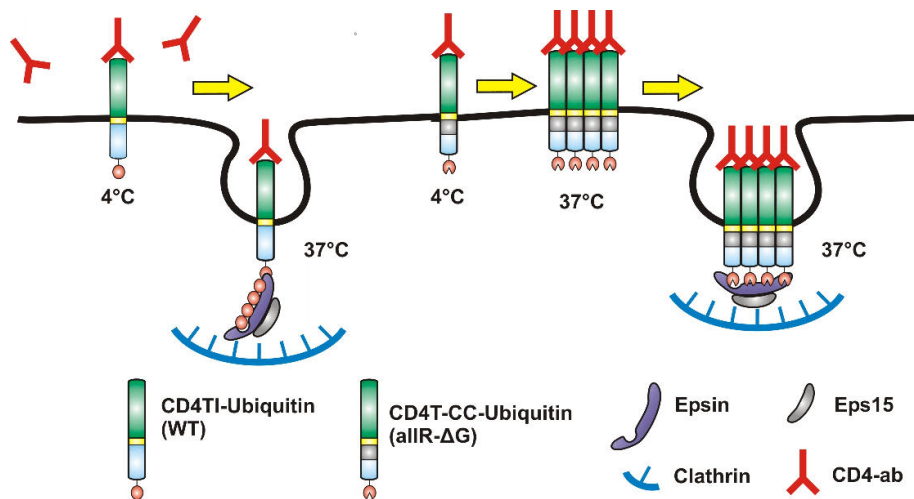


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung. Die mit den jeweiligen CD4-Konstrukten transfizierten Wildtyp und *nclf* Neuronen wurden mit einem monoklonalen CD4-Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Internalisierung erfolgte bei 37°C für 10 min. Der internalisierte CD4-Antikörper wurde mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Wildtyp- und *nclf*-Neurone wurden für 24 h mit den CD4-Konstrukten transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei 4°C mit einem monoklonalen anti-CD4-Antikörper inkubiert. Nach Entfernen ungebundener Antikörper wurden die neuronalen Zellen für 10 min in vorgewärmtem Medium bei 37°C inkubiert, um die Internalisierung der Antikörper zu ermöglichen (Abb. 3.10). Die aufgenommenen Antikörper wurden mit Cy3-markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen und mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie detektiert.

Die Endozytose der ubiquitinylierten CD4-Chimären ist in den *nclf*-Neuronen stark reduziert (Abb. 3.9 A+B), während die Verteilung der internalisierten CD4-Rezeptoren ähnlich ist. *Nclf*-Neurone internalisieren über 70% weniger CD4TI-Ub(WT)-Rezeptoren. Die Endozytoserate des Konstrukts CD4-CC-Ub(allRG) ist um 50% verringert.

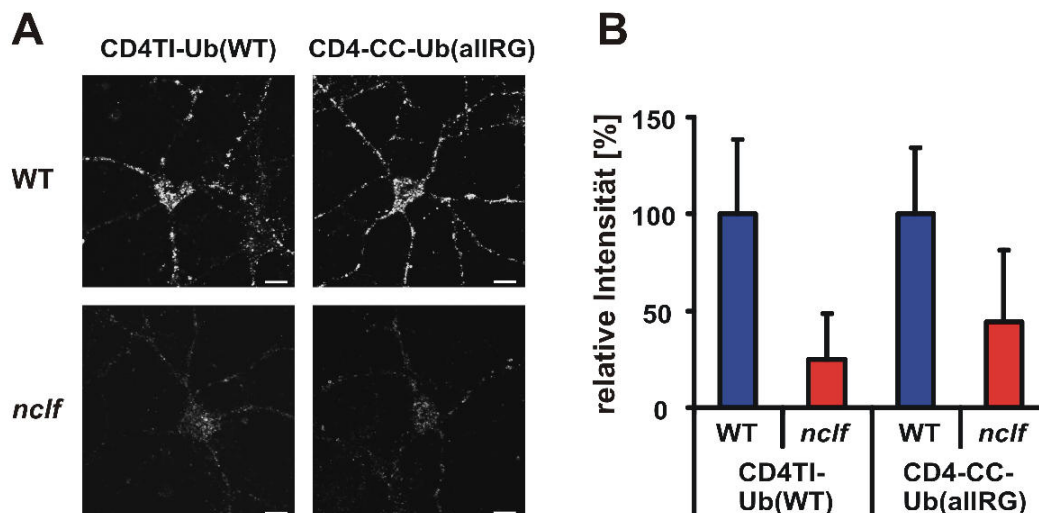


Abb. 3.11: Endozytose von CD4-Chimären in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen. Wildtyp und *nclf* Neuronen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde der Internalisierungsassay durchgeführt. (A) Fluoreszenz-Mikroskopie des internalisierten CD4-Chimären. (B) Quantifizierung der intrazellulären Fluoreszenz-Intensität: 33 Wildtyp- und 34 *nclf*-Neurone, die mit CD4TI-Ub(WT) transfiziert waren und 36 Wildtyp und 39 *nclf*-Neurone Zellen, die mit CD4TCC-Ub(aIRG) transfiziert waren wurden mit der Software Metamorph ausgewertet. Die Balken repräsentieren den Median \pm Standardabweichung.

$p(\text{CD4TI-Ub(WT)}) = 3,67 \cdot 10^{-14}$, $p(\text{CD4TCC-Ub(aIRG)}) = 3,155 \cdot 10^{-9}$

3.2.4 Verminderte Endozytose des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase B in CLN6-defizienten HeLa-Zellen

Lysosomale Enzyme können durch Bindung ihrer Mannose-6-Phosphat (M6P)-Reste an den 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR300) internalisiert und über das endosomale Kompartiment zu den Lysosomen transportiert werden. Die Aufnahme lässt sich durch einen molaren Überschuss an M6P kompetitiv inhibieren. Um die Rolle von CLN6 bei der AP2-abhängigen, MPR300-vermittelten Endozytose lysosomaler Enzyme zu untersuchen, wurde Arylsulfatase B (ASB) mit radioaktivem Jod markiert und die Aufnahme in *CLN6* siRNA behandelten HeLa-Zellen gemessen. Die Zellen wurden für 15 bis zu 60 min in Medium mit [^{125}I]-ASB inkubiert. Als Kontrolle diente die Aufnahme von [^{125}I]-ASB für 60 min in Gegenwart von 10 μM M6P. Bei einem Teil der Zellen wurde das radioaktive Medium nach 30 min durch nicht-radioaktives Medium für 2,5 h bzw. 5 h ersetzt (*Chase*). Im Anschluß wurde die Radioaktivität in den Zellen und in den Chasemedien gemessen und auf den Proteingehalt normalisiert. Die Zelllysate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

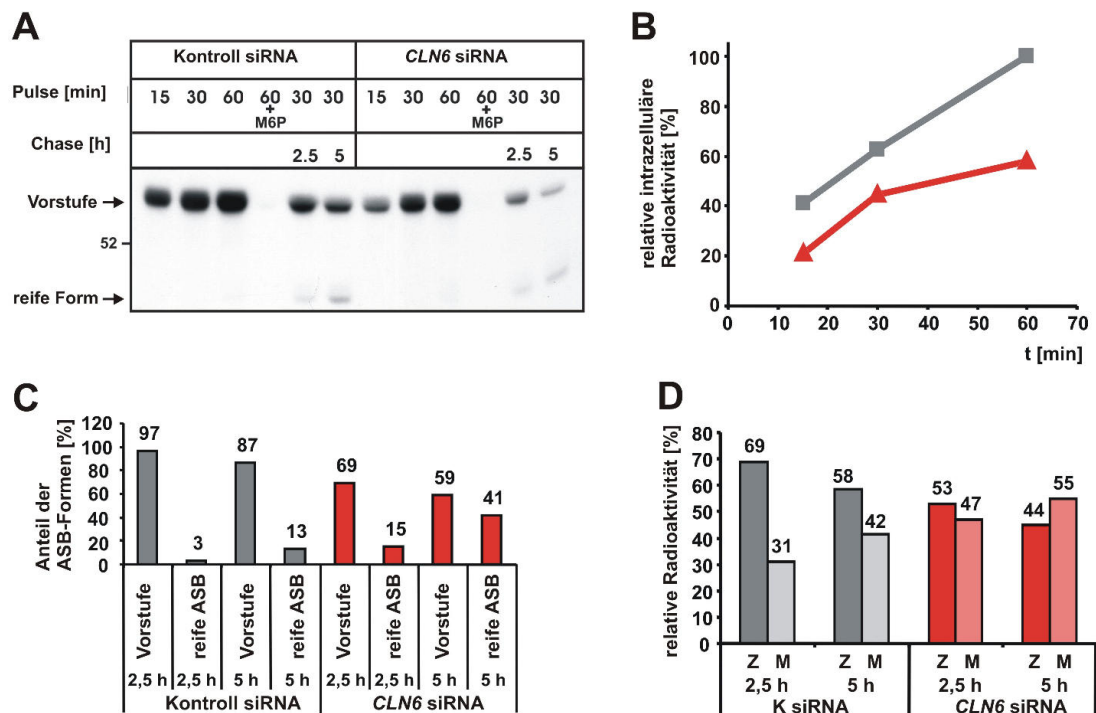


Abb. 3.12: Reduzierte Endozytose radioaktiv markierter lysosomaler ASB in *CLN6* siRNA-behandelten HeLa-Zellen. Mit Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden für 15 bis 60 min in Medium mit [125 I]-ASB (280.000 cpm/ml) inkubiert und anschließend entweder geerntet oder für weitere 2,5 und 5 h in nicht radioaktiven Medien inkubiert (*Chase*). Die Radioaktivität der Zellen und der *Chase*-Medien wurde gemessen und auf den Proteingehalt bezogen. (A) Autoradiographie der internalisierten ASB (B) Quantifizierung der intrazellulären Radioaktivität: cpm/ μ g Protein in %. Die auf 1 μ g Protein bezogene Radioaktivität von Kontroll siRNA transfizierten HeLa wurde als 100 % gesetzt. (C) Densitometrische Auswertung der ASB-Vorstufe und der reifen Form. (D) Verteilung der relativen zellulären Radioaktivität in Medien.

Die Endozytose der ASB wird durch den M6P-Rezeptor vermittelt und lässt sich komplett durch M6P hemmen, sowohl in Kontroll- als auch in *CLN6* siRNA behandelten Zellen. Jedoch nehmen die mit *CLN6* siRNA transfizierten Zellen weniger ASB auf (Abb. 3.12 A+B). Zusätzlich waren in *CLN6* siRNA behandelten Zellen nach 2,5 und 5 h *Chase* ansteigende und höhere Mengen an Radioaktivität im Medium messbar, die entweder dem Abbau aufgenommener [125 I]-ASB oder dem Recycling und der Exozytose bereits aufgenommener [125 I]-ASB zuzuordnen ist (Abb. 3.12 D). Während sich in den Kontrollen nach 2,5 h 69 % der Radioaktivität intrazellulär befindet, sind es bei *CLN6* siRNA-Zellen nur noch ca. 53 %. Nach 5 h sind in den Kontrollen 58 % der Radioaktivität intrazellulär, in *CLN6* siRNA behandelten Zellen sind es dagegen nur 44 %. Weitere Unterschiede sind auch in der Prozessierung des endozytierten Enzyms erkennbar, die in den mit *CLN6* siRNA transfizierten

HeLa-Zellen schneller abläuft (Abb. 3.12 D). Obwohl weniger [125 I]-ASB aufgenommen wurde, sind bereits nach 2,5 h Chase 15 % zur reifen Form prozessiert worden. In Kontroll siRNA transfizierten Zellen liegen nur 3 % der internalisierten [125 I]-ASB als reife Form vor. Nach 5 h Chase sind in *CLN6* siRNA behandelten Zellen 40 % der [125 I]-ASB prozessiert, während dieser Anteil in den Kontrollen nur etwa 13 % ausmacht.

Die verminderte Endozytose-Rate konnte durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestätigt werden (Fig 3.13). Dazu wurden die Zellen für 10 min mit AlexaFluor647 markierter ASB inkubiert. Anschließend erfolgten die Fixierung und die Zweitfärbung des lysosomalen Membranproteins LAMP1. Die Detektion von EEA1, einem Markerprotein des frühen endosomalen Kompartiments, war in *CLN6* siRNA transfizierten Zellen leider erfolglos.

In *CLN6* siRNA behandelten Zellen und in den Kontrollen ist die internalisierte AlexaFluor647-ASB in vesikulären Strukturen lokalisiert, die nicht mit LAMP1 colokalisieren. *CLN6* siRNA transfizierte HeLa Zellen nehmen weniger AlexaFluor647-ASB auf. Zudem ist in einigen Zellen ein intensiveres LAMP1-Signal zu erkennen, was auf eine Vergrößerung der Lysosomen hindeutet.

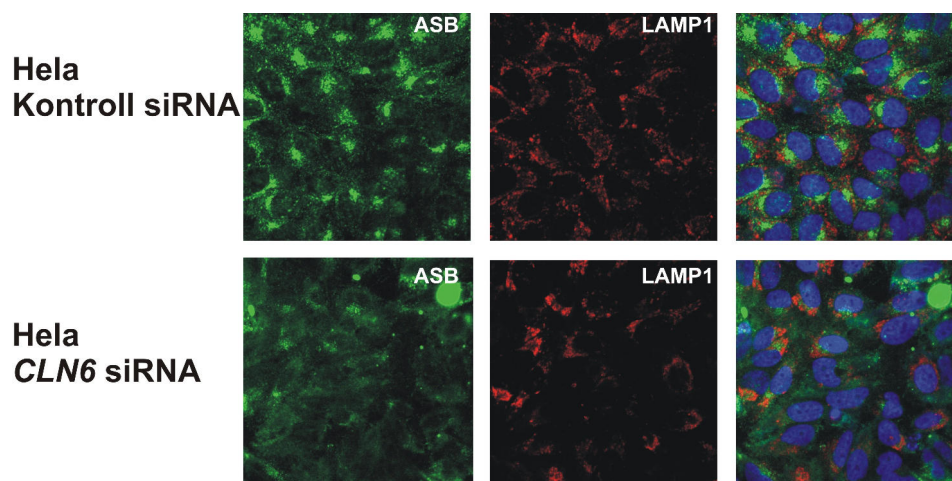


Abb. 3.13: Endozytose AlexaFluor647 markierter lysosomaler ASB in Kontroll- und *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 10 min mit AlexaFluor647-ASB inkubiert. Lysosomen wurden mit einem monoklonalen anti-Lamp1-Antikörper und einem Cy3-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen.

3.2.5 Endozytose von ASB in Neuronen und Astrozyten

Um die physiologische Relevanz der reduzierten Endozytose verschiedener Rezeptorproteine in CLN6-defizienten bzw. in *CLN6* down-regulierten Zellen für die neurodegenerative CLN6-Krankheit zu untersuchen, wurde die Endozytose von ASB in neuronalen Zellen gemessen. Wildtyp- und *nclf*-Neurone wurden für unterschiedliche Zeiten in Medium mit [¹²⁵I]-ASB inkubiert. Die MPR vermittelte Endozytose von [¹²⁵I]-ASB ist vollständig durch 10 mM M6P hemmbar, das die Spezifität der Aufnahme unterstreicht. Die Radioaktivität in den Zellen wurde gemessen und auf den Proteingehalt normalisiert. Anschließend wurden die Zelllysate durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert (Abb. 14 A). Innerhalb der ersten 40 min war eine Reduktion in der [¹²⁵I]-ASB Internalisierung in *nclf*-Neuronen nachweisbar (Abb.3.14 B). Nach etwa 60 min gleicht sich die Aufnahme der *nclf*-Neuronen der der Wildtyp-Zellen an. Die Prozessierung der ASB konnte in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen auch nach 90 min nicht beobachtet werden. In der Autoradiographie ist nur die Vorstufe der ASB zu sehen.

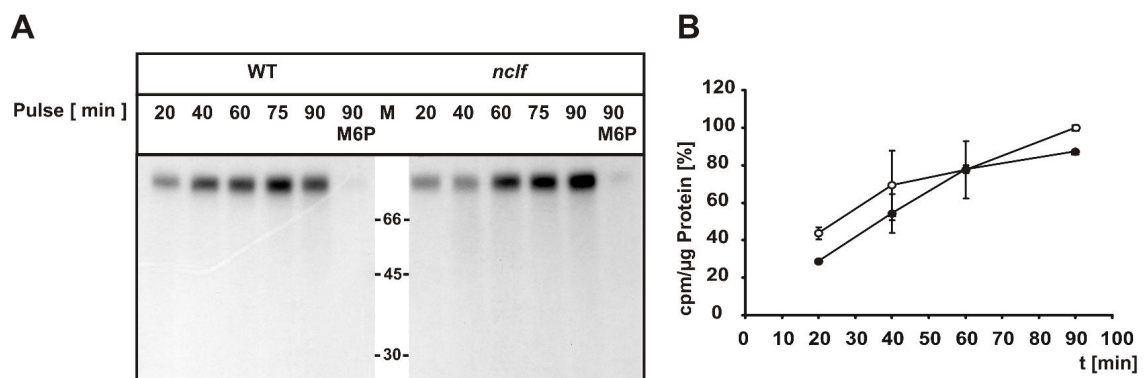


Abb. 3.14: M6P-abhängige Endozytose von [¹²⁵I]-ASB in Wildtyp und *nclf*-Neuronen. Wildtyp und *nclf*-Neuronen wurden für 20 bis 90 min mit [¹²⁵I]-ASB (400.000 cpm/ml) inkubiert. Als Kontrolle für einen M6P-abhängigen Transport dient das Aufnahmeexperiment in Gegenwart von 10 mM M6P. Die Radioaktivität wurde im Zellpellet gemessen und auf den Proteingehalt bezogen. (A) Radiographie der internalisierten ASB (B) Quantifizierung der intrazellulären Radioaktivität: cpm/µg Protein in %. Die Radioaktivität der Wildtyp-Neurone nach 90 min [¹²⁵I]-ASB-Aufnahme wurde als 100 % gesetzt.

Das Experiment wurde auch mit Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten durchgeführt (Abb.3.15). Die Zellen wurden bis zu 60 min kontinuierlich mit [¹²⁵I]-ASB inkubiert, oder für 30 min mit [¹²⁵I]-ASB inkubiert, gefolgt von einer Chaseperiode von 2,5 und 5 h. Die Radioaktivität in den Zellen und in den

Chasemedien wurden gemessen und die Zellysate anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

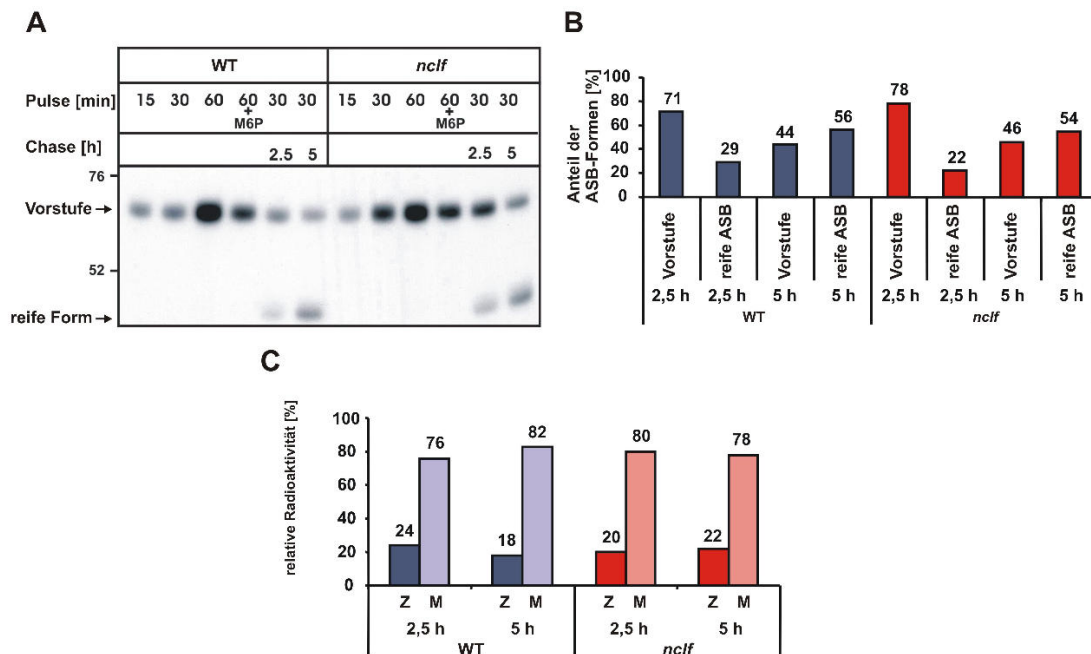


Abb. 3.15: Internalisierung von $[^{125}\text{I}]$ -ASB in Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten. Die Astrozyten wurden für 15 bis 60 min mit $[^{125}\text{I}]$ -ASB (340.000 cpm/ml) inkubiert und anschließend entweder geerntet oder für 2,5 und 5 h in nicht-radioaktivem Medium inkubiert (Chase). Die Radioaktivität wurde in Zellen und Medien gemessen und auf den Proteingehalt bezogen. (A) Autoradiographie der internalisierten $[^{125}\text{I}]$ -ASB (B) Densitometrische Auswertung der $[^{125}\text{I}]$ -ASB-Vorstufe und der reifen Form. (C) Verteilung der relativen Radioaktivität im Zellpellet und im Medium.

Die Endozytoserate, der Abbau und die Sekretion weisen keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten auf (Abb.3.15 A+B+C). Die Aufnahme der $[^{125}\text{I}]$ -ASB in Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten ist im Gegensatz zu der in Neurone oder HeLa-Zellen nur partiell um 42 bzw. 35 % durch M6P inhibierbar (Abb. 3.15 A).

Um die Prozessierung der internalisierten ASB in Neuronen und Astrozyten genauer zu untersuchen, wurden Wildtyp Astrozyten und Neurone für 16 h mit 200 mM ASB in An- bzw. Abwesenheit von M6P inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und die Lysate durch SDS-PAGE und im Western Blot analysiert (Abb. 3.16). Im Lysat neuronaler Zellen war auch nach 16-stündiger Inkubationsphase nur die 68 kDa Vorstufe der ASB und nicht die reife Form nachweisbar. In den Astrozyten hingegen dominierte die prozessierte reife 43 kDa ASB. In Gegenwart von 10 mM M6P war die Aufnahme der ASB in Neuronen um 55 % erniedrigt. Die Prozessierung der ASB wird in Astrozyten durch M6P um 45 % reduziert.

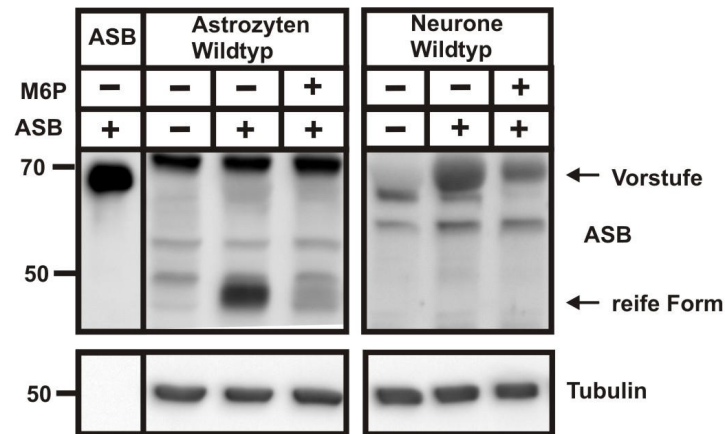


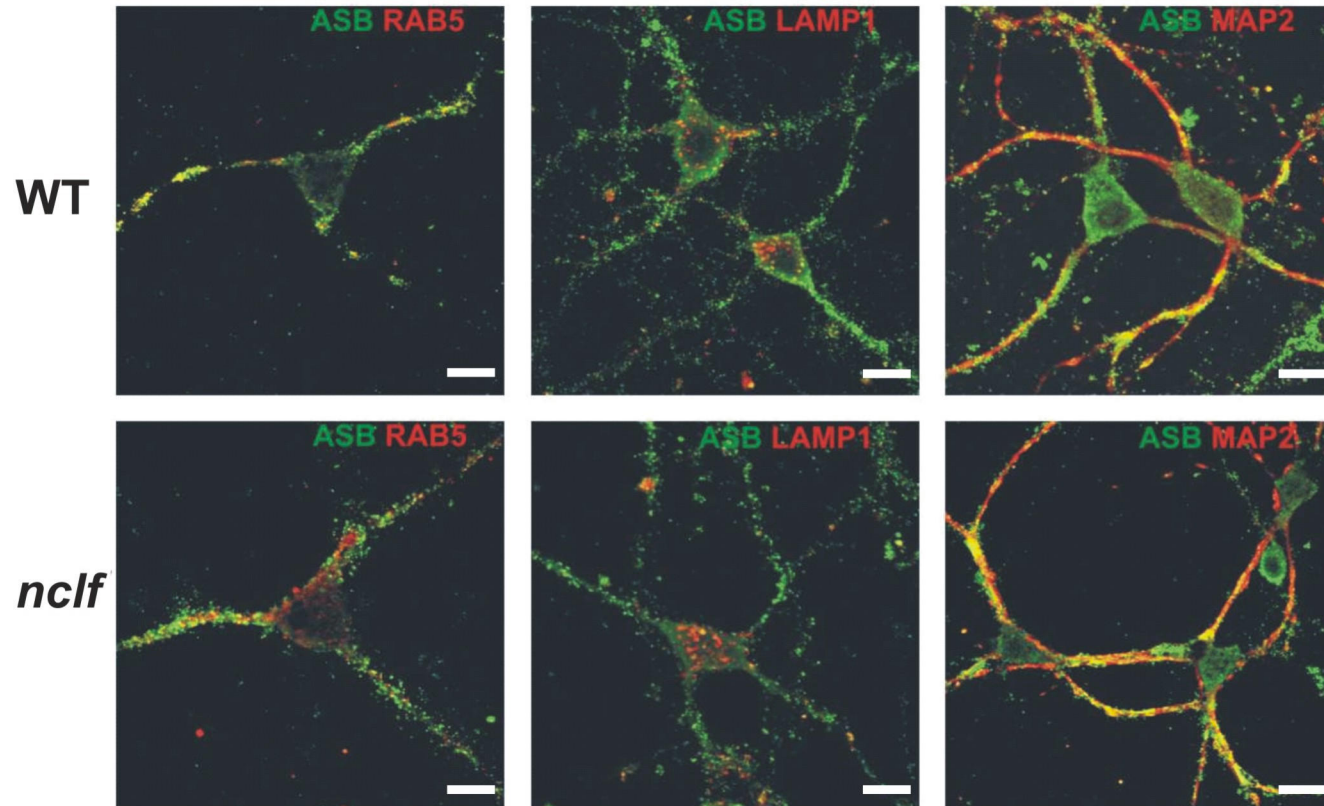
Abb. 3.16: Endozytierte ASB wird in Neuronen nicht proteolytisch prozessiert. Neuronale Zellen und Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen wurden für 16 h mit 200 nM ASB inkubiert. Um die Spezifität nachzuweisen wurden 10 mM M6P zugesetzt. Jeweils 30 µg Gesamtprotein wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und durch ASB-Western Blot analysiert. Der β -Tubulin Blot zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden.

Die intrazelluläre Lokalisation der ASB wurde nach 16 h Endozytose in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen und Astrozyten mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.17). Frühe Endosomen wurden durch RAB5, späte Endosomen und Lysosomen durch LAMP1-Färbung nachgewiesen.

Dazu wurden die Zellen fixiert und die ASB durch einen polyklonalen ASB-Antikörper detektiert. Die Visualisierung der frühen Endosomen und der Lysosomen erfolgte unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen RAB5 und Lamp1. Als Kontrollfärbung für Neuronen diente das Markerprotein MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*).

Es zeigte sich weder bei Astrozyten noch bei Neuronen ein Unterschied in der Aufnahme und Lokalisation der ASB zwischen Wildtyp und *nclf*. Auffällig war, dass nach 16-stündiger Inkubation nur ein geringer Teil der aufgenommenen ASB in Lysosomen zu finden war. Der Großteil colokalisierte mit RAB5-positiven frühen Endosomen in dendritischen und axonalen Ausläufern. In Astrozyten hingegen ist der Anteil an ASB, der mit den Lysosomen colokalisiert wesentlich größer.

Neurone



Astrozyten

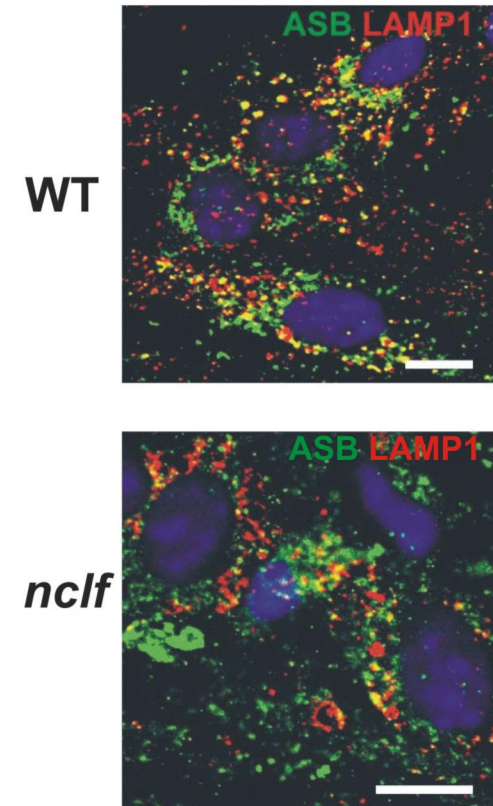


Abb. 3.17: Intrazelluläre Lokalisation endozytierter ASB in Neuronen und Astrozyten. Wildtyp-Neurone und –Astrozyten wurden für 16 h mit 200 nM ASB inkubiert und fixiert und permeabilisiert. ASB wurde mit einem polyklonalen anti-ASB-Antikörper und einem AlexaFluor488-markierten Sekundärantikörper detektiert (grün). Frühe Endosomen und die Lysosomen wurden über RAB5- und LAMP1-Antikörper mit einem Alexa546-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Als Neuronenmarker dient die MAP2-Färbung. Gelb gibt die Colokalisation an. Der Balken entspricht 10 μ m.

Um zu überprüfen, ob die verringerte Endozytose und/oder der Transport der ASB zu den Lysosomen in Neuronen, und die damit verbundene fehlende Prozessierung, durch den Verlust an M6P-Resten an der ASB bedingt ist, wurden Wildtyp-Neuronen und Astrozyten für 16 h mit ASB inkubiert im Western Blot mittels eines *Single-Chain* anti-M6P Antikörperfragmentes analysiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Der *Single-Chain* Antikörper erlaubt die Detektion aller mit M6P markierten Proteine. Anschließend wurde der Blot gestriipt und die Anwesenheit von ASB nachgewiesen (Abb. 3.18).

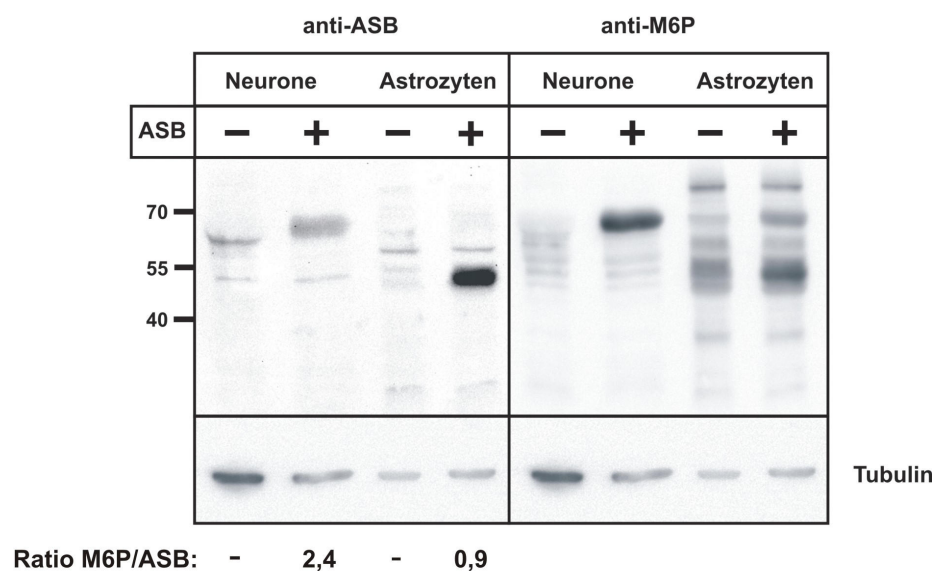


Abb. 3.18: Dephosphorylierung internalisierter ASB in Astrozyten. Wildtyp-Neurone und Astrozyten für 16 h mit 200 nM ASB inkubiert und im M6P-Western Blot analysiert. Anschließend wurde der Blot auf Anwesenheit humaner ASB getestet. Tubulin dient als Ladekontrolle. Das Verhältnis des M6P-Signals zum jeweiligen ASB-Signal ist angegeben.

Ohne Zusatz von humaner ASB waren in Neuronen drei schwache ASB-positive Banden erkennbar, von denen das 64 kDa Polypeptid möglicherweise die endogene murine ASB darstellt. In unbehandelten Astrozyten sind vier schwache immunreaktive Banden zu erkennen, deren Identität unklar ist und die wahrscheinlich als unspezifisch anzusehen sind. In behandelten Neuronen zeigt sich nur die 68 kDa ASB-Vorstufe. Es ist keine reife ASB detektierbar. Diese ist jedoch in den Astrozyten als dominante 43 kDa Bande sichtbar.

Im anti M6P-Blot sind in Neuronen und Astrozyten erwartungsgemäß mehrere M6P-haltige Proteine nachweisbar. Die Vorstufe der humanen ASB ist in behandelten Neuronen und Astrozyten zu erkennen. Das Signal in Astrozyten

ist im Vergleich zu dem in Neuronen weniger intensiv. Die reife ASB ist in Neuronen nicht detektierbar. Im Astrozytenlysat ist dagegen eine 43 kDa ASB-positive Bande nachweisbar, die der reifen Form entspricht. Im Lysat der unbehandelten Astrozyten befindet sich eine M6P-immunreaktive Bande auf gleicher Höhe, die der endogenen reifen ASB entsprechen könnte. Aus der ASB/M6P-Ratio der Signale von 1,1 ist ersichtlich, dass in Astrozyten die Prozessierung der ASB mit einer Dephosphorylierung einhergeht. In Neuronen wird internalisierte ASB weder prozessiert noch dephosphoryliert. Dementsprechend beträgt das Verhältnis des ASB-Signals zum M6P-Signal nur 0,4.

Die Endozytose des lysosomalen Enzyms ASB wird in Astrozyten durch M6P-Zugabe nur zu ca. 40 % inhibiert. Es stellt sich die Frage, ob andere Rezeptoren beteiligt sind, oder ob es sich um eine unspezifische Aufnahme durch Pinozytose handelt. Deshalb wurden Astrozyten und neuronale Zellen mit ASB für 16 h in der An- und Abwesenheit von verschiedenen Effektoren unterschiedlicher Rezeptorsysteme inkubiert. Mannan ist ein Polysaccharid, das aus Mannose-Einheiten besteht und in Hefe, Pflanzen und Bakterien zu finden ist. Es bindet an Mannose-erkennende Rezeptoren. Asialooromucoïd (ASOR) ist eine Glycoprotein, dessen Zuckerstrukturen terminale Galactosereste besitzt und mit hoher Affinität an Galactose-erkennende Rezeptoren bindet. Ausserdem wurde die Wirkung von Fucose, Galactose und Mannose getestet (Abb. 3.19 A) Die Wirkung einer Kombination von Mannose-6-Phosphat und ASOR, Mannan oder Fucose auf die ASB-Internalisierung wurde ebenfalls untersucht (Abb 3.19 B). Die Zelllysate wurden im ASB-Western Blot analysiert (Abb. 3.19 A+B).

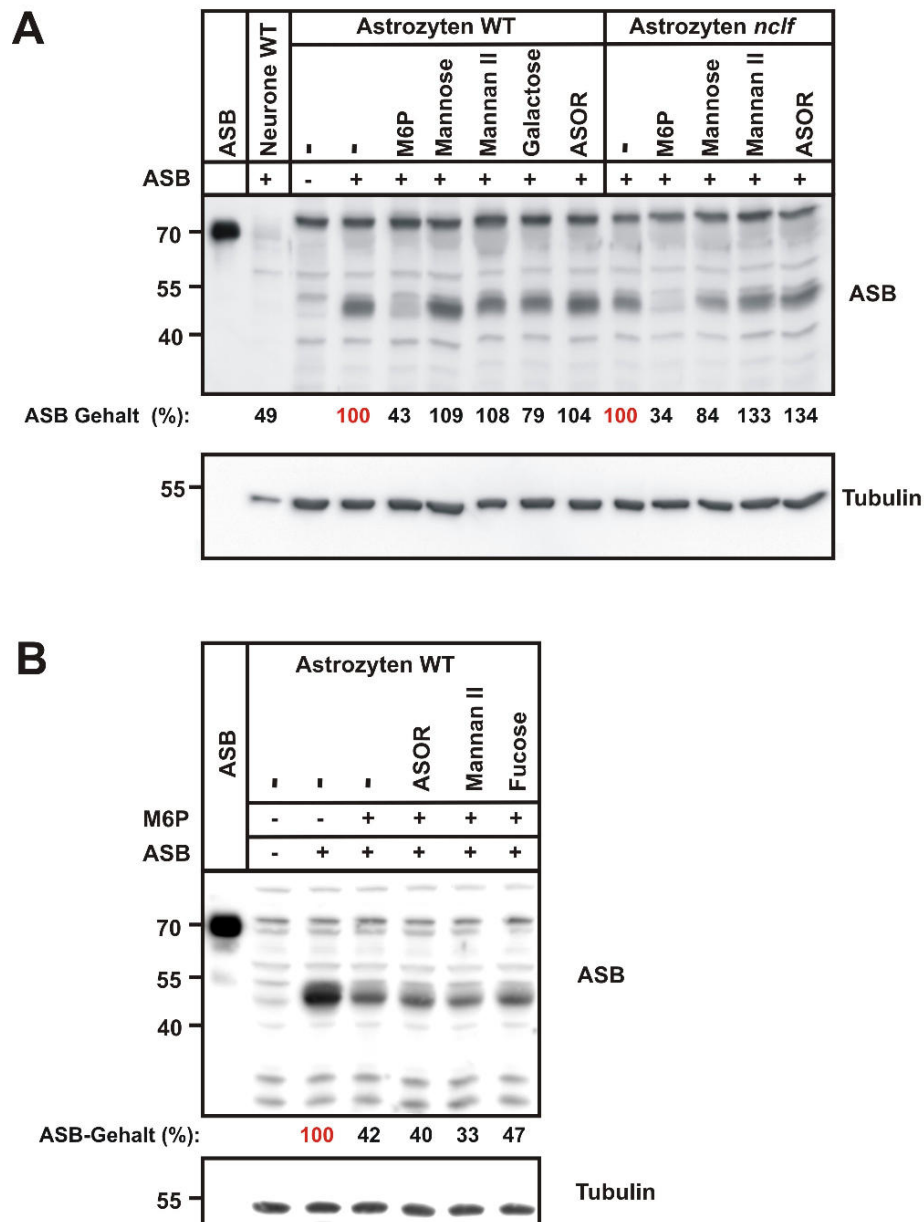


Abb. 3.19: Einfluß verschiedener Effektoren auf die ASB-Endozytose in Astrozyten. (A) Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten wurden für 16 h Medium mit 200 nM ASB in Anwesenheit von 10 mM Mannose-6-Phosphat, 0,2 mg/ml Mannan II, 0,2 mg/ml Asialoorosomuroid (ASOR), 5 mM Fucose oder 50 mM Galactose oder 50 mM Mannose inkubiert und anschließend im ASB-Western Blot mit Wildtyp-Neuronen nach ASB-Inkubation verglichen. Die relative Aufnahme [%] bezogen auf den Tubulingehalt ist angegeben, Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten mit ASB-Zusatz und ohne Effektoren wurden als 100 % gesetzt (B) Die Zellen wurden während der 16 stündigen ASB Inkubation mit einer Kombination von Mannose6-Phosphat und Mannan II, ASOR oder Fucose behandelt. Der ASB-Gehalt wurde auf den Tubulingehalt relativiert und Astrozyten mit ASB-Zugabe und ohne weitere Effektoren wurden als 100 % gesetzt.

In Bezug auf den Tubulingehalt ist die Menge internalisierter ASB in Wildtyp-Neuronen bezogen im Vergleich zu Wildtyp-Astrozyten um 51% reduziert (Abb. 3.19 A). Die Vorstufe ist in diesen Zellen nur schwach zu erkennen und es gibt keine prozessierte ASB. M6P inhibiert die ASB-Aufnahme in

Wildtyp-Astrozyten um 57 bzw. 58 %, in *nclf*-Astrozyten um 66 % (Abb. 3.19 A+B). Von den getesteten Effektoren inhibiert Galactose die ASB-Internalisierung in Wildtyp-Astrozyten um 21 %. Keinen Effekt auf die ASB-Aufnahme in Wildtyp-Astrozyten zeigen Mannose, Mannan II und ASOR. (Abb. 3.19 A). Die ASB-Menge ist um 8, 9 und 4 % erhöht. In *nclf*-Astrozyten ist die ASB-Internalisierung in Anwesenheit von Mannose um 16 % vermindert. Mannan II und ASOR bewirken hingegen einen Anstieg des ASB-Gehaltes um 33 bzw 34 % (Abb. 3.19 A).

Die Kombination von M6P und Mannan II hat, im Vergleich zur Behandlung mit M6P allein, den stärksten Effekt auf die ASB-Aufnahme in Wildtyp-Astrozyten und inhibiert um weitere 7 % (Abb. 3.19B). Der Zusatz von Fucose und M6P erhöht dagegen den ASB-Gehalt der Zellen um 7 %. Die Kombination von ASOR und M6P führt im Vergleich zu M6P allein nicht zu einer zusätzlichen Inhibition.

3.2.6 Expressionsanalyse der Adaptorproteine AP2 und Epsin1

Die Rezeptor-abhängige Endozytose erfordert das Zusammenspiel mehrere Proteine. Neben Clathrin, das das Hüllprotein der meisten Vesikel darstellt, sind vor allem die Adaptorproteine von entscheidender Bedeutung. Die verminderte Internalisierung von Liganden des Transferrin- und M6P-Rezeptors sowie der CD4-Rezeptor-Chimären könnte durch eine veränderte Expression der Adaptorproteine hervorgerufen werden. Deshalb wurden der Gehalt der Adaptorproteine AP2 und Epsin1 in HeLa-Zellen, die mit *CLN6* siRNA transfiziert wurden, in kultivierten Neuronen, im Cortex und im Cerebellum von Wildtyp und *nclf* Mäusen im Western Blot analysiert (Abb.3.20 + 3.21).

Weder die Expression des Adaptorproteins AP2 noch die von Epsin1 wurde durch die Repression von *CLN6* unter den hier gewählten Bedingungen in HeLa-Zellen beeinflusst (Abb. 3.20). Ebenfalls unverändert ist Expression von AP2 im Cortex und Cerebellum von 4 Wochen alten *nclf* Mäusen, sowie in kultivierten *nclf* Neuronen (Abb. 3.21).

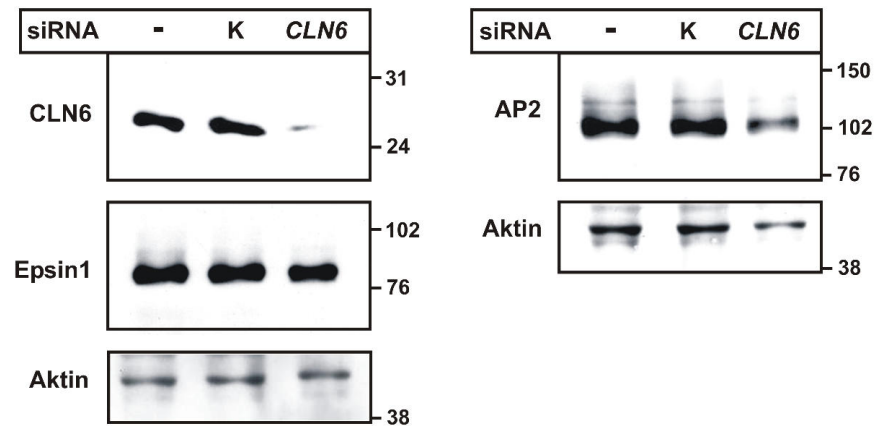


Abb. 3.20: Expression der Adaptorproteine AP2 und Epsin1 in HeLa-Zellen mit verminderter *CLN6*-Expression. Lysate von Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle dient Aktin.

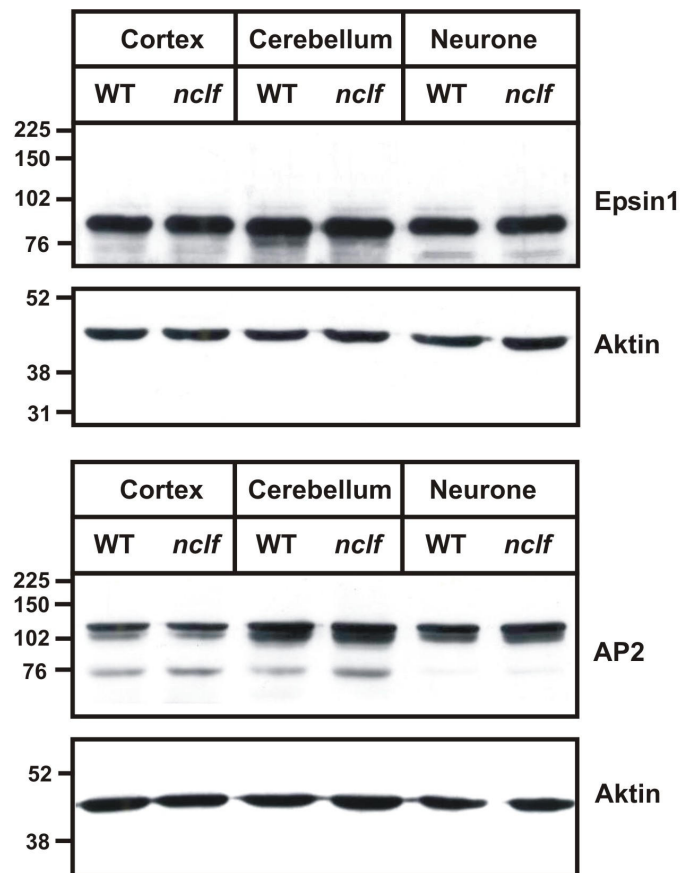


Abb. 3.21: Expression der Adaptorproteine AP2 und Epsin1 im Cortex, Cerebellum und in Neuronen von Wildtyp und *nclf*-Mäusen. Cortex- und Cerebellumlysate von 4 Wochen alten Wildtyp und *nclf*-Mäusen und Lysate aus neuronalen Zellen wurden im Western Blot analysiert. 30 µg Totalprotein wurden aufgetrennt. Der Aktin-Blot zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

3.2.7 Bestimmung der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche und intrazelluläre Verteilung verschiedener Proteine der Clathrin-abhängigen Endozytosemaschinerie

Eine Erniedrigung der Endozytoserate könnte durch eine erniedrigte Expression der betreffenden Rezeptoren an der Zelloberfläche verursacht werden. Um zu untersuchen, ob eine Reduktion der CLN6 Expression Einfluß auf die plasmamembranständige Rezeptormenge hat, wurde eine Oberflächenbiotinylierung an CLN6 siRNA behandelten HeLa Zellen unter Verwendung eines nicht-membranpermeablen Biotins durchgeführt. Nach Lyse der Zellen können biotinylierte Proteine mittels Streptavidin-Agarose präzipitiert und im Western Blot detektiert werden. Abbildung 3.22 A zeigt die Western Blots für CLN6, den Transferrin Rezeptor (TfR), den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (MPR300) und Tubulin.

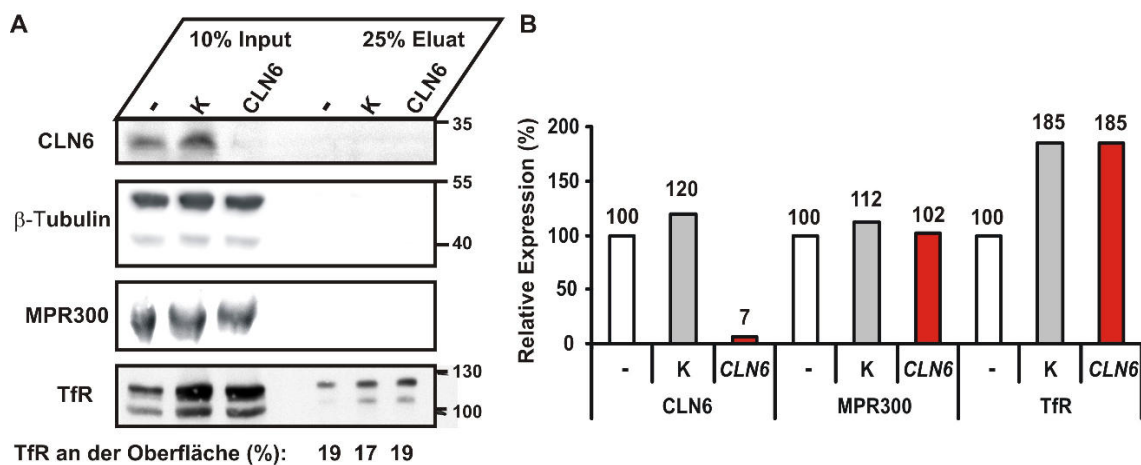


Abb. 3.22: Expression des Transferrin- und M6P-Rezeptors MPR300 in HeLa-Zellen nach CLN6 siRNA Transfektion, und Nachweis des Transferrin-Rezeptor an der Plasmamembran. (A) Untransfizierte HeLa-Zellen oder mit Kontroll- oder CLN6 siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden mit nicht-membranpermeablem Biotin bei 4°C inkubiert. Die biotinylierten Proteine wurden mit Streptavidin-Agarose präzipitiert und im CLN6-, MPR300- und TfR-Western Blot analysiert, indem 10 % der Lysate nach der Biotinylierung (Input) und 25 % der Eluate nach der Präzipitation aufgetragen wurden. Tubulin dient als Ladekontrolle und zeigt, dass nur Proteine auf der Plasmamembran biotinyliert wurden. Der TfR-Anteil (%) an der Oberfläche ist angegeben. (B) Densitometrische Auswertung der Expressionen von CLN6, MPR300 und TfR im Input relativiert auf den Tubulingehalt der Zellen (%). Die relative Expression nicht-transfizierter HeLa-Zellen wurde als 100 % gesetzt.

Auf der linken Seite wurden jeweils 10 % des Inputs (Lysate nach der Biotinylierung) aufgetragen, rechts die Eluate nach der Streptavidinpräzipitation.

Als Kontrolle, dass keine intrazellulären Proteine biotinyliert wurden, und als Ladekontrolle dient der Tubulin Western Blot. Tubulin lässt sich nur in den Lysaten (Input) detektieren und nicht im Präzipitat (Oberfläche). Der CLN6-Blot zeigt, dass die Expression von CLN6 in den HeLa-Zellen, die mit Kontroll siRNA transfiziert wurden, im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen um 20 % erhöht ist (Abb. 3.22 A+B), während die Transfektion mit *CLN6* siRNA eine Reduktion des CLN6-Gehaltes um 93 % bewirkt. CLN6 und MPR300 sind nicht an der Plasmamembran nachweisbar. Der MPR300-Gehalt ist Kontroll- und *CLN6* siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten HeLa-Zellen nahezu unverändert (112 % und 102 %). Die Expression des Transferrin-Rezeptors (TfR) ist in HeLa-Zellen, die mit der Kontroll- oder mit der *CLN6* siRNA transfiziert wurden im Vergleich zu den untransfizierten Zellen um 85 % verstärkt. Dementsprechend befindet sich auch mehr Rezeptor an der Oberfläche (Abb. 3.22 A). Jedoch sind die Anteile von TfR an der Oberfläche bezogen auf die jeweilige Gesamtmenge in nicht-transfizierten und Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfizierten Zellen mit 19, 17 und 19 % annähernd gleich. Zur Bestätigung des Oberflächenbiotinylierungsergebnisses wurden Ligandbindung-Assays durchgeführt. Dazu wurden mit Kontroll siRNA und *CLN6* siRNA transfizierte HeLa-Zellen für 2 h bei 4 °C in Medium mit [¹²⁵I]-Transferrin inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde einigen Inkubationsansätzen ein Überschuss an nicht-radioaktivem Transferrin zugesetzt. Nach Entfernen von nicht gebundenem Transferrin wurde die Radioaktivität der Zellen gemessen und auf den Proteingehalt bezogen (Abb. 3.23).

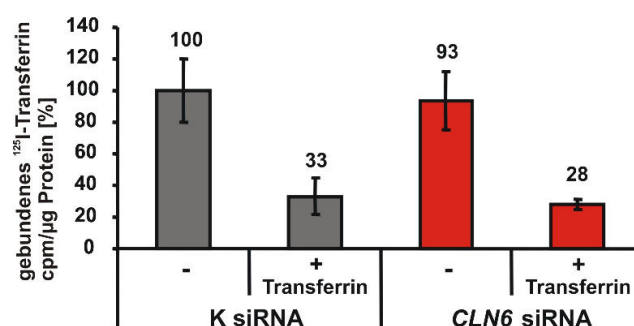


Abb. 3.23: Bindung [¹²⁵I]-Transferrin Kontroll- und *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden für 2 h bei 4 °C mit [¹²⁵I]-Transferrin (400.000 cpm/ml) in An- und Abwesenheit eines molaren Überschusses nicht-radioaktiven Transferrins inkubiert. Die zellassoziierte Radioaktivität wurde auf den Proteingehalt bezogen. Die Radioaktivität von Kontroll siRNA transfizierte Zellen ohne Zusatz von nicht-radioaktivem Transferrin wurde als 100 % gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von jeweils 4 Ansätzen ohne zusätzliche Transferrinzugabe und 2 Ansätzen mit nichtradioaktivem Transferrin.

Die verminderte *CLN6*-Expression führt nicht zu einer veränderten [125 I]-Transferrin-Bindekapazität der Zellen. Durch gleichzeitige Zugabe von nichtradioaktivem Transferrin wird die auf der Zelloberfläche von Kontroll- und *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen gebundene Radioaktivität um ca. 70 % reduziert.

Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Analysen der Proteine AP2, Clathrin Heavy Chain, Dynamin II und des Transferrin Rezeptors zeigten, dass AP2 in *nclf*-Neuronen vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert ist und im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.24) deutlich weniger cytosolisch vorliegt. Die intrazelluläre Verteilung von Clathrin, Dynamin II und dem Transferrin-Rezeptor weist keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *nclf* auf.

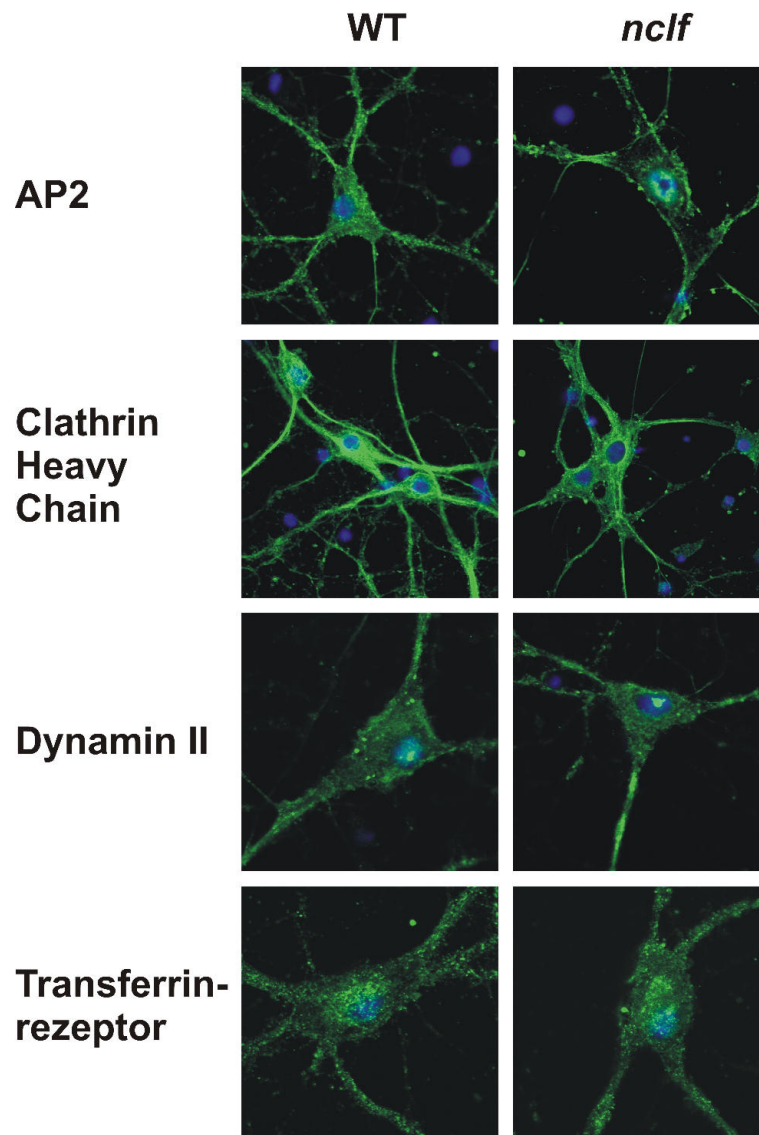


Abb. 3.24: Intrazelluläre Verteilung von AP2, Clathrin Heavy Chain, Dynamin II und Transferrin-Rezeptor in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen. In Neuronen wurden AP2 (alpha-Adaptin), Clathrin Heavy Chain, Dynamin II und der Transferrin-Rezeptor mit monoklonalen Antikörpern (grün) detektiert. Die Anfärbung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI.

3.2.8 Untersuchung der Membranzusammensetzung

Weder Veränderungen in der Adaptorproteinexpression noch in der Menge der Rezeptoren auf der Zelloberfläche scheinen die Ursache für die Endozytosedefekte zu sein. Neben diesen Komponenten ist auch die Membranzusammensetzung von entscheidender Bedeutung. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Phosphatidylinositole PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃. Neben ihrer direkten und indirekten Funktion als *second messenger*, rekrutieren sie Adaptorproteine, Rezeptoren und Hüllproteine an die Plasmamembran. Unter Verwendung monoklonaler FITC-markierter Antikörper gegen PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ wurden die Lipide in kultivierten Wildtyp und *nclf*-Neuronen mit Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.25 A). Während keine Veränderungen in der Menge und der Verteilung von PI(4,5)P₂ zwischen WT und *nclf* festgestellt werden konnte, ist der Anteil von PI(3,4,5)P₃ in den *nclf*-Neuronen sowohl an der Plasmamembran als auch intrazellulär gegenüber Wildtyp-Neuronen stark erhöht. In den Wildtyp-Neuronen ist dieses Lipid kaum zu detektieren.

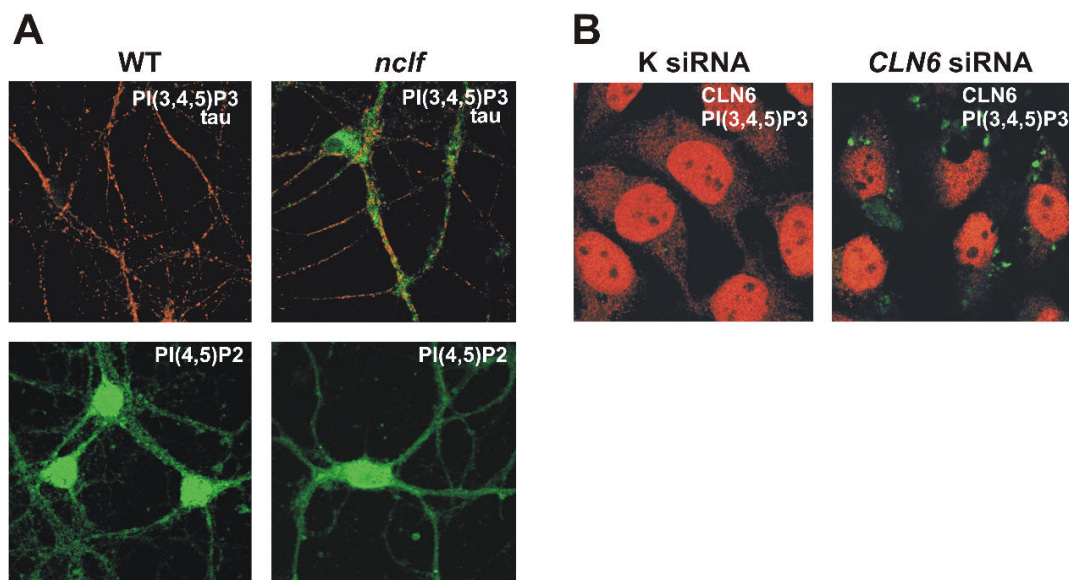


Abb. 3.25: Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie der Phosphatidylinositolphosphate PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ in Neuronen und in HeLa-Zellen nach *CLN6* siRNA Transfektion. (A) PI(4,5)P₂ und PI(3,4,5)P₃ (grün) wurden mit monoklonalen FITC-markierten Antikörpern in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen detektiert. Das neuronale Markerprotein Tau (rot) wurde mit einem polyklonalen anti-Tau-Antikörper nachgewiesen. (B) PI(3,4,5)P₃ (grün) und CLN6 (rot) in HeLa-Zellen nach Kontroll- oder *CLN6* siRNA-Transfektion.

Ein größerer Anteil von PI(3,4,5)P3 zeigte sich auch in *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen (Abb. 3.25 B), im Vergleich zu Kontroll siRNA Zellen. PI(3,4,5)P3 akkumuliert in großen vesikulären Strukturen.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden die geladenen Lipide aus Wildtyp- und *nclf*-Neuronen, Astrozyten und aus siRNA-behandelten HeLa-Zellen, extrahiert. Die Detektion von PI(3,4,5)P3 erfolgte mit einem PIP3-Mass-Western Blot. Hierbei werden die gewonnenen Lipide auf eine Nitrocellulosemembran gespottet. Eine Detektorprotein bindet spezifisch an das PI(3,4,5)P3. Über einen gegen das Detektorprotein gerichteten Antikörper kann das Lipid anschließend nachgewiesen und mit Hilfe von Standardlipidreihen quantifiziert werden (Abb. 3.25 B). Die Reinheit der verwendeten Kulturen wurden mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Antikörpern gegen die neuronalen und astroglären Markerproteine Tau bzw. GFAP nachgewiesen (Abb. 3.25 A). Die Neuronenkulturen waren zu 95 % Tau-positiv.

Die Isolierung und Quantifizierung von PI(3,4,5)P3 bestätigt die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Die Konzentration von PI(3,4,5)P3 ist in *nclf*-Neuronen verdoppelt (Abb.3.25+Tabelle 3.1). Die *nclf*-Astrozyten hingegen zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Astrozyten keine signifikanten Veränderungen in der PI(3,4,5)P3-Menge (1 und 0,8). Die PI(3,4,5)P3-Konzentrationen in Kontroll- und *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen ist im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollen um das 3-4-fache bzw. 8-10-fache erhöht. Zwischen Kontroll- und *CLN6* siRNA behandelten Zellen sind jedoch keine Unterschiede in der PI(3,4,5)P3 Menge zu erkennen. Allerdings scheinen sowohl Astrozyten, als auch HeLa-Zellen generell über größere Mengen PI(3,4,5)P3 zu verfügen. Wildtyp-Astrozyten und untransfizierte HeLa-Zellen haben im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen durchschnittlich 10 x mehr PI(3,4,5)P3 als Wildtyp-Neurone.

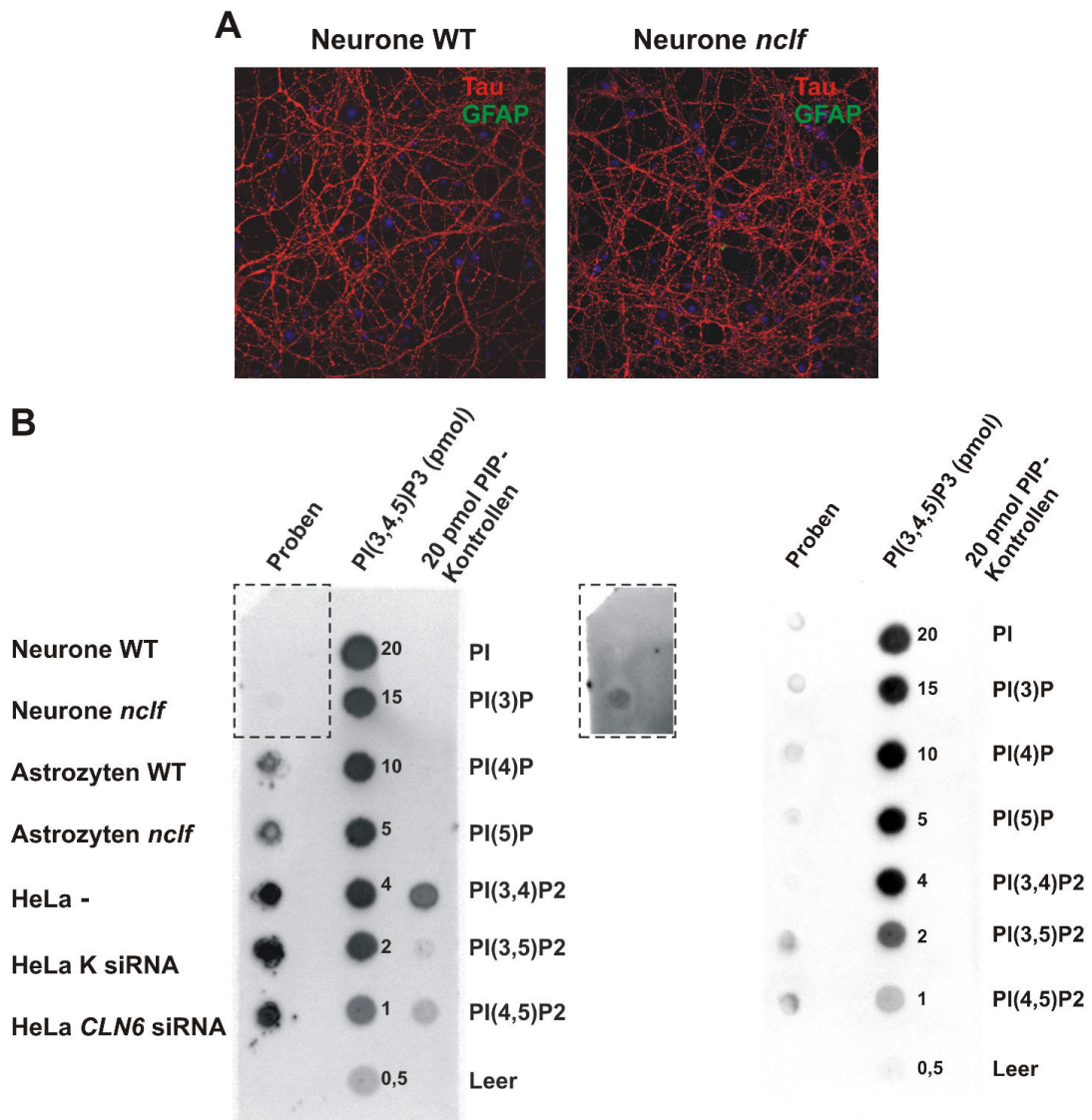


Abb. 3.26: Akkumulation von PI(3,4,5)P3 in *nclf*-Neuronen. (A) Immunfluoreszenz des neuronalen Markerproteins Tau und des Astrozytenmarkers GFAP (B) Geladene Lipide wurden aus Wildtyp- und *nclf*-Neuronen und Astrozyten, sowie aus siRNA transfizierten und untransfizierten HeLa-Zellen extrahiert und im PI(3,4,5)P3-Western Blot analysiert. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Analysen sind dargestellt.

Tabelle 3.1: Ermittelte PI(3,4,5)P3-Konzentrationen. Für die relative Auswertung wurde der PI(3,4,5)P3-Wert untransfizierter HeLa Zellen sowie der Wildtyp-Neurone und -Astrozyten gleich 1 gesetzt.

Probe	1. Analyse		2. Analyse	
	PI(3,4,5)P3 [pmol/g Feuchtgewicht]	relativiert (Kontrolle = 1)	PI(3,4,5)P3 [pmol/g Feuchtgewicht]	relativiert (Kontrolle = 1)
Neurone WT	0,3	1,0	0,4	1,0
Neurone <i>nclf</i>	0,6	2,2	0,8	2,0
Astrozyten WT	3,7	1,0	3,0	1,0
Astrozyten <i>nclf</i>	3,8	1,0	2,3	0,8
HeLa -	5,0	1,0	1,7	1,0
HeLa K siRNA	20,3	4,1	15,4	8,8
HeLa <i>CLN6</i> siRNA	17,5	3,5	18,6	10,6

Die bekannteste Funktion von PI(3,4,5)P3 ist die Aktivierung des AKT-Signalweges. Die aktivierte, phosphorylierte Kinase AKT fördert das Zellüberleben, indem Signale, die die Apoptose induzieren können, inhibiert werden. Zudem beeinflusst AKT den Stoffwechsel, die Proliferation und Zyklus der Zelle (Manning & Cantley 2007).

Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen die phosphorylierte und unphosphorylierte Form von AKT zeigen in *nclf*-Neuronen, im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen und bezogen auf die Menge an unphosphoryliertem AKT, einen erhöhten Phospho-AKT-Gehalt und damit eine gesteigerte Aktivierung des Signalweges (Abb.3.27). In Wildtyp- und *nclf*-Astrozyten ist hingegen keine unterschiedlichen AKT-Aktivität nachweisbar.

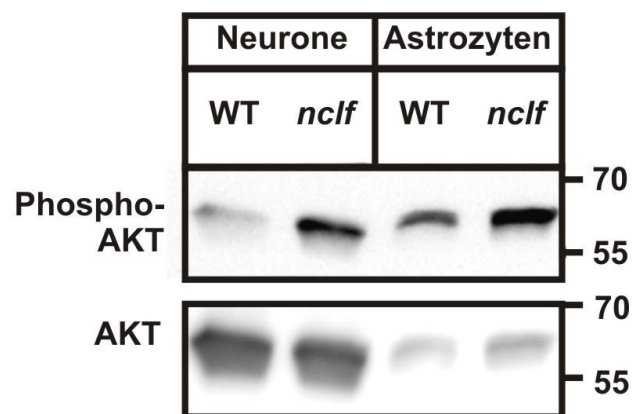


Abb. 3.27: Erhöhte Aktivität des AKT-Signalweges in *nclf*-Neuronen. Lysate von Neuronen und Astrozyten aus Wildtyp- und *nclf*-Mäusen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit einem anti Phospho-AKT-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle dient der Gehalt an unphosphoryliertem AKT.

3.2.9 Intrazelluläre Verteilung von PI(3,4,5)P3 und des endosomalen Proteins RAB4 in *nclf* Neuronen

Für ausgewählte Proteine, die an der Internalisierung von Zelloberflächen-Rezeptoren beteiligt sind, wurde die Lokalisation bzw. Colokalisation mit PI(3,4,5)P3 in neuronalen Zellen von Wildtyp und *nclf*-Mäusen untersucht.

Die Lokalisation und die relative Expression von RAB4 und Epsin 1 wurde mit der von PI(3,4,5)P3 durch Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen verglichen.

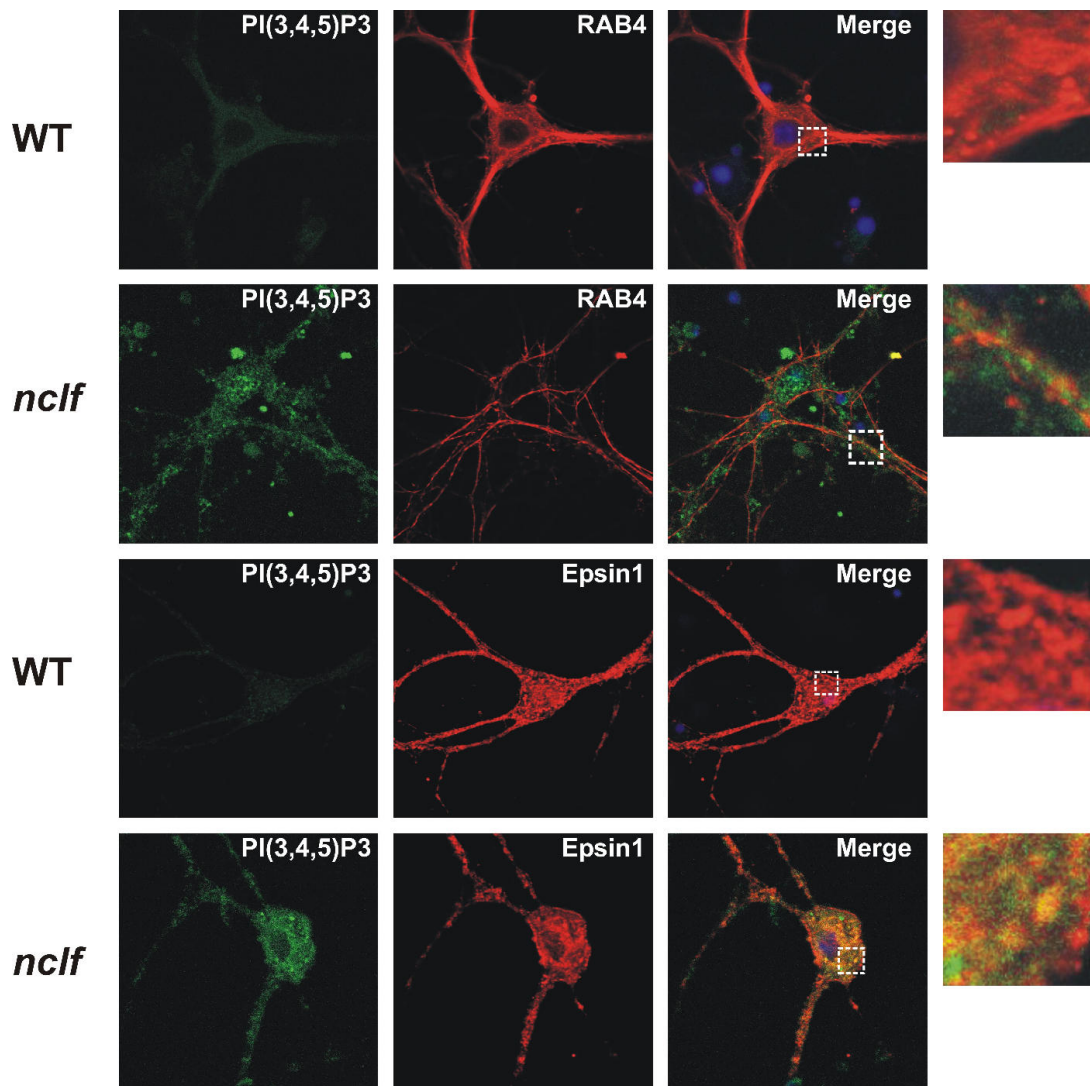


Abb. 3.28: Akkumulation des Phosphatidylinositolphosphats PI(3,4,5)P3 und Reduktion der RAB4-positiven Endosomen in *nclf*-Neuronen. PI(3,4,5)P3 (grün), RAB4 (rot) und Epsin1 (rot) wurde in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen detektiert. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Vergrößerte Bereiche sind durch weiße Quadrate markiert. Gelb gibt die Colokalisation an.

PI(3,4,5)P3 akkumuliert in *nclf*-Neuronen im Gegensatz zu Wildtyp-Neuronen (Abb. 3.28).

RAB4 ist in Wildtyp-Neuronen in kleinen vesikulären Strukturen im Soma und in den Ausläufern lokalisiert. Teilweise wird auch die Plasmamembran angefärbt. In *nclf*-Neuronen hingegen ist RAB4 nicht in Vesikeln zu detektieren, sondern nur an der Plasmamembran, wo es nicht mit PI(3,4,5)P3 colokalisiert (Abb. 3.28). Die schwächere Fluoreszenz-Intensität deutet zudem auf eine verminderte RAB4-Expression hin.

Epsin1 befindet sich Wildtyp- und *nclf*-Neuronen in unterschiedlich großen Vesikeln. In *nclf*-Neuronen ist jedoch auch eine partielle Colokalisation von Epsin1 mit RAB4 im Soma zu erkennen.

3.2.10 Akkumulation von Cholesterin in *nclf*-Neuronen und in CLN6-downregulierten HeLa-Zellen

Cholesterin-Akkumulation führten in Fibroblasten der Niemann Pick-Krankheit zu einem verlangsamten Membran-*Recycling*, durch spezifische Inhibition der RAB4 Funktion (Choudhury et al 2004). Da in *nclf*-Neuronen eine deutlich verminderte RAB4-Expression und Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation zu beobachten waren, wurde die Menge und die intrazelluläre Verteilung von membrangebundenem Cholesterin durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie in neuronalen Zellen aus Wildtyp- und *nclf*-Mäusen untersucht. Dazu wurde der Farbstoff Filipin verwendet, der spezifisch an nicht-verestertes Cholesterin in Membranen der Zelle bindet. Die frühen Endosomen wurden mit Antikörper gegen EEA1 und RAB4, die Lysosomen mit einem anti-LAMP1-Antikörper detektiert. Die Bilder wurden mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommen (Abb. 3.29). In Wildtyp-Neuronen wird Cholesterin nur in der Plasmamembran detektiert (Abb.3.29 c+k). *Nclf*-Neuronen hingegen weisen in der gesamten Zelle Akkumulationen von Cholesterin auf, die teilweise in LAMP1-positiven Lysosomen lokalisiert sind (Abb.3.29 g, o, p).

EEA1 und RAB4 positive Endosomen zeigen in Wildtyp-Neuronen eine partielle Colokalisation im Soma. In den Ausläufern finden sich jedoch nur RAB4-positive Vesikel (a, b, d). In *nclf*-Neuronen lokalisiert RAB4 mit Cholesterin der Plasmamembran und ist nicht intrazellulär zu detekieren (e+h).

Die EEA1-Färbung ist schwächer und die EEA1-positiven Vesikel sind größer als in Wildtyp-Neuronen (b+f). RAB4 colokalisiert in *nclf*-Neuronen mit LAMP1 (m+n) während im sich Wildtyp nur ein kleiner Teil der RAB4-positiven Strukturen auch LAMP1-positiv sind (i+j).

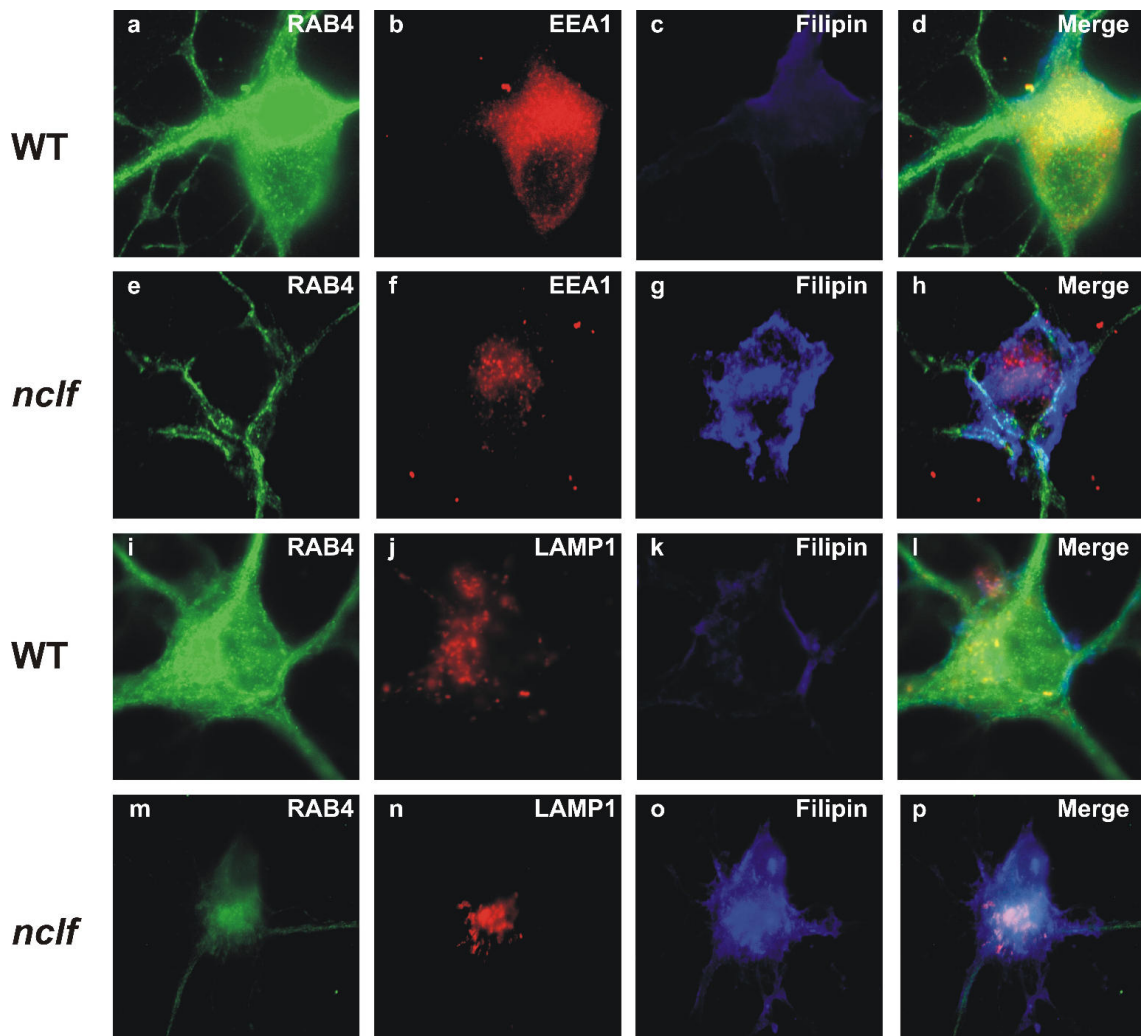


Abb. 3.29: Filipin-Färbung und Immundetektion der frühen RAB4 und EEA1-positiven Endosomen in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen. Die Zellen wurden mit 0,5 mg/ml Filipin (blau) und Primärantikörpern gegen RAB4 (grün), EEA1 (rot) und LAMP1 (rot) anfärbt. Gelb gibt die Colokalisation von RAB4 mit EEA1 bzw. LAMP1 an. Weiß zeigt die Colokalisation mit Cholesterin an.

Die Colokalisation von RAB4 mit EEA1 und LAMP1 wurde mit einem konfokalem Lasermikroskop überprüft (Abb.3.30 A). Im Wildtyp colokalisiert RAB4 teilweise mit EEA1-positiven Endosomen im Soma. In den Ausläufern der Zellen sind nur RAB4-positive und keine EEA1-positiven Endosomen zu detektieren. In *nclf*-Neuronen hingegen befindet sich RAB4 an der Plasmamembran und in den Ausläufern. EEA1 konnte in wenigen, vergrößerten Strukturen nachgewiesen werden. Die RAB4- und EEA1-Färbung war in *nclf*-Neuronen wesentlich schwächer als im Wildtyp. RAB4 colokalisiert weder in Wildtyp- noch in *nclf*-Neuronen mit LAMP1. Die verminderte RAB4-Expression in *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA transfizierten Zellen konnte durch Western

Blot-Analysen bestätigt werden (Abb.3.30 B). Der RAB4-Gehalt war in diesen Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen, jeweils um 50 % reduziert. In *ncif*-Astrozyten hingegen war die RAB4-Menge um 80 % höher als in Wildtyp-Astrozyten.

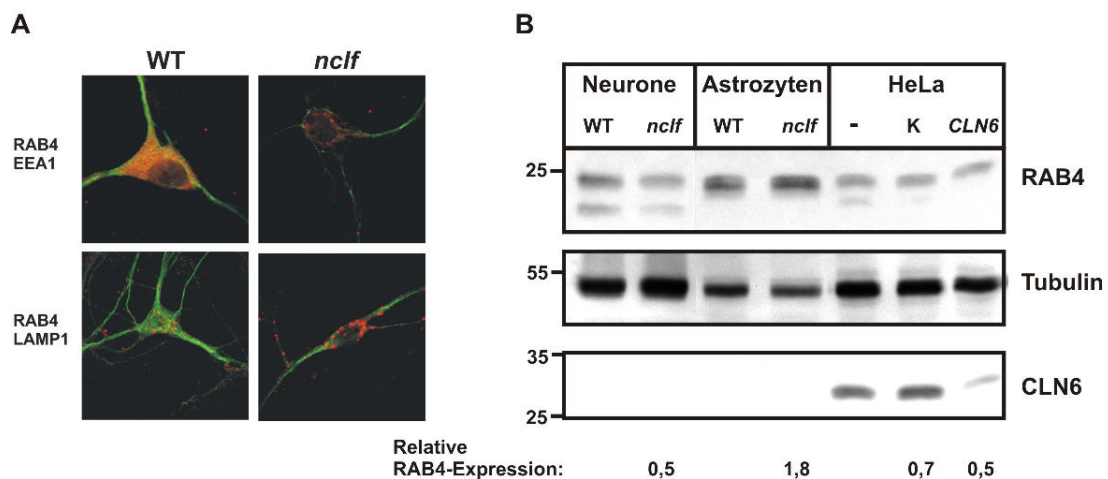


Abb. 3.30: Intrazelluläre Verteilung und Expression von RAB4 in CLN6-defizienten Zellen
 (A) RAB4 (grün), EEA1 (rot) und LAMP1 (rot) wurden in neuronalen Zellen aus Wildtyp- und *ncif*-Mäusen detektiert. Gelb gibt die Colokalisation von RAB4 mit EEA1 bzw. LAMP1 an.
 (B) RAB4 wurde im Western Blot detektiert und auf den Tubulin-Gehalt normalisiert. Die relative RAB4-Expression in Bezug auf Wildtyp-Neurone bzw. -Astrozyten und untransfizierte Zellen durch densitometrische Auswertung ist angegeben. Der CLN6-Western Blot zeigt den siRNA-vermittelten *Knockdown* der CLN6-Expression.

Cholesterin-Akkumulationen zeigten sich ebenfalls in HeLa-Zellen, die mit *CLN6* siRNA transfiziert waren (Abb. 3.31+ Abb. 3.32). *CLN6* ist in Kontroll siRNA transfizierten HeLa-Zellen in kleinen vesikulären Strukturen lokalisiert, die nicht mit EEA1-positiven Endosomen colokalisieren. Durch Transfektion mit *CLN6* siRNA reduziert sich mit dem *CLN6*-Signal auch das Signal der EEA1-positiven Strukturen. Gleichzeitig kommt es zu massiven intrazellulären Cholesterin-Akkumulationen in Organellen, die partiell LAMP1-positiv sind. RAB4 colokalisiert in Kontrollzellen nicht mit EEA1-positiven Endosomen. Die bereits im Western Blot beobachtete verringerte RAB4-Expression in *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen konnte in der Immunfluoreszenz bestätigt werden.

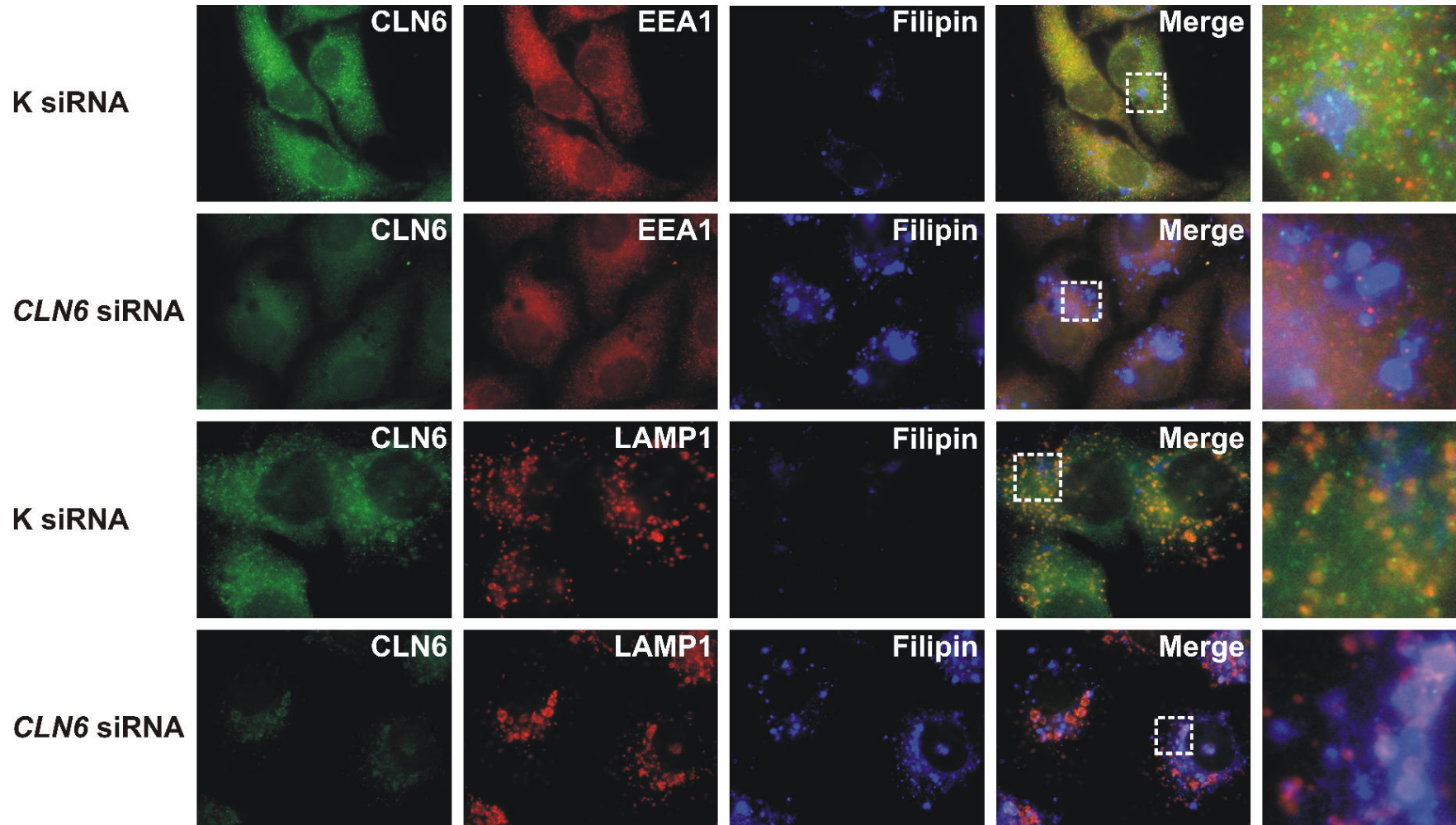


Abb. 3.31: Filipin-Färbung und Immunfluoreszenz der frühen EEA1-positiven Endosomen und der Lysosomen in HeLa-Zellen mit verminderter CLN6-Expression. Kontroll- oder *CLN6* siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden mit 0,5 mg/ml Filipin und den Primärantikörpern CLN6 (grün), EEA1 (rot) und LAMP1 (rot) für 1 h bei RT inkubiert. Gelb bzw. Weiß gibt die Colocalisation an.

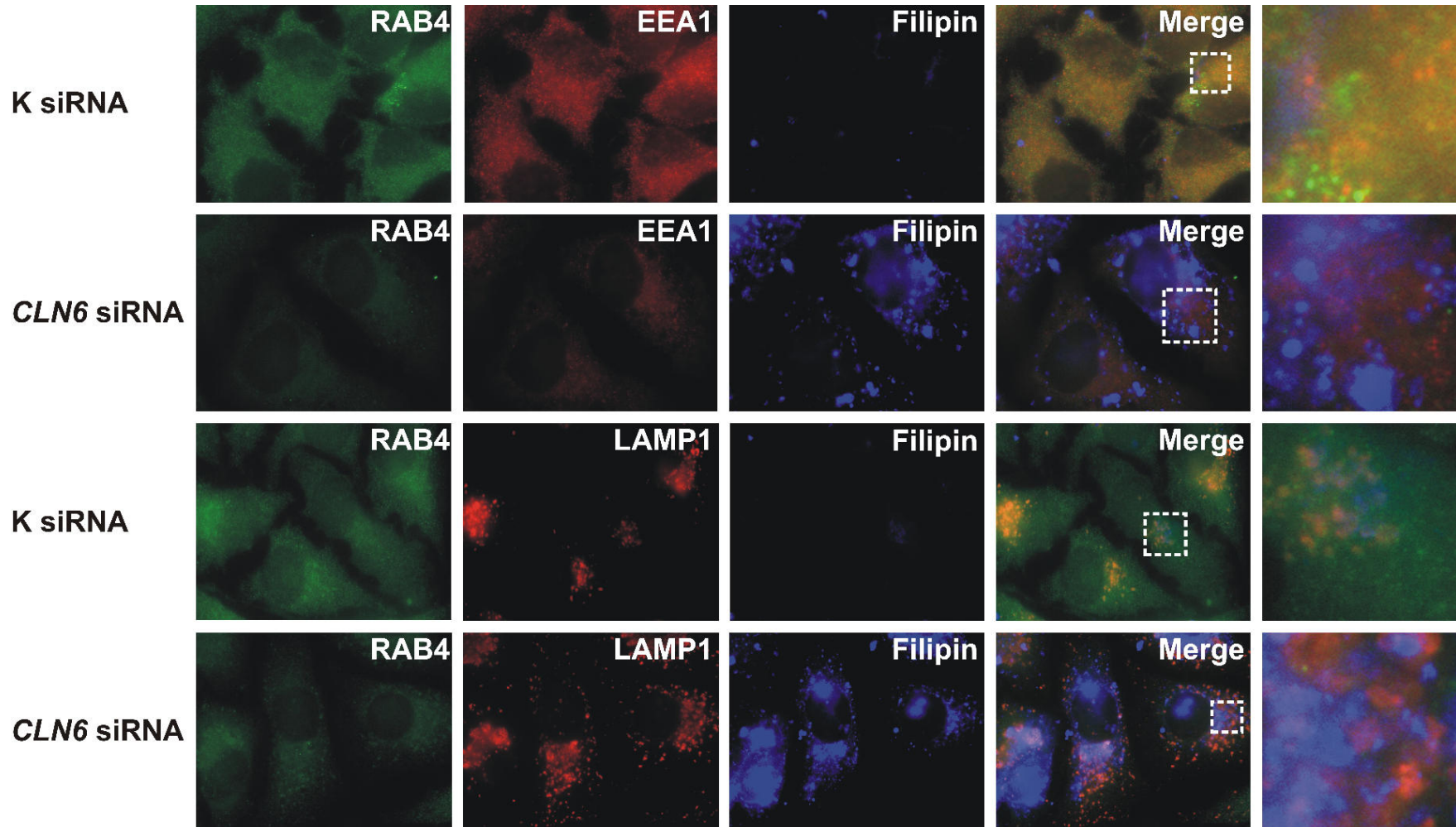


Abb. 3.32: Filipin-Färbung und Immunfluoreszenz der frühen RAB4- und EEA1-positiven Endosomen und der Lysosomen in HeLa-Zellen mit verminderter CLN6-Expression. Kontroll- oder CLN6 siRNA transfizierte HeLa-Zellen wurden mit 0,5 mg/ml Filipin und den Primärantikörpern RAB4 (grün), EEA1 (rot) und LAMP1 (rot) für 1 h bei RT inkubiert. Gelb bzw. Weiß gibt die Colocalisation an.

4. Diskussion

Bei den neun bisher genetisch unterscheidbaren NCL-Erkrankungen sind die klinischen Symptome, wie mentale Retardierung, Erblindung, Koordinationsstörungen, epileptische Anfälle sowie die Zusammensetzung des lysosomalen Speichermaterials, ähnlich. Auf molekularer Ebene ist den NCL-Krankheiten zusätzlich die vorrangige Degeneration von Nervenzellen und Photorezeptoren gemeinsam. Die Krankheiten unterscheiden sich im wesentlichen im Zeitpunkt der Erkrankung und in der Progressivität, die den frühzeitigen Tod der Patienten zur Folge hat. Es kann daher angenommen werden, dass die Pathomechanismen, die zur Neurodegeneration bei den verschiedenen NCL-Formen führen, analog sind.

Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Untersuchung der Auswirkungen von krankheitsrelevanten Mutationen auf die Stabilität und den Abbau des ER-residenten Transmembranproteins CLN6. Des Weiteren wurde der Einfluß von CLN6 auf den Membrantransport und die Endozytose verschiedener Liganden in murinen, CLN6-defizienten neuronalen- und gliären Zellen analysiert. Zur Verifizierung der Daten wurden Schlüsselexperimente an *CLN6* siRNA behandelten Zellen durchgeführt.

4.1 Mutationen in CLN6 führen zu reduzierten Halblebenszeiten durch schnellen Abbau der Proteine

Um die Bedeutung von Mutationen im *CLN6*-Gen für die Synthese, die Stabilität, die intrazelluläre Lokalisation und die Dimersierung des CLN6-Proteins zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei unterschiedliche Mutationen im CLN6-Gen, die bei Patienten der spät infantilen varianten Form der NCL identifiziert wurden, näher analysiert. Bei der ersten Mutation führt die *in-frame* Deletion von drei Basenpaaren zum Verlust des Isoleucinrestes 154 in der dritten luminalen Schleife von CLN6 (p.I154del). Bei der *Missense*-Mutation CLN6 p.G123D kommt es in der dritten putativen Transmembrandomäne zum Austausch der neutralen Aminosäure Glycin 123 durch einen sauren Aspartatrest. Die dritte hier untersuchte Mutation führt durch Insertion eines Basenpaares zur Verschiebung des Leserasters und einem

verfrühten Translationsabbruch, wodurch eine CLN6-Protein entsteht, das nur ein Drittel der Länge des Wildtyp-Proteins aufweist (p.R106PfsX26, Wheeler et al, 2002). Western Blot-Analysen von BHK-Zellen, die die mutierten CLN6-Proteine exprimierten, konnten zeigen, dass CLN6 p.G123D und CLN6 p.I154del, wie der Wildtyp, als 30 kDa Polypeptid exprimiert werden. Im Gegensatz dazu war die CLN6-Mutante p.R106PfsX26 als verkürztes 14 kDa Polypeptide mit schwächerer Intensität detektierbar (Abb.3.1). *Pulse-Chase*-Experimente mit [³⁵S]-Methionin und anschließender Immunpräzipitation von CLN6 konnten zeigen, dass sowohl die Syntheserate als auch die Stabilität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren (Abb.3.3). Dieses Experiment erlaubt außerdem die Berechnung der Halblebenszeit ($t_{1/2}$) des Wildtyp-CLN6, die ca. 26 h betrug. Obwohl die Deletion des Isoleucins in der dritten Schleife des CLN6-Proteins die Topologie des Proteins nicht stark beeinflussen sollte, ist die $t_{1/2}$ auf ca. 10 h reduziert, während Lokalisation (Dr. Claudia Heine, publiziert in Kurze et al 2010) und Dimerisierung nicht beeinflusst werden (Abb. 3.2). Inhibitoren lysosomaler Hydrolasen oder des proteasomalen Abbaus zeigten bei dieser Mutante nur eine schwache Wirkung, so dass keine Aussage über die Beteiligung dieser Systeme am Abbau des mutierten CLN6 getroffen werden kann (Abb.3.4). Isoleucin 154 ist im CLN6-Protein von 5 Spezies (Mensch, Maus, Kuh, Schwein und Huhn) hoch konserviert ist (Wheeler et al, 2002) und lässt vermuten, dass es eine wichtige Rolle in der Funktion von CLN6 spielt.

Der Austausch des Glycinrestes 123 durch Aspartat (p.G123D) führt wahrscheinlich zur Unterbrechung der Hydrophobizität der Aminosäuresequenz, die für die Insertion in die Membran notwendig ist. Darauf deuten auch die stark reduzierte $t_{1/2}$ von 3 h und die im Vergleich zum Wildtyp und zu CLN6 p.I154del reduzierte Fähigkeit zur Dimerisierung hin (Abb. 3.3 und Abb. 3.2). Die Lokalisation von CLN6 p.G123D im ER (Dr. Claudia Heine, publiziert in Kurze et al 2010) und die Sensitivität gegenüber Lactacystin (Abb. 3.4) lassen vermuten, dass das Protein nach der Synthese aus dem ER zum Proteasom transportiert wird, um dort abgebaut zu werden. Dafür spricht auch die beschriebene Interaktion von mutantem CLN6 p.G123D mit Proteinen des Translokons (Oresic et al 2009).

Im Vergleich zu den beiden anderen CLN6-Mutanten war die Halbwertszeit von CLN6 p.R106PfsX26 mit 1,5 h am deutlichsten reduziert. CLN6 p.R106PfsX26 besitzt nur ein Drittel der Länge des Wildtyp-Proteins, so dass eine inkorrekte Integration des Proteins in die Membran zu erwarten war. Durch Differentialzentrifugation konnte jedoch gezeigt werden, dass CLN6 p.R106PfsX26 in Membranen eingelagert wird (Abb. 3.5). Abbildung 4.1 zeigt die mögliche Topologien die CLN6 p.R106PfsX26 in der Membran einnehmen könnte. Bei der Aufklärung der tatsächlichen Konformation der Mutante halfen Dimerisierungsexperimente. Das Wildtyp-Protein besitzt keine Cystein-Reste. Bei CLN6 p.R106PfsX26 entstehen jedoch durch den *Frameshift* 25 neue Aminosäuren, die ein Cystein beinhalten. CLN6 p.R106PfsX26 ist zur Ausbildung von Dimeren fähig, die nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen im CLN6-Western Blot zu detekieren waren (nicht gezeigt) und somit auf die Ausbildung einer artifiziellen Disulfid-Brücke hindeuten.

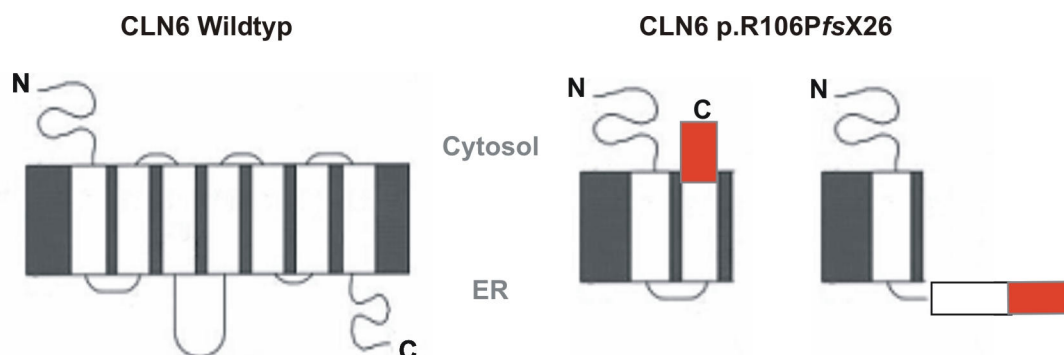


Abb. 4.1: Topologie des Wildtyp-CLN6 und möglichen Konformationen der Mutante CLN6 p.R106PfsX26.

Die Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgt im ER, da dort oxidativere Bedingungen herrschen als im Cytosol (Fränd et al 2000). Die Dimerisierung von CLN6 p.R106PfsX26 über Disulfidbrücken lässt vermuten, dass nur die erste Transmembrandomäne ausgebildet wird, da sonst der Cysteinrest für die Dimerbildung nicht im ER, sondern im Cytosol lokalisiert wäre.

Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopien zeigten, dass CLN6 p.R106PfsX26 nur teilweise im ER lokalisiert ist (Abb. 3.6). Die im Vergleich zum Wildtyp diffusere Färbung, lässt darauf schließen, dass CLN6 p.R106PfsX26 partiell im Cytoplasma vorliegt. Damit übereinstimmend ist auch der proteasomale Abbau von CLN6 p.R106PfsX26, der mit Hilfe des Inhibitors Lactacystin verhindert

werden konnte (Abb. 3.4). Die Mutante wird entweder gar nicht in das ER inseriert oder sofort nach Translation in das Cytoplasma relokalisiert. Der Mechanismus der Translokation eines polytopischen Membranproteins aus dem ER in das Cytosol zum Proteasom ist noch unbekannt, aber die ER-Membranproteine Derlin-1, p97 und SEL1L sind an der Rekrutierung mutierter CLN6-Proteine zum Translokation beteiligt (Oresic et al 2009).

Für die ER-Lokalisation sind der N-Terminus und die C-terminalen Transmembrandomänen 6 und 7 erforderlich (Heine et al 2007). Ein geringer Teil von CLN6 p.R106PfsX26 colokalisiert mit dem frühen endosomalen Protein EEA1. Zudem verhindern die lysosomalen Proteaseinhibitoren Pepstatin A und E64 partiell den Abbau der CLN6-Mutante. Offensichtlich führt die C-terminale Verkürzung und der Verlust der Transmembrandomänen 6 und 7 einschließt dazu, dass CLN6 p.R106PfsX26 das ER verlassen und über endosomale Kompartimente zu den Lysosomen transportiert werden kann. Der N-Terminus stellt kein ebenso starkes ER-Retentionssignal dar, wie die Transmembrandomänen 6 und 7 (Heine et al 2007). Zusätzlich könnte der N-Terminus aufgrund der veränderten Topologie der CLN6 p.R106PfsX26-Mutante nicht mehr für Proteine zugänglich sein, die den Export von CLN6 aus dem ER verhindern.

Die Mutation p.R106PfsX26 wurde in drei Familien pakistanischen Ursprungs entdeckt und ist besonders interessant, da sie im *CLN6*-Gen der *nclf*-Maus identifiziert wurde (Gao et al 2002). Die Insertion eines Cytosins (c.307insC) führt auch hier zur Synthese eines verkürzten Cln6-Proteins (p.R103PfsX62) mit einer stark reduzierten Halblebenszeit (persönliche Mitteilung Dr. Galliciotti, UKE). Im Hirn und in kultivierten neuronalen Zellen von *nclf*-Mäusen wurde im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte *CLN6*-mRNA-Menge gemessen. Die verminderte *CLN6*-Expression ist somit auf eine höhere Instabilität der mRNA und des Proteins zurückzuführen.

Da alle bisher analysierten Mutationen im ER-lokalisierten CLN6-Protein zu einer verminderten Stabilität führen (Kurze et al 2010; Oresic et al 2009), könnte vermutet werden, dass die Zellen einem erhöhten ER-Stress oder der Aktivierung der UPR (unfolded protein response) unterliegen, die z.B bei CLN1-defizienten Zellen oder bei Defizit der lysosomalen β -Galaktosidase als Pathomechanismen für die Neurodegeneration beschrieben wurden (Zhang et

al 2006; Tessitore et al 2004). Da aber weder im Hirn noch in neuronalen Zellen von *nclf*-Mäusen Parameter des ER-Stress oder der UPR verändert waren (Dr. Galliciotti, UKE, unveröffentlichte Daten), kann daraus geschlossen werden, dass der proteasomale/lysosomale Abbau von mutiertem CLN6-Protein ausreichend ist, um die Akkumulation der Mutanten bzw. von sekundären Substraten im ER zu verhindern.

Die in diesem Teil dargestellten Ergebnisse wurden publiziert (Kurze et al 2010).

4.2 Analyse der rezeptorabhängigen Endozytose

4.2.1 Verminderte Endozytose in *nclf*-Neuronen und CLN6 siRNA behandelten HeLa-Zellen

Neben dem Biosyntheseweg (ER, Golgi, Endosomen, Lysosomen) stellt die Endozytose die wichtigste Transportroute der Zelle dar, um Lysosomen mit Hydrolasen und Substraten auszustatten. Besondere Bedeutung hat dieser Weg für Enzymersatztherapien lysosomaler Speichererkrankungen erlangt, da dadurch die exogene Versorgung der Lysosomen mit Enzymen möglich ist. Jedoch führt die Injektion lysosomaler Enzyme oftmals nur zu einer Entspeicherung und klinischen Verbesserung in peripheren Organen weil z.B. die Blut-Hirn-Schranke den Transport ins Hirn verhindert.

In CLN6-defizienten Fibroblasten ist weder die Synthese, der Transport oder die Prozessierung bestimmter neusynthetisierter lysosomaler Enzyme beeinträchtigt (Heine et al 2004). Um zu klären, ob eine verminderte Endozytoserate eine Ursache der lysosomalen Dysfunktion und der Neurodegeneration darstellen könnte, wurde die Internalisierung des Transferrin-Rezeptors (TfR), des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR300) und transfizierter ubiquitinhaltiger CD4-Rezeptor-Chimären an neuronalen- und glialen Zellen von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen untersucht. Die Etablierung des siRNA-vermittelten CLN6 Knock-downs in HeLa-Zellen erfolgte, um direkte Effekte des CLN6-Verlustes auf die Endozytose messen zu können.

Transferrin-Endozytose und Internalisierung ubiquitinylierter CD4-Rezeptor-Chimären

TfR werden AP2-abhängig endozytiert wird, während die hier verwendeten CD4-Rezeptor-Chimären Ubiquitin-abhängig unter Beteiligung des Adaptorproteins, Epsin1 internalisiert werden (Barriere et al 2006; Motley et al 2003). Nach Internalisierung zirkulieren TfRs entweder schnell und direkt von den frühen Endosomen mit einer $t_{1/2}$ von 2-3 min zurück zur Plasmamembran, oder der Rücktransport erfolgt über *Recycling*-Endosomen mit einer $t_{1/2}$ von 10-15 min (Nagabhushana et al 2010). Die CD4-Ub-Rezeptore-Chimären hingegen werden im Lysosom abgebaut (Barriere et al 2007).

In *nclf*-Neuronen war die Transferrin-Endozytose im Vergleich zum Wildtyp nach 10 min um die Hälfte vermindert (Abb. 3.9). Nach 20 min nahm der Transferrin-Gehalt in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen zu, was zeigt, dass sich das Gleichgewicht zwischen Endozytose und Exozytose noch nicht eingestellt hatte und dass TfR über frühe und *Recycling*-Endosomen transportiert werden. Außerdem lässt die leichte Akkumulation von Transferrin nach 20 min in *nclf*-Neuronen gegenüber den Wildtyp-Kontrollen vermuten, dass die Transportkinetik über die *Recycling*-Endosomen zur Plasmamembran verlangsamt ist. Die Epsin-abhängige Internalisierung CD4-Chimär-Internalisierung war in *nclf*-Neuronen ebenfalls um 50 % reduziert (Abb. 3.11)

CLN6 siRNA-transfizierte HeLa Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls eine verminderte Internalisierungsrate der TfR-Ligand-Komplexe (Abb.3.8). Dies bedeutet, dass der kurzzeitig induzierte Verlust an CLN6 sowie die CLN6-Defizienz der neuronalen Zellen aus *nclf*-Mäusen direkt für die verminderte Endozytose von TfR und Ub-CD4-Rezeptor-Chimären verantwortlich sind. Da die hier verwendeten Rezeptor-Modellsysteme verschiedene Adaptorproteine (AP2 und Epsin1) benötigen, ist zu vermuten, dass die Internalisierung in CLN6-defekten Zellen generell gestört ist.

Endozytose von Arylsulfatase B

Mit der MPR300-vermittelten und AP2-abhängigen Aufnahme des lysosomalen M6P-haltigen Enzyms Arylsulfatase B (ASB) wurde ein dritter Typ eines endozytierten Rezeptorsystems untersucht. Nach pH-bedingter Dissoziation des Liganden rezirkulieren die MPR300 entweder zur Plasmamembran oder

werden zum TGN sortiert, während die Liganden allein zu den Lysosomen gelangen. Das Erreichen der Lysosomen lässt sich für die ASB durch die proteolytische Prozessierung gut dokumentieren.

Die MPR300-vermittelte Internalisierung von [¹²⁵I]-ASB war in einem Zeitraum von 20- 40 min in *nclf*-Neuronen gegenüber dem Wildtyp um 50 % verringert (Abb. 3.14). Nach 60 min glich sich die Menge der aufgenommenen ASB in *nclf*- und Wildtyp-Neuronen aneinander an. Mögliche Erklärungen wären eine regulierte Aufnahme nach Erreichen der maximalen Aufnahmekapazität oder eine gesteigerte Exozytose bereits aufgenommener ASB in Wildtyp-Neuronen. Die niedrigere Endozytoserate in den ersten 40 min deutet darauf hin, dass in *nclf*-Neuronen, ähnlich der Internalisierung von TfR oder UB-CD4-Rezeptor-Chimären, besonders die frühe Phase der Endozytose betroffen ist. CLN6 siRNA-transfizierte HeLa-Zellen nehmen ebenfalls weniger ASB auf. Dies konnte in Aufnahme-Assays mit [¹²⁵I]-ASB und Alexa647-ASB gezeigt werden (Abb. 3.12 A, B & Abb. 3.13). Zusätzlich war eine erhöhte Radioaktivitätsmenge im Medium von CLN6 siRNA-transfizierten HeLa-Zellen zu beobachten, die möglicherweise auf einen gesteigerten Abbau bzw. Exozytose intakter Vorstufen-ASB zurückzuführen ist (Abb. 3.12 D). Obwohl deutlich weniger ASB aufgenommen wird, scheint die internalisierte ASB schneller prozessiert zu werden (Abb.3.12 C).

Nclf-Astrozyten zeigten im Vergleich zum Wildtyp weder Veränderungen in der ASB-Aufnahme, der Prozessierung oder in der Exozytose bzw. im Abbau (Abb. 3.15). CLN6 wird im Hirn vorwiegend in Neuronen exprimiert (Melanie Thelen UKE, unveröffentlichte Daten). Ob die endogene Expression von Wildtyp oder mutantern CLN6 mit der Aufnahmerate von Liganden korreliert, ist unklar.

In HeLa-Zellen und Astrozyten, aber nicht in Neuronen konnte eine proteolytische Prozessierung von ASB beobachtet werden (Abb. 3.12 A, Abb. 3.15 A & Abb. 3.16). ASB akkumuliert in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen in frühen RAB5-positiven Endosomen und wird nicht wie in Astrozyten effizient zu den Lysosomen transportiert (Abb. 3.17). Die Akkumulation in diesen nicht-lysosomalen vesikulären Strukturen erklärt möglicherweise die Tatsache, warum eine verminderte ASB-Aufnahme in *nclf*-Neuronen nicht über einen längeren Zeitraum zu messen war. Es ist nicht auszuschließen, dass die Akkumulation der ASB in RAB5-Endosomen einer Sättigung unterliegt, die zu

einer verminderten Endozytose oder einer gesteigerten Exozytose/Abbau der ASB in Wildtyp-Neuronen führen. In *nclf*-Neuronen hingegen ist nach 60 min der [¹²⁵I]-ASB-Gehalt höher als in Wildtyp-Neuronen und deutet auf eine verlangsamte Exozytose und Abbau der ASB hin. Die Zellkulturmedien nach *Pulse-Chase*-Experimenten mit [¹²⁵I]-ASB sollten dazu überprüft werden.

RAB5-positive Organellen stellen die erste Station endozytierter Substanzen nach Vesikelabschnürung in der Zelle dar (Stenmark 2009). Die fehlende Prozessierung und die Colokalisation endozytierter ASB mit RAB5 positiven aber LAMP1-negativen Strukturen zeigen, dass die ASB nicht bis zu den Lysosomen transportiert wird. Warum die Sortierung nicht weiter in Richtung Lysosomen verläuft, konnte nicht geklärt werden. Jedoch deuten diese Ergebnisse auf Unterschiede in den Transportmechanismen von Neuronen und Astrozyten hin. Im Hinblick auf Enzymersatztherapien bei denen ASB Verwendung findet, ist eine genauere Untersuchung des intrazellulären Transports lysosomaler Enzyme in Neuronen von entscheidender Bedeutung.

Ob es sich um einen ASB-spezifischen Transportweg in Neuronen handelt, bedarf weiterer Experimente. So werden andere lysosomale Enzyme wie z. B. Aspartylglukosaminidase (AGA) in Neuronen prozessiert (Kyttälä et al 1998). Die Prozessierungsschritte der AGA waren in Neuronen mit denen in Fibroblasten zu vergleichen. Allerdings war in Neuronen die Akkumulation der inaktiven Vorstufe und eine verlangsamte lysosomale Prozessierung zu beobachten. Bislang sind die subzelluläre Lokalisation der proteolytischen Prozessierung von ASB und AGA und die beteiligten Proteasen unbekannt. Vergleichende massenspektrometrische Proteom-Analysen von kultivierten Neuronen und Astrozyten der Ratte zeigten, dass jeweils etwa die Hälfte der identifizierten Proteine Zelltyp-spezifisch exprimiert wurden (Yang et al 2005). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich auch die endosomalen und lysosomalen Kompartimente hinsichtlich ihrer Proteine für den Transport und die Prozessierung lysosomaler Enzyme in Neuronen und Astrozyten unterscheiden. Da keine Antikörper gegen die endogene murine ASB zur Verfügung stehen, können keine Aussagen getroffen werden, ob speziell die endozytierte ASB nicht prozessiert wird, während endogene ASB, die über den Biosyntheseweg transportiert wird, proteolytisch reift.

Astrozyten weisen im Gegensatz zu Neuronen eine erhöhte Kapazität zur Dephosphorylierung von M6P-Resten internalisierter ASB auf (Abb. 3.18). Es wurde angenommen, dass die M6P-Phosphatase-Aktivität im Hirn niedriger ist, als in peripheren Organen (Jadot et al 1999). Die vorliegenden Daten zeigen, dass in neuronalen Zellen die lysosomalen Enzyme länger mit M6P-Resten versehen bleiben als in astroglären Zellen. Eine zentrale Rolle bei der Dephosphorylierung von M6P-Resten soll die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) spielen, die selbst M6P-abhängig zu Lysosomen transportiert wird, wo auch die Dephosphorylierung der lysosomalen Enzyme stattfinden soll (Sun et al 2008). Welche Bedeutung die Dephosphorylierung für die Stabilität, Aktivität und den intrazellulären Transport lysosomaler Enzyme hat, ist nicht klar. Es existieren Hinweise, dass eine große Anzahl von M6P-Resten eher hinderlich für den Transport von Proteinen zum Lysosom ist (Grubb et al 2008). Wenn native humane β -Glucuronidase einer GUS-defizienten Maus injiziert wurde, kam es nur zu einer geringen Reduktion des neuronalen Speichermaterials. Die chemische Modifikation der *N*-Glykosylierungen des Enzyms, durch die die Aufnahme unabhängig vom M6P-Rezeptor erfolgte, resultierte in höheren GUS-Enzymaktivitäten im Hirn der Mäuse und fast vollständiger Entspeicherung der neocorticalen und hippocampalen Neurone.

Auch in Neuronen einer α -Mannosidase-defizienten Maus kommt es nach Verabreichung einer hohen Dosis an α -Mannosidase mit niedriger M6P-Stöchiometrie zur Reduktion des Speichermaterials (Blanz et al 2008). Die α -Mannosidase scheint aufgrund des niedrigen M6P-Gehaltes M6P-Rezeptor-unabhängig aufgenommen zu werden. Welche Rezeptoren für die M6P-unabhängige Endozytose lysosomaler Enzyme verantwortlich sind, ist nicht bekannt.

In Astrozyten werden 50 % der ASB M6P-unabhängig aufgenommen (Abb. 3.15 & Abb. 3.18) und zu den Lysosomen transportiert, wo die proteolytische Prozessierung stattfindet. Um zu überprüfen, ob andere zuckererkennende Rezeptoren an der Endozytose von ASB beteiligt sind, wurde der Einfluss von Asialooromucoid (ASOR), Mannan II und Fucose sowie die Kombination mit M6P untersucht (Abb. 3.18). Über eine Endozytosezeit von 16 h wurden keine signifikanten Wirkungen dieser Substanzen über den M6P-Effekt hinaus

beobachtet. Möglicherweise erfolgt die M6P-unabhängige Internalisierung über Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren oder ein Teil der ASB wird unspezifisch durch Flüssigkeitspinocytose aufgenommen.

Eine verminderte Endozytose lysosomaler Enzyme kann aufgrund des uneffizienten Transports von ASB zu den Lysosomen als primärer Mechanismus für die Entstehung des Speichermaterials in Neuronen ausgeschlossen werden. Eher sind generelle Schritte während der frühen Phasen der AP2/Epsin1-vermittelten Rezeptor-abhängigen Internalisierung von Liganden in *nclf*-Neuronen reduziert.

Eine verminderte Endozytose bedeutet auch eine verringerte Aufnahme lebensnotwendiger Substanzen in die Zelle wie z.B. Transferrin, dem wichtigsten Eisen-transportierenden Protein. Eisen ist eine wichtige Komponente der Cytochrome a, b und c, der Cytochrom-Oxidase und von Eisen-Schwefel Komplexen bestimmter Proteine der mitochondrialen Elektronentransportketten (Andrews & Schmidt 2007). Ausserdem ist Eisen ein Cofaktor von Enzymen des Citrat-Zyklus (wie der Succinat-Dehydrogenase und der Aconitase), von lysosomalen Enzymen (wie der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)) (Lindqvist et al 1999) oder von Enzymen die an der Synthese von Neurotransmittern beteiligt sind (Ong & Halliwell 2004). Eisen-Mangel wurde in Mausmodellen für GM1- und GM2-Gangliosidose festgestellt (Jeyakumar et al 2009). Eisenzufuhr verlängerte das Überleben dieser Mäuse und verzögerte den Krankheitsbeginn, sowie den Verlust der motorischen Fähigkeiten. Ob es in *nclf*-Mäusen durch verminderte Transferrin-Endozytose zu einem Eisenmangel kommt, wurde bislang nicht untersucht. Eine schnelle Nachweismethode von Eisen in Geweben ist die Färbung mit *Perls Preußisch Blau*. Die Mäuse werden mit dieser Lösung perfundiert und der Eisengehalt der Organe könnte anhand der Blaufärbung miteinander verglichen werden.

Die Rezeptor-abhängige Endozytose ist bei vielen Signaltransduktionsvorgängen von entscheidender Bedeutung (Sorkin & von Zastrow 2009). Die Anzahl von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein gekoppelte Rezeptoren an der Zelloberfläche wird über die Endozytose reguliert, um die exzessive Ligand-induzierte Aktivierungen stromabwärts gelegener Effektoren zu verhindern. Ein Defekt in der Internalisierung in Neuronen könnte in der Fehlregulierung vieler Signalkaskaden resultieren.

In Neuronen spielt die Rezeptor-abhängige Endozytose besonders in der Synapse eine wichtige Rolle. Veränderungen in der Anzahl von Rezeptoren für Neurotransmitter justieren die Wirksamkeit und Erregbarkeit der Synapse und sind von den relativen Raten der Endozytose und Exozytose an der postsynaptischen Membran abhängig (Newpher & Ehlers 2008; Shepherd & Huganir 2007). Es wurde berichtet, dass eine verringerte Internalisierung von Glutamat-Rezeptoren Neurone für die von Glutamat induzierte Exzitotoxizität sensibilisiert (Rudinskiy et al 2009). Die Aktivierung von Glutamatrezeptoren, wie AMPA- und NMDA-Rezeptoren bewirken den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, das in Mitochondrien akkumulieren und zur Entstehung von oxidativem Stress und ATP-Mangel führen kann (Nicholls 2009). In CLN6-Tiermodellen wie dem OCL6-Schaf und der *nclf*-Maus wurde die Degeneration von GABAergen Neuronen beobachtet (Oswald et al 2008; Dr. Quitsch, UKE unveröffentlichte Daten). GABA wird durch die Glutamat-Decarboxylase aus Glutamat synthetisiert. Zusätzlich wurden verringerte Glutamat-Konzentrationen im Hirn von OCL6-Schafen gemessen (Pears et al 2007). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Glutamat-Haushalt in CLN6-defizienten Neuronen gestört ist. Es sind aber keine Studien veröffentlicht worden, die Sensitivität der *nclf*-Neuronen gegenüber Glutamat im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen überprüft hätten. Zusätzlich könnten Daten über die Expression und Verteilung der Glutamat-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Wildtyp- und *nclf*-Neuronen Hinweise geben, ob Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität zur Neurodegeneration bei CLN6-Defizienz beiträgt.

4.2.2 Veränderungen der Membranzusammensetzung als mögliche Ursache für die reduzierte rezeptorabhängige Endozytose in CLN6-defizienten Zellen

Sowohl Defekte im CLN6-Protein, als auch die kurzfristige siRNA-vermittelte Downregulation von CLN6 führen zu einer verminderten Endozytose. Dabei ist die AP2- und Epsin1-abhängige Internalisierung von Cargomolekülen betroffen. Die Expression der Adaptorproteine AP2 und Epsin1 ist jedoch in kultivierten Neuronen als auch im Cortex und Cerebellum von *nclf*-Mäusen sowie in *CLN6* siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Abb.

3.20 und Abb. 3.21). *CLN6* siRNA behandelte Zellen zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Expression und der Anzahl der TfR an der Zelloberfläche und der Gesamtzahl von MPR300 (Abb. 3.22). Die intrazelluläre Verteilung von TfR, Clathrin Heavy Chain, Dynamin II und AP2 und Espin1 wurde durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen untersucht (Abb. 3.26 und Abb. 3.27). Einzig AP2 war in *nclf*-Neuronen im Vergleich zum Wildtyp vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert. Ob diese Umverteilung von AP2 in *nclf*-Neuronen zu einer reduzierten Endozytoserate beitragen könnte, ist unklar. Dagegen spricht jedoch, dass die intrazelluläre Verteilung von Epsin nicht verändert war, obwohl die Epsin-abhängige Internalisierung von CD4-Rezeptor-Chimären ebenfalls stark verringert war. Diese Experimente schließen unterschiedliche Expressionen oder Verteilungen der endozytotischer Adaptorproteine oder von Rezeptoren als Ursache für die reduzierten Endozytoserate in *nclf*- oder *CLN6*-defizienten Zellen aus.

Daher liegt es nahe, dass Veränderungen in der Plasmamembran-Zusammensetzung für die reduzierte Endozytoserate Rezeptor und Liganden verantwortlich zu machen. So wurden Akkumulationen des Phosphatidylinositolphosphats PI(3,4,5)P3 in der Plasmamembran und in intrazellulären Membranen von *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA transfizierten HeLa-Zellen detektiert (Abb. 3.24). Ausserdem wiesen die Membranen einen erhöhten Cholesterin-Anteil auf (Abb.3.28, Abb. 3.30 und Abb. 3.31).

PI(3,4,5)P3 hat eine wichtige Funktion als Aktivator des AKT-Signalweges, der das Überleben der Zelle fördern. Der PI(3,4,5)P3-Gehalt ist in unstimulierten Zellen sehr gering (Wymann & Schreiber 2008). Die Aktivierung bestimmter Rezeptortyrosin-Kinasen, Integrin- und Cytokin-Rezeptoren, sowie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) induzieren einen vorübergehenden Anstieg von PI(3,4,5)P3 (Wymann & Schreiber 2008).

Die Akkumulation von PI(3,4,5)P3 konnte durch Immunfluoreszenzmikroskopie und durch PI(3,4,5)P3-Western Blot in *nclf*-Neuronen nachgewiesen werden. Die damit einhergehende Aktivierung des AKT-Signalweges konnte ebenfalls bestätigt werden. Welche weiteren Auswirkungen dieser Signalweg auf *nclf*-Neurone hat, konnte während dieser Arbeit nicht geklärt werden. *CLN6* siRNA-transfizierte HeLa-Zellen wiesen in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie ebenfalls erhöhte PI(3,4,5)P3-Mengen im Vergleich zu den Kontrollen auf.

Während PI(3,4,5)P3 in *nclf*-Neuronen sowohl an der Plasmamembran, als auch intrazellulär lokalisiert ist, ist PI(3,4,5)P3 *CLN6* siRNA transfizierten Zellen vorwiegend in vergrößerten vesikulären Strukturen detektierbar, von denen nicht bekannt ist, ob sie endosomalen oder lysosomalen Ursprungs sind. Im PI(3,4,5)P3-Western Blot konnte jedoch ein Anstieg der PI(3,4,5)P3-Konzentration in *CLN6* siRNA-transfizierten Zellen, gegenüber der in Kontroll siRNA-transfizierten Zellen, nicht bestätigt werden. Im Vergleich zu untransfizierten HeLa-Zellen wiesen sowohl Kontroll siRNA als auch *CLN6* siRNA-transfizierte HeLa-Zellen einen massiven Anstieg im PI(3,4,5)P3-Gehalt auf. Die Transfektion allein führt also bereits zur gesteigerten Synthese von PI(3,4,5)P3. Möglicherweise begünstigt eine kompensatorisch erhöhte Synthese von PI(3,4,5)P3 das Überleben transfizierter Zellen. Die Akkumulation von PI(3,4,5)P3 war nur in den Zellen zu beobachten, in denen die siRNA-Behandlung die *CLN6*-Expression nahezu vollständig unterdrückte. Dies weist auf eine Korrelation zwischen PI(3,4,5)P3-Anstieg und *CLN6*-Defizienz hin.

In Astrozyten konnten dagegen keine Unterschiede in der PI(3,4,5)P3-Konzentration oder in der AKT-Aktivierung zwischen Wildtyp- und *nclf*-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.25). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass besonders Neuronen auf *CLN6* angewiesen sind.

Klasse I Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) synthetisieren PI(3,4,5)P3 durch Phosphorylierung von PI(4,5)P2. Die Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P3 durch die Phosphatasen PTEN, SHIP1 und SHIP2 verhindert die permanente Aktivierung von PI(3,4,5)P3-induzierten Signalwegen (Wymann & Schreiner 2008). Der Anstieg von PI(3,4,5)P3 könnte demnach entweder durch eine erhöhte Aktivität von PI3K oder einer verminderten Aktivität von PTEN oder SHIP1 und SHIP2 hervorgerufen werden. Da jedoch der PI(4,5)P2-Gehalt in Wildtyp- und *nclf*-Neuronen nicht beeinflusst ist, ist davon auszugehen, dass eher ein verminderter Abbau als eine gesteigerte Synthese zur PI(3,4,5)P3-Akkumulation führt.

Um diese Frage zu klären, könnte die Lokalisation und Expression von PTEN und SHIP2 durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie, Western Blot-Analysen und Aktivitätsbestimmungen untersucht werden (Cai & Semenza 2005).

Veränderungen im Gleichgewicht von PI(3,4,5)P3-Synthese und Abbau führen *in vivo* zu klinischen neurologischen Symptomen, wie mentaler Retardierung,

Ataxie und Krämpfen, wie sie auch bei der CLN6-Erkrankung auftreten (Backman et al 2001).

Es wurde berichtet, dass PI(3,4,5)P3 auf molekularer Ebene wichtig ist für die Axon-Ausrichtung, Synptogense, synaptische Übertragung und die postsynaptische Akkumulation von AMPA-Glutamatrezeptoren in hippocampalen Neuronen (Arendt et al 2010; Jiang et al 2005; Polleux & Snider 2010; Shi et al 2003). Deshalb sollten Veränderungen im Phosphatidylinositolphosphat-Stoffwechsel besonders an Neuronen von *nclf*-Mäusen für die schon beschriebenen Parameter (Axon, Glutamatrezeptoren) detailliert untersucht werden, um zu klären, ob diese Phospholipide zur Pathogenese der Erkrankung beitragen.

Die Interaktion von PI(3,4,5)P3 mit verschiedenen Proteinen der Endozytosemaschinerie konnte bereits nachgewiesen werden (Catimel et al, 2009). In *nclf*-Neuronen colokalisiert das Adaptorprotein Epsin1 teilweise mit PI(3,4,5)P3-positiven Strukturen (Abb. 3.26). Da kein polyklonaler Antikörper gegen AP2 zur Verfügung stand, kann keine Aussage getroffen werden, ob dies auch für AP2 zutrifft. Möglicherweise hat PI(3,4,5)P3 eine regulatorische Funktion bei der Endozytose durch Rekrutierung von GTPasen der Ras-, Rho-, Arf-, und Rab Familie an die Plasmamembran (Heo et al 2006) oder durch Modulation der Aktivität von Arf GAPs der ARAP-Familie (Campa et al 2009; Miura et al 2002). Arf-GAPs bewirken die Inaktivierung von Arf-Proteinen und regulieren so den Vesikel-Transport an verschiedenen Orten der Zelle. Ein erhöhter PI(3,4,5)P3-Gehalt der Zelle inhibiert demnach die Endozytose und den Vesikeltransport innerhalb der Zelle.

In polaren Epithelzellen akkumuliert PI(3,4,5)P3 in *Recycling*-Endosomen und rekrutiert das zelltypspezifische Adaptorprotein AP1B (Fields et al 2010). Die Depletion von PI(3,4,5)P3 resultiert in der Dissoziation von AP1B von *Recycling*- Endosomen und der Fehlsortierung von AP1B-abhängigen Cargoproteinen. Da Neurone ebenfalls polare Zellen darstellen, ist es denkbar, dass PI(3,4,5)P3 in neuronalen Zellen zur Fehlsortierung löslicher als auch integraler lysosomaler Proteine und damit zur lysosomalen Dysfunktion und zur Entstehung des Speichermaterials beiträgt.

Um zu klären, ob PI(3,4,5)P3 die TfR-, CD4-Chimär-Rezeptor- und MPR300-vermittelte Endozytose in *nclf*-Neuronen inhibiert, könnten *Rescue*-Experimente

an *nclf*-Neuronen durchgeführt werden, bei denen durch PI3K-Inhibitoren wie Wortmannin oder LY294002 die Konzentration an PI(3,4,5)P3 reduziert wird. Dadurch wäre die Normalisierung der Endozytoseraten der TfR und CD-Rezeptor-Chimären bis zum Erreichen der Situation in Wildtp-Neuronen zu erwarten. Ob und wie CLN6 eine Rolle bei der PI(3,4,5)P3-Synthese in Neuronen spielt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Erhöhter Cholesteringehalt in *nclf*-Neuronen

Zusätzlich zur PI(3,4,5)P3-Akkumulation wurde in *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA behandelten Zellen ein Anstieg des Cholesterin-Gehaltes detektiert (Abb. 3.28, Abb. 3.30 und Abb. 3.31). Cholesterin ist in *nclf*-Neuronen vermehrt in der Plasmamembran und in LAMP1-positiven späten Endosomen bzw. Lysosomen lokalisiert. In *CLN6* siRNA-transfizierten HeLa-Zellen hingegen, ist Cholesterin vorwiegend intrazellulär, in verschieden großen vesikulären Strukturen detektierbar, die nur teilweise LAMP1-positiv sind. Da in *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA-transfizierten Zellen die intrazellulären Cholesterin-Akkumulationen auch in direkter Nähe zum Zellkern liegen, könnte das ER ebenfalls betroffen sein.

Obwohl die Cholesterin-Synthese im ER unter Beteiligung von mehr als 20 integralen Membranproteinen stattfindet (Ikonen 2008), macht der Cholesteringehalt des ERs nur 1 % des Gesamtgehaltes der Zelle aus (Lange 1991). Das liegt daran, dass Cholesterin sehr schnell in einem nicht-vesikulären Transportmechanismus zum Golgi-Apparat und weiter zur Plasmamembran transportiert wird, indem möglicherweise sterolbindende, cytosolische Proteine involviert sind (Baumann et al 2005; Heino et al 2000). Alternativ kann Cholesterin auch in die Endosomen gelangen (Cruz & Chang 2000). Neben dem Syntheseweg endozytieren Zellen einen Teil des Cholesterins. Über den LDL-Rezeptor gelangt an LDL (*Low Density Lipoprotein*) gebundenes Cholesterin in die Endosomen. Von dort aus kann Cholesterin ins ER, in den Golgi-Apparat oder an die Plasmamembran transportiert werden. Die Membranen von Lysosomen sind normalerweise arm an Cholesterin, um den Abbau von Sphingolipiden zu begünstigen (Kolter & Sandhoff 2005). Die Akkumulation von Cholesterin in LAMP1-positiven Lysosomen in *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA-transfizierten HeLa-Zellen könnten somit zur Anreicherung

von Sphingolipiden im lysosomalen Speicher material führen, wie es auch bei der Niemann-Pick-Krankheit des Typs C zu beobachten ist (Sun et al 2001).

Da Cholesterin die Membranfluidität verringert (Yeagle 1985), wird die Geschwindigkeit der lateralen Diffusion von Proteinen in der Membran herabgesetzt und Protein-Protein-Wechselwirkungen werden reduziert. Gleichzeitig wird die Permeabilität der Membran für polare Moleküle erniedrigt (Simons & Vaz 2004). Eine erniedrigte Membranfluidität führt dazu, dass sich Vesikel langsamer abschnüren können. Somit könnten erhöhte Cholesterinkonzentrationen in *CLN6*-defizienten siRNA-behandelten Zellen und *nclf*-Neuronen eine Ursache der verminderten Endozytose von Rezeptoren sein.

Zudem beeinflusst Cholesterin die Funktion bestimmter RAB-Proteine, die zur Familie der GTPasen gehören und an unterschiedlichen Orten der Zelle den Vesikelfluß regulieren (Stenmark 2009). Von RAB4, RAB7 und RAB9 ist bekannt, dass ihre Aktivität durch erhöhte Cholesterin-Konzentrationen beeinflusst wird (Chen et al 2008; Choudhury et al 2002; Choudhury et al 2004; Lebrand et al 2002). Cholesterol inhibiert die Dissoziation dieser RAB-Proteine durch den GDP dissociation inhibitor (GDI). RAB5 ist davon allerdings nicht betroffen (Choudhury et al 2004). Umgekehrt bewirkt die Überexpression von RAB4, RAB7, oder RAB8 eine Reduktion des Cholesteringehaltes in Niemann-Pick-Fibroblasten (Linder et al 2007). In *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA-transfizierten Zellen konnte sowohl eine Umverteilung, als auch eine verminderte Expression von RAB4 nachgewiesen werden (Abb. 3.28, Abb. 3.29, Abb.3.30 und Abb. 3.32). RAB4 ist in den frühen Endosomen und in Recycling-Endosomen lokalisiert, wo es für den schnellen Transport des TfR zur Plasmamembran wichtig ist (Choudhury et al 2004). Die verminderte Aufnahme von Transferrin in *CLN6* siRNA behandelten Zellen und *nclf*-Neuronen könnte also zum einen durch die verlangsamte Endozytose aufgrund der verminderten Membranfluidität und zum anderen durch eine beeinträchtigte endosomale Sortierung verursacht sein. Aufgrund der reduzierten RAB4-Expression und der Umverteilung von RAB4 an der Plasmamembran, könnte der Transport des Transferrin-Rezeptors über RAB11-positive Endosomen stattfinden, was jedoch mehr Zeit beansprucht. In humanen Fibroblasten führt die Inhibition von RAB4 oder die Akkumulation von Cholesterin ebenfalls zu

einer Fehlsortierung und verminderten Endozytose von Transferrin (Choudhury et al 2004).

Es ist anzunehmen, dass auch die erniedrigte Endozytoserate der Arylsulfatase B (ASB) in *nclf*-Neuronen, während der ersten 40 min, wahrscheinlich durch den erhöhten Cholesteringehalt der Zellen bedingt ist. Da die MPR300-abhängige ASB-Endozytose bereits in RAB5-positiven Vesikeln endet, ist ein großer Einfluss von RAB4 auf die endosomale Sortierung der ASB während dieser Experimente auszuschließen. Es konnten keine Veränderungen in der Expression und Lokalisation von RAB5 festgestellt werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass RAB5 von Cholesterin nicht beeinflusst wird (Choudhury et al 2004).

Um die CLN6-Erkrankung und die Entstehung des Speichermaterials besser verstehen zu können, ist die Untersuchung anderer RAB-Proteine notwendig. Da die Aktivität von RAB7 und RAB9 ebenfalls durch Cholesterin inhibiert wird (Ganley & Pfeffer 2006; Lebrand et al 2002), sind auch Veränderungen im Transport bei denen diese Proteine beteiligt sind, zu erwarten. Ob CLN6 direkt an der Synthese oder dem Transport von Cholesterin beteiligt ist, ist unbekannt. Durch die Lokalisation von CLN6 im ER wäre es jedoch denkbar, dass es an der Erhaltung der Cholesterin-Homöostase mitwirkt. Die Cholesterin-Synthese wird im Normalfall entweder durch die inhibitorische Wirkung der Endprodukte auf die Enzyme der Cholesterinsynthese oder durch die verminderte Transkription der Synthesegene inhibiert (Abb. 4.2) (Ikonen 2008). Das *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP) ist ein ER-residentes Protein, das bei Sterol-Mangel aktiviert wird, indem es zum Golgi-Apparat transportiert und dort proteolytisch prozessiert wird (Abb. 4.2) (Goldstein et al 2006). Ein freigesetztes Fragment wird in den Nukleus importiert, wo es die Transkription von Cholesterin-synthetisierenden Enzymen und anderen von Sterol regulierten Genen, die z.B den LDL-Rezeptor kodieren, induziert.

Real Time-PCR-Analysen dieser Gene wären deshalb sinnvoll. Ausserdem könnte die Lokalisation und Expression von SREBP in *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA-transfizierten Zellen untersucht werden, um zu klären, ob der Export von SREBP aus dem ER gestört ist oder SREBP vermehrt prozessiert wird.

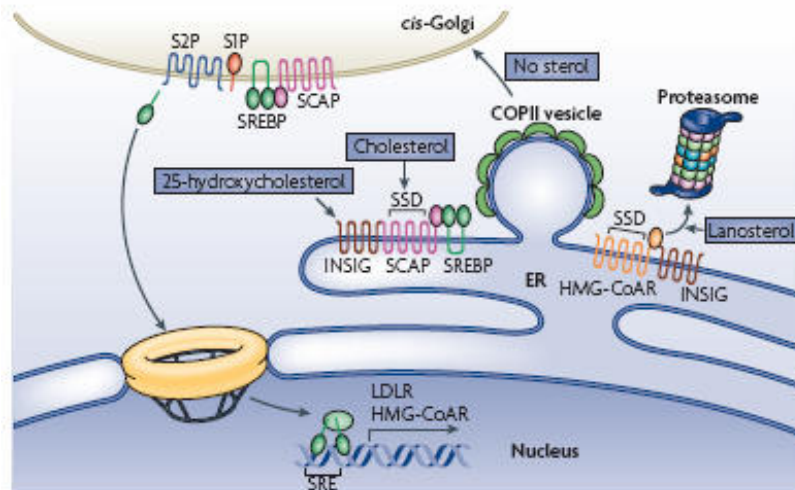


Abb. 4.2: Regulation der Cholesterin-Synthese durch SREBP und Sterole. Bei Cholesterinmangel, verhindert INSIG nicht mehr den COPII-abhängigen Transport von SREBP/SCAP-Komplex zum *cis*-Golgi-Netzwerk. Dort wird SREBP proteolytisch gespalten, wodurch ein Transkriptionsfaktor entsteht, der im Nucleus die Expression der Sterol-regulierten Gene (z.B. Hydroxymethylglutaryl CoA-Reduktase (HMG-CoAR) und LDLR) bewirkt. HMG-CoAR wird zudem posttranslational durch Sterol reguliert, indem die Bindung von Sterolen und INSIG an HMG-CoAR den Abbau durch das Proteasom ermöglicht. SSD: sterol-sensing domain; SRE: sterol regulatory element (aus Ikonen 2008)

Die SREBP-vermittelte Transkription und damit einhergehende Synthese von Cholesterin wird u.a. von der PI(3,4,5)P3-abhängigen Aktivierung der AKT-Signalweges induziert (Porstmann et al 2008). Die erhöhte PI(3,4,5)P3-Konzentrationen in *nclf*-Neuronen und *CLN6* siRNA-transfizierten Zellen könnten somit eine Ursache des höheren Cholesterin-Gehaltes sein.

Eine nähere Untersuchung von Cholesterin-transportierenden Proteinen wie z.B. die bei der Niemann-Pick-Krankheit betroffenen Proteine NPC1 und NPC2 wäre ebenfalls nahe liegend, da diese Erkrankungen einige Gemeinsamkeiten aufweisen.

Veränderungen des Cholesterinstoffwechsels wurden auch in der PPT1 (CLN1)-defizienten Mäusen beschrieben (Lyly et al 2008). Auch in kultivierten neuronalen Zellen von Cathepsin D (CLN10)-defizienten Mäusen wurden erhöhte Cholesterin-Konzentrationen detektiert (Jabs et al 2008). Schließlich wurden Cholesterin-Akkumulationen auch in Fibroblasten von CLN6-Patienten beschreiben (Teixeira et al 2006). Möglicherweise stellen Cholesterinakkumulationen, der damit inhibierte Abbau von Sphingolipiden und die Inhibierung von RAB-Proteinen ein gemeinsames Merkmal unterschiedlicher lysosomaler Speichererkrankungen dar, die zur Neurodegeneration führen.

5. Zusammenfassung

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL) umfassen eine Gruppe neurodegenerativer, lysosomaler Speichererkrankungen im Kindesalter, denen bisher neun *CLN*-Gendefekte zugrunde liegen. *CLN6* kodiert für ein nicht-glykosyliertes, ER-residentes, polytopes Transmembranprotein unbekannter Funktion, das ubiquitär exprimiert wird. Defekte im *CLN6*-Protein, die die spätinfantile variante Form der NCL verursachen, führen zu einer veränderten Endozytose von lysosomalen Enzymen und spezifisch zum Absterben neuronaler Zellen über unbekannte Mechanismen.

- In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener krankheitsrelevanter Mutationen im *CLN6*-Gen auf die Stabilität, den Abbau, die Dimerisierung und die Lokalisation der mutierten Proteine untersucht. Die Expressionsanalyse zeigte, dass mutierte *CLN6*-Proteine verringerte Halblebenszeiten aufweisen und vorzeitig durch Proteasomen und lysosomale Hydrolasen abgebaut werden. Diese Abbauege sind ausreichend, um die Akkumulation und Aggregation der mutierten *CLN6*-Polypeptide im ER und das Auslösen von ER-Stress zu verhindern. Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie und Crosslink-Analysen zeigten, dass mit Ausnahme der Mutante *CLN6* p.R106PfsX26 keine der untersuchten *CLN6*-Mutanten in der intrazellulären Lokalisation oder im Dimerisierungsverhalten verändert sind.
- Zum anderen zeigten Transportanalysen an neuronalen Zellen aus Wildtyp- und *nclf*-Mäusen, einem natürlichen Tiermodell der humanen *CLN6*-Krankheit, dass die Internalisierung verschiedener Liganden (Transferrin oder die lysosomale Arylsulfatase B (ASB)) und Cargo-Rezeptoren (ubiquitinylierte CD4-Rezeptorchimären) vermindert sind. Diese Ergebnisse konnten in *CLN6* siRNA transfizierten Zellen bestätigt werden. Als molekulare Ursachen wurden Veränderungen der Membranzusammensetzung, wie erhöhte Spiegel des Phosphatidylinositolphosphats PI(3,4,5)P3 und Cholesterin, sowie die

Reduktion und Umverteilung der GTPase RAB4 nachgewiesen. Dabei aktiviert PI(3,4,5)P3 möglicherweise den AKT-Signalweg, über den die Cholesterinsynthese gesteigert werden kann.

- Überraschenderweise zeigten Aufnahmestudien mit Fluorophor- oder [¹²⁵I]-markierter ASB an kultivierten neuronalen Zellen der Maus, dass die Sulfatase in RAB5-positiven frühen endosomalen Strukturen akkumuliert und LAMP1-positive Lysosomen nicht erreicht. Die Lokisationsaufnahmen wurden biochemisch durch die fehlende proteolytische Reifung der ASB, die nur in den Lysosomen erfolgen kann, bestätigt. In murinen Astrozyten waren der Transport zu den Lysosomen und die Prozessierung der internalisierten ASB jedoch nachweisbar.

Die Daten zeigen, dass die Mutationen in *CLN6* zu reduzierten Halblebenszeiten der Proteine führen, die im schnellen Abbau begründet liegen. Veränderungen im Phosphatidylinositolphosphat- und Cholesterinstoffwechsel beeinflussen die Zusammensetzung von Membranen neuronaler Zellen so, dass sekundär Transportwege verschiedener Rezeptoren zwischen Plasmamembran und Lysosomen, sowie Sortierungsprozesse in Endosomen gestört sind. Eine mögliche Beteiligung von *CLN6* an der Regulation der Cholesterin-Homöostase ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

- Abe N, Inoue T, Galvez T, Klein L, Meyer T. 2008. Dissecting the role of PtdIns(4,5)P₂ in endocytosis and recycling of the transferrin receptor. *J Cell Sci* 121:1488-94
- Aguilar RC, Ohno H, Roche KW, Bonifacino JS. 1997. Functional domain mapping of the clathrin-associated adaptor medium chains mu1 and mu2. *J Biol Chem* 272:27160-6
- Andrews NC, Schmidt PJ. 2007. Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol* 69:69-85
- Arendt KL, Royo M, Fernandez-Monreal M, Knafo S, Petrok CN, et al. 2010. PIP₃ controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat Neurosci* 13:36-44
- Barriere H, Nemes C, Du K, Lukacs GL. 2007. Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol Biol Cell* 18:3952-65
- Barriere H, Nemes C, Lechardeur D, Khan-Mohammad M, Fruh K, Lukacs GL. 2006. Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic* 7:282-97
- Baumann NA, Sullivan DP, Ohvo-Rekila H, Simonot C, Pottekat A, et al. 2005. Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry* 44:5816-26
- Benedict JW, Getty AL, Wishart TM, Gillingwater TH, Pearce DA. 2009. Protein product of CLN6 gene responsible for variant late-onset infantile neuronal ceroid lipofuscinosis interacts with CRMP-2. *J Neurosci Res* 87:2157-66
- Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE. 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:517-68
- Bronson RT, Donahue LR, Johnson KR, Tanner A, Lane PW, Faust JR. 1998. Neuronal ceroid lipofuscinosis (nclf), a new disorder of the mouse linked to chromosome 9. *Am J Med Genet* 77:289-97
- Brown MS, Anderson RG, Goldstein JL. 1983. Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32:663-7
- Cai Z, Semenza GL. 2005. PTEN activity is modulated during ischemia and reperfusion: involvement in the induction and decay of preconditioning. *Circ Res* 97:1351-9

- Campa F, Yoon HY, Ha VL, Szentpetery Z, Balla T, Randazzo PA. 2009. A PH domain in the Arf GTPase-activating protein (GAP) ARAP1 binds phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and regulates Arf GAP activity independently of recruitment to the plasma membranes. *J Biol Chem* 284:28069-83
- Cao Y, Espinola JA, Fossale E, Massey AC, Cuervo AM, et al. 2006. Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 281:20483-93
- Catimel B, Yin MX, Schieber C, Condrón M, Patsiouras H, et al. 2009. PI(3,4,5)P3 Interactome. *J Proteome Res* 8:3712-26
- Chen H, Yang J, Low PS, Cheng JX. 2008. Cholesterol level regulates endosome motility via Rab proteins. *Biophys J* 94:1508-20
- Cho SK, Gao N, Pearce DA, Lehrman MA, Hofmann SL. 2005. Characterization of lipid-linked oligosaccharide accumulation in mouse models of Batten disease. *Glycobiology* 15:637-48
- Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, et al. 2002. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin Invest* 109:1541-50
- Choudhury A, Sharma DK, Marks DL, Pagano RE. 2004. Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. *Mol Biol Cell* 15:4500-11
- Clapham DE. 2007. Calcium signaling. *Cell* 131:1047-58
- Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, Esekogwu V, Jing SQ, et al. 1990. Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* 63:1061-72
- Cook RW, Jolly RD, Palmer DN, Tammen I, Broom MF, McKinnon R. 2002. Neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep. *Aust Vet J* 80:292-7
- Cooper JD. 2003. Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis. *Curr Opin Neurol* 16:121-8
- Cooper JD, Russell C, Mitchison HM. 2006. Progress towards understanding disease mechanisms in small vertebrate models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:873-89
- Cruz JC, Chang TY. 2000. Fate of endogenously synthesized cholesterol in Niemann-Pick type C1 cells. *J Biol Chem* 275:41309-16
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2258-62

- Davis CG, Lehrman MA, Russell DW, Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL. 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 45:15-24
- Dittman J, Ryan TA. 2009. Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:133-60
- Drögemüller C, Wohlke A, Distl O. 2005. Characterization of candidate genes for neuronal ceroid lipofuscinosis in dog. *J Hered* 96:735-8
- Dyken PR. 1989. The neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Child Neurol* 4:165-74
- Fields IC, King SM, Shteyn E, Kang RS, Folsch H. 2010. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate localization in recycling endosomes is necessary for AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells. *Mol Biol Cell* 21:95-105
- Frand AR, Cuozzo JW, Kaiser CA. 2000. Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* 10:203-10
- Ganley IG, Pfeffer SR. 2006. Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J Biol Chem* 281:17890-9
- Gao H, Boustany RM, Espinola JA, Cotman SL, Srinidhi L, et al. 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:S15-9
- Goebel HH, Wisniewski KE. 2004. Current state of clinical and morphological features in human NCL. *Brain Pathol* 14:61-9
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124:35-46
- Greene B, Liu SH, Wilde A, Brodsky FM. 2000. Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic* 1:69-75
- 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 (Pt 1):269-72
- Haltia M. 2006. The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present. *Biochim Biophys Acta* 1762:850-6

- Hannan LA, Newmyer SL, Schmid SL. 1998. ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. *Mol Biol Cell* 9:2217-29
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, et al. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-9
- Heine C, Koch B, Storch S, Kohlschutter A, Palmer DN, Braulke T. 2004. Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A. *J Biol Chem* 279:22347-52
- Heine C, Quitsch A, Storch S, Martin Y, Lonka L, et al. 2007. Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Mol Membr Biol* 24:74-87
- Heine C, Tynnela J, Cooper JD, Palmer DN, Elleder M, et al. 2003. Enhanced expression of manganese-dependent superoxide dismutase in human and sheep CLN6 tissues. *Biochem J* 376:369-76
- Heino S, Lusa S, Somerharju P, Ehnholm C, Olkkonen VM, Ikonen E. 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8375-80
- Heo WD, Inoue T, Park WS, Kim ML, Park BO, et al. 2006. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 314:1458-61
- Herbst JJ, Opresko LK, Walsh BJ, Lauffenburger DA, Wiley HS. 1994. Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J Biol Chem* 269:12865-73
- Hershko A, Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807
- Heuser JE, Keen J. 1988. Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J Cell Biol* 107:877-86
- Hofmann K, Falquet L. 2001. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26:347-50
- Huang CL. 2007. Complex roles of PIP2 in the regulation of ion channels and transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1761-5
- Ikonen E. 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:125-38
- Ikonen E, Holtta-Vuori M. 2004. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol* 15:445-54

- Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291:1047-51
- Jabs S, Quitsch A, Kakela R, Koch B, Tyynela J, et al. 2008. Accumulation of bis(monoacylglycero)phosphate and gangliosides in mouse models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurochem* 106:1415-25
- Jadot M, Lin L, Sleat DE, Sohar I, Hsu MS, et al. 1999. Subcellular localization of mannose 6-phosphate glycoproteins in rat brain. *J Biol Chem* 274:21104-13
- Jalanko A, Braulke T. 2009. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793:697-709
- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. 2005. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators. *Cell* 120:123-35
- 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
- Kirchhausen T. 2000. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69:699-727
- Kolter T, Sandhoff K. 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:81-103
- Kurze AK, Galliciotti G, Heine C, Mole SE, Quitsch A, Braulke T. 2010. Pathogenic mutations cause rapid degradation of lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Hum Mutat* 31:E1163-74
- Kyttälä A, Heinonen O, Peltonen L, Jalanko A. 1998. Expression and endocytosis of lysosomal aspartylglucosaminidase in mouse primary neurons. *J Neurosci* 18:7750-6
- Kyttälä A, Lahtinen U, Braulke T, Hofmann SL. 2006. Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762:920-33
- Lange Y. 1991. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J Lipid Res* 32:329-39
- Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, et al. 1999. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3712-7

- Lebrand C, Corti M, Goodson H, Cosson P, Cavalli V, et al. 2002. Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J* 21:1289-300
- Legendre-Guillemain V, Wasiak S, Hussain NK, Angers A, McPherson PS. 2004. ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci* 117:9-18
- Levine B, Kroemer G. 2009. Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ* 16:1-2
- Linder MD, Uronen RL, Holtta-Vuori M, van der Sluijs P, Peranen J, Ikonen E. 2007. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell* 18:47-56
- Lyly A, von Schantz C, Heine C, Schmiedt ML, Sipila T, et al. 2009. Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biol* 10:83
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-74
- Mayhew IG, Jolly RD, Pickett BT, Slack PM. 1985. Ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis of blindness in the ovine model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 11:273-90
- McGraw TE, Maxfield FR. 1990. Human transferrin receptor internalization is partially dependent upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain. *Cell Regul* 1:369-77
- Millard SM, Wood SA. 2006. Riding the DUBway: regulation of protein trafficking by deubiquitylating enzymes. *J Cell Biol* 173:463-8
- Miura K, Jacques KM, Stauffer S, Kubosaki A, Zhu K, et al. 2002. ARAP1: a point of convergence for Arf and Rho signaling. *Mol Cell* 9:109-19
- Mizushima N, Klionsky DJ. 2007. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 27:19-40
- Mole SE, Michaux G, Codlin S, Wheeler RB, Sharp JD, Cutler DF. 2004. CLN6, which is associated with a lysosomal storage disease, is an endoplasmic reticulum protein. *Exp Cell Res* 298:399-406
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-94
- Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. 2003. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 162:909-18
- Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekens R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377:1-16

- Müller-Loennies S, Galliciotti G, Kollmann K, Glatzel M, Braulke T. 2010. A Novel Single-Chain Antibody Fragment for Detection of Mannose 6-Phosphate-Containing Proteins. Application in Mucopolidosis Type II Patients and Mice. *Am J Pathol*
- Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, Gill GN, Sorkin A. 1999. Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J* 18:2489-99
- Nicholls DG. 2009. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. *Biochem Soc Trans* 37:1385-8
- Nickerson DP, Russell MR, Odorizzi G. 2007. A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep* 8:644-50
- Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, et al. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269:1872-5
- Omary MB, Trowbridge IS. 1981. Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J Biol Chem* 256:12888-92
- Ong WY, Halliwell B. 2004. Iron, atherosclerosis, and neurodegeneration: a key role for cholesterol in promoting iron-dependent oxidative damage? *Ann N Y Acad Sci* 1012:51-64
- Oresic K, Mueller B, Tortorella D. 2009. Cln6 mutants associated with neuronal ceroid lipofuscinosis are degraded in a proteasome-dependent manner. *Biosci Rep* 29:173-81
- Oswald MJ, Palmer DN, Kay GW, Barwell KJ, Cooper JD. 2008. Location and connectivity determine GABAergic interneuron survival in the brains of South Hampshire sheep with CLN6 neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 32:50-65
- Oswald MJ, Palmer DN, Kay GW, Shemilt SJ, Rezaie P, Cooper JD. 2005. Glial activation spreads from specific cerebral foci and precedes neurodegeneration in presymptomatic ovine neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6). *Neurobiol Dis* 20:49-63
- Owen DJ. 2004. Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem Soc Trans* 32:1-14
- Owen DJ, Vallis Y, Pearse BM, McMahon HT, Evans PR. 2000. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J* 19:4216-27
- Padron D, Wang YJ, Yamamoto M, Yin H, Roth MG. 2003. Phosphatidylinositol phosphate 5-kinase Ibeta recruits AP-2 to the plasma membrane and regulates rates of constitutive endocytosis. *J Cell Biol* 162:693-701

- Page LJ, Robinson MS. 1995. Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J Cell Biol* 131:619-30
- Pears MR, Salek RM, Palmer DN, Kay GW, Mortishire-Smith RJ, Griffin JL. 2007. Metabolomic investigation of CLN6 neuronal ceroid lipofuscinosis in affected South Hampshire sheep. *J Neurosci Res* 85:3494-504
- Pearse BM, Smith CJ, Owen DJ. 2000. Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr Opin Struct Biol* 10:220-8
- Polleux F, Snider W. 2010. Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001925
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, et al. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab* 8:224-36
- Raiborg C, Stenmark H. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458:445-52
- Rohde G, Wenzel D, Haucke V. 2002. A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 158:209-14
- Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. 2010. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:103-12
- Russell C, Henderson G, Jevon G, Matlock T, Yu J, et al. 1998. Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clin Genet* 53:349-61
- Schmid SL. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 66:511-48
- Schneider C, Sutherland R, Newman R, Greaves M. 1982. Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9. *J Biol Chem* 257:8516-22
- Shacka JJ, Klocke BJ, Young C, Shibata M, Olney JW, et al. 2007. Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. *J Neurosci* 27:2081-90
- Shi SH, Jan LY, Jan YN. 2003. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112:63-75
- Simons K, Vaz WL. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33:269-95

- Skwarek LC, Boulianne GL. 2009. Great expectations for PIP: phosphoinositides as regulators of signaling during development and disease. *Dev Cell* 16:12-20
- Snyder M, Huang XY, Zhang JJ. 2008. Identification of novel direct Stat3 target genes for control of growth and differentiation. *J Biol Chem* 283:3791-8
- Sorkin A, von Zastrow M. 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:609-22
- Steckel F, Hasilik A, von Figura K. 1983. Biosynthesis and maturation of arylsulfatase B in normal and mutant cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 258:14322-6
- Stengel C. 1826. Account of a singular illness among four siblings in the vicinity of Roraas. In *Ceroid-lipofuscinosis (Batten's Disease)*. ed. D Armstrong, N Koppang, JA Rider, pp. 17-9: Elsevier Biomedical Press 1982
- Stenmark H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-25
- Sun X, Marks DL, Park WD, Wheatley CL, Puri V, et al. 2001. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of NPC1. *Am J Hum Genet* 68:1361-72
- Tammen I, Houweling PJ, Frugier T, Mitchell NL, Kay GW, et al. 2006. A missense mutation (c.184C>T) in ovine CLN6 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep whereas affected South Hampshire sheep have reduced levels of CLN6 mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1762:898-905
- Teixeira CA, Lin S, Mangas M, Quinta R, Bessa CJ, et al. 2006. Gene expression profiling in vLINCL CLN6-deficient fibroblasts: Insights into pathobiology. *Biochim Biophys Acta* 1762:637-46
- ter Haar E, Harrison SC, Kirchhausen T. 2000. Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1096-100
- Tessitore A, del PMM, Sano R, Ma Y, Mann L, et al. 2004. GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Mol Cell* 15:753-66
- Tyynelä J, Palmer DN, Baumann M, Haltia M. 1993. Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *FEBS Lett* 330:8-12
- Walkley SU, March PA, Schroeder CE, Wurzelmann S, Jolly RD. 1995. Pathogenesis of brain dysfunction in Batten disease. *Am J Med Genet* 57:196-203

- Wenk MR, De Camilli P. 2003. Assembly of endocytosis-associated proteins on liposomes. *Methods Enzymol* 372:248-60
- 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 RE, Aberg L, Autti T, Goebel HH, Kohlschutter A, Lonnqvist T. 2006. Diagnosis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: an update. *Biochim Biophys Acta* 1762:865-72
- Wyman MP, Schneider R. 2008. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:162-76
- Yang JW, Rodrigo R, Felipe V, Lubec G. 2005. Proteome analysis of primary neurons and astrocytes from rat cerebellum. *J Proteome Res* 4:768-88
- Ybe JA, Greene B, Liu SH, Pley U, Parham P, Brodsky FM. 1998. Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *EMBO J* 17:1297-303
- Yeagle PL. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 822:267-87
- Zerial M, McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-17
- Zhang K, Kaufman RJ. 2006. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66:S102-9
- Zhang Z, Lee YC, Kim SJ, Choi MS, Tsai PC, et al. 2006. Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency mediates the activation of the unfolded protein response and neuronal apoptosis in INCL. *Hum Mol Genet* 15:337-46

7 Anhang

Primer und siRNA Oligionukleotide

Primer

Die Mutationen wurden mit Hilfe der folgenden Primern in das humane *CLN6* eingebracht:

Del154for	5'-CGTGAGAACCCCATCAAGAATCTCAAGCCG-3'
Del154rev,	5'-CGGCTTGAGATTCTTGATGGGGTTCTCACG-3'
G123Dfor	5'-TCTTCATCATGGATGCCAGCATCC-3'
G123Drev	5'-GGATGCTGGCATCCATGATGAAGA-3'
316insCfor	5'-AGCGGTCCCCCGCACCCCT-3'
316insCrev	5'-AGGGTGCGGGGGGGACCGCT-3'

Zur Genotypisierung von *nclf*-Mäusen mittels PCR und Sequenzierung wurden die folgenden Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert:

CLN6Intron4for	5'-GAACTCACAACCTCCAGAGGGAC-3'
CLN6Exon4rev	5'-AGTCTCCGGCTTGAGGTTCTTG-3'

siRNA Oligonukleotide

Die siRNAs wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Sequenz der Universal Kontroll siRNA steht nicht zu Verfügung.

<i>CLN6</i> siRNA#1	5'-GCUGGUAUUCCCUCUCGAGUGGUUU -3'
<i>CLN6</i> siRNA#2	5'-GGGACUACUCCACAUGGCCUACAA -3'
<i>CLN6</i> siRNA#3	5'-CCAUCAUCAAGAAUCUCAAGCCCGA -3'

8. Abkürzungsverzeichnis

AP	Adaptorprotein
APS	Ammoniumpersulfat
ASOR	Asialo-Orosomucoid
ATG	Autophagy related gene
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Zelllinie aus Hamster-Nieren (<i>Baby hamster kidney</i>)
bp	Basenpaare
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CCP	<i>Clathrin Coated Pit</i>
CCV	<i>Clathrin Coated Vesicle</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Cy3	Carbocyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal Sortine Complex Required For Transport</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hank´s gepufferte Salzlösung
HeLa	humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (Henrietta Lacks)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
IC	Inhibitorcocktail
ILV	intraluminale Vesikel
IMM	Immunomix
IPP	Immunpräzipitation
kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>Multivesicular Bodies</i>
N	normal

NCL	Neuronale Ceroid-Lipofuszinose
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pep A	Pepstatin A
PI(3,4,5)P3	Phosphatidylinositol(3,4,5)phosphat
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol(4,5)phosphat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNA	<i>Ribonucleinacid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N',-Tetra-methyl-ethylendiamin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TRAP	Tartrat-resistent acid phosphatase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp

Aminosäuren

In der Arbeit wurden folgende Abkürzungen für Aminosäuren verwendet:

Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Gln
Glutamin	Q	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

9. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

Jochmann N, Kurze AK, Czaja LF, Brinkrolf K, Brune I, et al. 2009. Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays. *Microbiology* 155:1459-77

Kurze AK, Galliciotti G, Heine C, Mole SE, Quitsch A, Braulke T. 2010. Pathogenic mutations cause rapid degradation of lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Hum Mutat* 31:E1163-74

Tagungsbeiträge

- Kurze AK, Quitsch A, Braulke T. 2007. Analysis of endocytosis in CLN6-deficient *nclf*-mice, *Eur J Cell Biol* 87S1, Suppl. 58, page 12
- Kurze AK, Quitsch A, Braulke T. 2008. Analysis of endocytosis in CLN6-deficient *nclf*-mice, *J Inherit Metab Dis* 30, Suppl.1, page 93
- Kurze AK, Quitsch A, Braulke T. 2007. Analysis of endocytosis in CLN6-deficient *nclf*-mice (Poster). *Annual symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM)*, Hamburg
- Kurze AK, Quitsch A, Braulke T. 2008. Analysis of endocytosis in CLN6-deficient *nclf*-mice (Poster). *31th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ)*, Marburg
- Kurze AK, Quitsch A, Braulke T. 2009. Defective AP2- and Epsin1-dependent endocytosis in CLN6-deficient cells (Poster). *12th International Congress on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCL)* in Hamburg
- Bartsch U, Galliciotti G, Jofre G, Hagel C, Storch S, Kurze AK, Mühlenhoff M, Quitsch A, Braulke T. 2009. Retinal Degeneration in *nclf* mice (Poster). *12th International Congress on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCL)* in Hamburg
- Kurze AK, Quitsch A, Braulke T. 2009. CLN6 defective in variant late infantile form of neuronal ceroid lipofuscinosis impair receptor-mediated endocytosis (Poster). *17th European Study Group on Lysosomal Disease (ESDL) Workshop* in Bad Honnef
- Thelen M, Kurze AK, Fehr S, Braulke T Galliciotti G. 2009. Expression and localisation of CLN6 defective in late infantile neuronal ceroid

lipofuscinosis (Poster). *17th European Study Group on Lysosomal Disease (ESDLD) Workshop* in Bad Honnef

- Thelen M, Kurze AK, Braulke T. 2010. Reduced receptor-mediated endocytosis in CLN6-defective neuronal cells (Poster). *1st International Symposium on "Protein Trafficking in Health and Disease"*

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Braulke möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und sein Bemühen, alle Fragen zu beantworten, danken.

Prof. Dr. Udo Wienand danke ich für die Begutachtung der Arbeit.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft, die ermunternden Worte und den Spaß im Labor bedanken, die das Arbeiten so angenehm gemacht haben.

Arne Quitsch danke ich für seine Geduld und Hilfe während der ersten Monate.

Ein großer Dank gebührt Sandra, Melanie und Jessica für Ihren Einsatz bei der Korrektur dieser Arbeit.

Zudem möchte ich Jessica für die „Labordisko“ danken, durch die die Freitage immer ein besonderer Genuss waren (Hyper! Hyper!).

Ich möchte mich ausserdem bei den Unfallchirurgen und der Abteilung Humangenetik für die Nachbarschaftshilfe bedanken.

Thorsten Franke danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte und es stets verstand mich aufzumuntern.

Zum Schluss gilt mein Dank meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre Unterstützung bei all meinen Entscheidungen.