

**Expression und Proteinwechselwirkungen von
murinem CLN6 und seine Rolle in der
Pathogenese der varianten Form der Neuronalen
Ceroid Lipofuszinose**

Dissertation

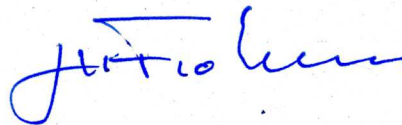
**Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Department Biologie, der Fakultät für Informatik, Mathematik und
Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Melanie Thelen
aus Rheinbach**

Hamburg, Dezember 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. T. BRAULKE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. R. LORBIECKE
Tag der Disputation: 02. Dezember 2011

Hamburg, den 17. November 2011



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat Thomas Braulke
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. René Lorbiecke

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Lysosomen	1
1.1.1	Synthese und Transport lysosomaler Enzyme.....	1
1.1.2	M6P-abhängiger Transport lysosomaler Proteine.....	2
1.1.3	M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Proteine.....	2
1.2	Lysosomale Speichererkrankungen	4
1.3	Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen	5
1.3.1	CLN6.....	7
1.4	Neuronaler Proteinabbau	9
1.4.1	Lysosomale Abbauwege	10
1.4.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	13
2	ZIELSETZUNG	15
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Material	16
3.1.1	Arbeitsgeräte und Apparaturen	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.3	Chemikalien.....	18
3.1.4	Kits und Assays	21
3.1.5	Plasmide und Konstrukte	21
3.1.6	Bakterienstämme.....	21
3.1.7	Hefestämme	22
3.1.8	Maus- und Zelllinien	22
3.1.9	Medien und Zusätze	22
3.1.10	Antikörper	23
3.1.11	Computersoftware.....	24
3.2	Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifizierung von DNA	24
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	25
3.2.3	Klonierung von DNA-Konstrukten	25

3.2.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	26
3.2.5	Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	27
3.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA	27
3.2.7	Isolierung genomischer DNA.....	28
3.2.8	DNA-Sequenzierung.....	28
3.2.9	Genotypisierung von B6.Cg-Cln6 ^{nclf} Mäusen	28
3.2.10	RNA-Isolierung.....	28
3.2.11	Quantitative Realtime-PCR.....	29
3.2.12	Northern Blotting	29
3.2.13	In-situ-Hybridisierung	31
3.2.14	Membran-Hefe-2-Hybrid System	32
3.3	Zellbiologische Methoden.....	38
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien.....	38
3.3.2	Trypsinieren von Zellen	38
3.3.3	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	39
3.3.4	Transiente Transfektion von Zellen	39
3.3.5	Immunhistochemie von Gewebeschnitten.....	39
3.3.6	Elektronenmikroskopie	39
3.4	Biochemische Methoden	40
3.4.1	Herstellung von Gewebehomogenaten	40
3.4.2	Herstellung von Zellhomogenaten.....	40
3.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	41
3.4.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	41
3.4.5	Western Blot Analyse	42
3.4.6	Subzelluläre Fraktionierung von Hirnhomogenaten	43
3.4.7	Isolierung von Mannose-6-Phosphat-haltigen Proteinen	44
3.4.8	Messung der β -Hexosaminidase-Enzymaktivität	45
3.4.9	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen.....	45
3.4.10	Protein Fragment Complementation Assay	46
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	Analyse der <i>Cln6</i>-mRNA-Expression.....	47
4.1.1	Regionale Expression von <i>Cln6</i> im Hirn.....	47
4.1.2	Altersabhängige Expression von <i>Cln6</i> im Hirn	50
4.1.3	mRNA-Expression von <i>Cln6</i> in der <i>nclf</i> -Maus	51
4.2	Pathologie der <i>nclf</i>-Maus	53

4.2.1	Hirnatrophie, Akkumulation von Speicher material und Mikrogliose	54
4.2.2	Autophagie im Hirn der <i>nclf</i> -Maus	58
4.2.3	Pathologische Veränderungen der peripheren Organe	62
4.3	Untersuchungen des lysosomalen Proteoms in Wildtyp- und <i>nclf</i>-Mäusen	66
4.3.1	Analyse des Mannose-6-Phosphat-haltigen Proteoms	66
4.3.2	2D-Elektrophoretische Analyse lysosomaler Fraktionen.....	71
4.4	Identifizierung von potentiellen CLN6-Interaktionspartnern mit dem Membran- Hefe-2-Hybrid-System	75
4.4.1	Verifizierung der Funktionalität des CLN6-Fusionsproteins im Membran-Hefe-2- Hybrid-System	75
4.4.2	Selektion potentieller Interaktionspartner von CLN6.....	77
4.4.3	Überprüfung möglicher Interaktionen	79
4.4.4	Überprüfung der Interaktion von CLN6 mit GABA A α 5 mit dem <i>Protein</i> <i>Complementation Assay</i>	82
5	DISKUSSION.....	85
5.1	Analyse der <i>Cln6</i> -mRNA-Expression.....	85
5.2	Pathologie der <i>nclf</i> -Maus	88
5.2.1	Neuropathologie	88
5.2.2	Pathologie peripherer Organe der <i>nclf</i> -Maus	93
5.3	Untersuchungen des lysosomalen Proteoms	96
5.4	Identifizierung möglicher Interaktionspartner von CLN6	102
6	ZUSAMMENFASSUNG	106
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	108
8	ANHANG	122
	PUBLIKATIONEN UND TAGUNGSBEITRÄGE.....	128
	DANKSAGUNG	130

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APOD	Apolipoprotein D
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Atg	<i>autophagy-related gene</i>
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CA	Corni Ammonis
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRMP2	<i>collapsin reponse mediator protein 2</i>
DAPI	4', 6-Diamidino 2-Phenylindol
dg	Dentate Gyrus
DHCR	<i>dehydrocholesterol reductase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>desoxyribonucleosidtriphosphate</i>
E. coli	Escherischia coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	<i>ethylen diamine tetraacetic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
FGE	<i>Ca-formylglycine generating enzyme</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
gl	Granularschicht
GlcNAc-1	N-Acetylglucosamine-1
HRP	<i>horseradish peroxydase</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
kDa	Kilodalton
LAMP	<i>Lysosome associated membrane protein</i>
LC3	<i>microtubule associated protein 1 light chain 3</i>
LiOAc	Lithiumacetat
LSD	Lysosomale Speichererkrankung
M6P	Mannose-6-Phosphat

ml	Molekularschicht
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
NCL	Neuronale Ceroid Lipofuszinose
ORF	offener Leserahmen
p	postnataler Tag
PAGE	Polyacylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pc	Purkinjezellschicht
PCA	<i>Protein Complementation Assay</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyde
PtdIns	Phosphatidylinositol
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SD-leu-trp	Leucin/Tryptophan-freies Medium
SD-leu-trp-his	Leucin/Tryptophan/Histidin-freies Medium
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1 Einleitung

1.1 Lysosomen

Die eukaryotische Zelle enthält verschiedene Organellen, unter ihnen die 1955 von Christian de Duve entdeckten Lysosomen (De Duve et al. 1955). Diese von einer Membran umschlossenen Kompartimente haben einen sauren pH-Wert ($\text{pH} < 5$), der durch eine V-Typ H^+ -ATPase aufrecht erhalten wird (Cuppoletti et al. 1987). Ihre Funktion liegt hauptsächlich im Abbau von intrazellulären Makromolekülen wie Proteinen, Polysacchariden, Nukleinsäuren oder Lipiden (Kornfeld und Mellman 1989). Lysosomen sind jedoch auch an spezialisierten Funktionen wie beispielsweise der Resorption von Knochen (Stenbeck 2002), der Immunantwort auf pathogene Organismen (Garg et al. 2011) oder der Regulation des Hormonhaushaltes (Brix et al. 2001) beteiligt. Um ihre Funktionen ausführen zu können, benötigen Lysosomen ein komplexes Proteom. Ungefähr 60 lösliche lysosomale Proteine sind bislang bekannt (Lübke et al. 2009). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Hydrolasen, deren pH-Optimum im sauren Milieu liegt, und um Kofaktoren wie Saposine oder sterolbindende Proteine. Die lysosomale Membran enthält über 100 hochglykosylierte lysosomale Membranproteine, die zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität, dem Transport von Metaboliten oder zur Fusion mit anderen Organellen notwendig sind (Schröder et al. 2010).

1.1.1 Synthese und Transport lysosomaler Enzyme

Das Lysosom ist auf eine kontinuierliche Neusynthese von lysosomalen Proteinen angewiesen. Diese werden an Ribosomen synthetisiert und durch eine N-terminale Signalsequenz in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert (Walter und Johnson 1994). Hier werden sie gefaltet und erhalten posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen oder Formylglycin-Reste, bevor sie durch das ER-Golgi-Intermediärkompartiment in den Golgi-Apparat transportiert werden.

1.1.2 M6P-abhängiger Transport lysosomaler Proteine

Der Transport löslicher lysosomaler Enzyme zum Lysosom erfolgt Mannose-6-Phosphat (M6P)-abhängig. Dazu werden die Proteine im Golgi-Apparat durch eine zweistufige Reaktion an *N*-glykosidischen Seitenketten vom *high-mannose* Typ mit einem M6P-Sortierungssignal markiert (Lazzarino und Gabel 1988). Im ersten Schritt überträgt die N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNAc-1-Phosphotransferase) einen GlcNAc-1-Phosphatrest auf die C6-Hydroxylgruppe bestimmter Mannosereste lysosomaler Enzyme (Reitman und Kornfeld 1981). Anschließend wird der so entstandene GlcNAc-Rest durch die GlcNAc-1-Phosphodiester- α -N-Acetylglucosaminidase im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) entfernt (Varki et al. 1981) und der M6P-Rest freigelegt.

Die M6P-Erkennungssignale lysosomaler Proteine werden im Golgi-Apparat von zwei verschiedenen M6P-Rezeptoren (MPRs), dem MPR46 und dem MPR300, erkannt und gebunden (Braulke und Bonifacino 2009). In Clathrin-beschichteten Vesikeln verlassen die MPR-Ligand-Komplexe den Golgi-Apparat (Hoflack und Kornfeld 1985). Nach der Fusion dieser Vesikel mit Endosomen dissoziieren die Liganden aufgrund des niedrigen pH-Wertes (pH 6) von den MPRs, die anschließend zum Golgi-Apparat zurückkehren. Die lysosomalen Proteine werden auf noch nicht näher definierte Weise zum Lysosom transportiert (Abb. 1.1.1) (Dahms et al. 1989).

5 bis 20 % der M6P-haltigen Proteine entgehen der Bindung an MPRs im Golgi-Apparat und werden in den extrazellulären Raum sezerniert. Von dort aus können sie, durch Bindung von an der Plasmamembran lokalisiertem MPR300, durch Endozytose aufgenommen und zum Lysosom transportiert werden (Braulke und Bonifacino 2009).

1.1.3 M6P-unabhängiger Transport lysosomaler Proteine

In Fibroblasten von Patienten, denen die funktionelle GlcNAc-1-Phosphotransferase fehlt und deren lysosomale Proteine somit nicht M6P-abhängig transportiert werden, finden sich trotzdem einige lysosomale Enzyme in Lysosomen (Waheed et al. 1982). Daraus wurde geschlossen, dass M6P-unabhängige Transportsysteme, die zumeist zelltyp- und proteinspezifisch sind, existieren. So wurde der M6P-unabhängige Transport von Prosaposin und der

sauren Sphingomyelinase durch Sortilin (Lefrancois et al. 2002; Ni und Morales 2006; Zeng et al. 2009) oder der Transport der β -Glucocerebrosidase durch LIMP-2 (Reczek et al. 2007) beschrieben.

Lysosomale Membranproteine werden M6P-unabhängig zum Lysosom transportiert. Dieser Transport kann direkt vom TGN über Endosomen zu Lysosomen erfolgen und wird durch Tyrosin- oder Dileucin-basierte Sortierungssignale in den cytoplasmatischen Domänen der Proteine vermittelt (Braulke und Bonifacino 2009). Alternativ kann der Transport indirekt vom Golgi-Apparat über die Plasmamembran und anschließender Endozytose stattfinden, wie z.B. im Fall der lysosomalen sauren Phosphatase (Braun et al. 1989).

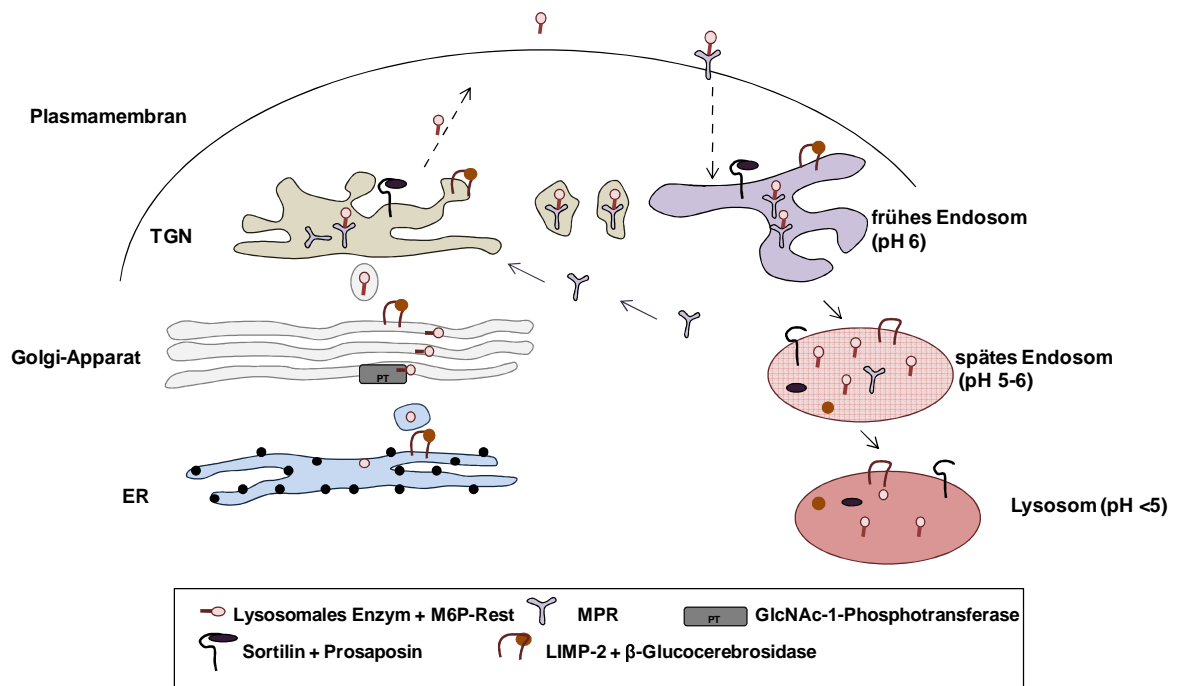


Abb. 1.1.1 Transport lysosomaler Enzyme zum Lysosom

Lysosomale Enzyme werden im ER synthetisiert und zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie, katalysiert durch die GlcNAc-1-Phosphotransferase, M6P-Reste erhalten. Anschließend binden sie im TGN an M6P-Rezeptoren, die den weiteren Transport über die Endosomen zum Lysosom vermitteln. Ein Teil der Enzyme wird sezerniert, von an der Plasmamembran lokalisiertem MPR300 gebunden und von dort über den Endozytoseweg zum Lysosom transportiert. Alternative Transportwege sind der Transport der β -Glucocerebrosidase durch LIMP2 sowie der Sortilin-Transport von z.B. Prosaposin.

1.2 Lysosomale Speichererkrankungen

Die Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion führt zu sogenannten lysosomalen Speichererkrankungen (LSDs). Hierbei kommt es in den Lysosomen zu einer Akkumulation von nicht oder nur teilweise abgebauten Makromolekülen. Es sind über 50 verschiedene Formen von LSDs bekannt, die meist autosomal-rezessiv vererbt werden (Vellodi 2005). Die häufigste Ursache ist ein mutationsbedingter Verlust oder die Inaktivität eines lysosomalen Enzyms. Es gibt allerdings auch Erkrankungen, die durch Mutationen von Proteinen anderer Kompartimente verursacht werden. Bei Mucopolidose Typ II und III werden beispielsweise durch Mutationen der GlcNAc-1-Phosphotransferase keine M6P-Erkennungssignale an lysosomalen Enzymen generiert, was zu deren Fehlsortierung und intrazellulärer Defizienz führt (Tiede et al. 2005). Ein weiteres Beispiel ist die Multiple Sulfatase-Defizienz, ausgelöst durch Mutationen des ER-residenten *Ca-formylglycine generating enzyme* (FGE). Dieses Enzym ist verantwortlich für eine posttranslationale Modifikation im aktiven Zentrum von allen Sulfatasen, bei der ein Glycinrest zu einem α -Formylglycin umgewandelt wird. Bei Mutationen des FGEs kommt es zu einem Funktionsverlust der Sulfatasen und somit zur lysosomalen Speicherung (Dierks et al. 2009). Das klinische Erscheinungsbild der LSDs ist sehr heterogen, mit einer häufigen Beteiligung des zentralen Nervensystems. Auch andere Gewebetypen können betroffen sein, wie z.B. das Skelettsystem bei Mucopolidose Typ II (Vellodi 2005).

Therapien für LSDs sind bislang auf die Substitution fehlender Proteine ausgerichtet. Durch Knochenmarktransplantation können lysosomale Enzyme, die von transplantierten Zellen sezerniert werden, von körpereigenen Zellen aufgenommen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Enzymersatztherapie, bei der dem Patienten rekombinante Proteine injiziert werden. Dies wird beispielsweise erfolgreich mit rekombinanter β -Glucocerebrosidase oder α -Galactosidase für Patienten mit der Gaucher- bzw. Fabry-Krankheit durchgeführt (Beck 2010). Eine bisher nicht überwundene Problematik stellt allerdings die schwere Erreichbarkeit von einzelnen Organen, wie dem zentralen Nerven- oder Skelettsystem, dar. Der Ersatz von membranständigen

lysosomalen Proteinen ist z. Z. nicht möglich. Andere Therapieansätze sind beispielsweise die Substratreduktion, bei der die Synthese der später akkumulierenden Moleküle inhibiert wird. Dies wird z. B. für die Niemann-Pick-Erkrankung durch Inhibition der Glycosphingolipid-Synthese getestet (Beck et al. 2010).

1.3 Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen

Bei der Gruppe der Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCLs) handelt es sich um die häufigste neurodegenerative Erkrankung im Kindesalter, mit einer Inzidenz von 1:12.500 in den USA und Skandinavien (Santavuori 1988). Die Klassifizierung der NCLs erfolgte ursprünglich anhand des Erkrankungsbeginns in infantile, spätinfantile, juvenile, adulte und variante Formen (Dyken 1989). Inzwischen werden die verschiedenen Formen allerdings in Abhängigkeit von dem defekten Gen eingeteilt (Gardiner 2000). Bisher wurden ungefähr 290 krankheitsverursachende Mutationen in neun verschiedenen Genen identifiziert (<http://www.ucl.ac.uk/ncl>): *PPT11/CLN1*, *TPP1/CLN2*, *CLN3*, *DNAJC5/CLN4*, *CLN5*, *CLN6*, *MFSD8/CLN7*, *CLN8* und *CLN10*. Ein weiteres Gen, *CLN9*, wurde bisher noch nicht identifiziert. Die NCL-Genecodieren für lösliche oder membrangebundene Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und größtenteils unbekannter Funktion (Tabelle 1.3.1). Dennoch resultieren Mutationen in diesen verschiedenen Genen in einem ähnlichen morphologischen Phänotyp und Krankheitsverlauf. Bis auf die *CLN4*-Erkrankung, die dominant vererbt wird (Noskova et al. 2011), liegt allen anderen Gendefekten ein autosomal-rezessiver Erbgang zugrunde. Charakteristisch für die NCLs ist die Akkumulation von autofluoreszenten Lipopigmenten und Proteinen in den Lysosomen von Neuronen und anderen Zelltypen. In nahezu allen Formen der NCLs kommt es zur Speicherung der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase. Hierbei handelt es sich um ein hydrophobes Proteolipid mit einer molaren Masse von 7,5 kDa, das bis zu 50% der Masse des Speichermaterials darstellt (Palmer et al. 1989a). Die Akkumulation dieses Proteins ist nicht auf eine gesteigerte Neusynthese oder auf krankheitsspezifische Modifikationen des Proteins, sondern auf einen

verringerten Abbau zurückzuführen (Chen et al. 2004; Ezaki et al. 1995). In CLN1, CLN4 und CLN10 besteht das Speichermaterial hauptsächlich aus den lysosomalen Sphingolipid-Aktivator-Proteinen (Saposinen) A und D (Nijssen et al. 2002; Tyynelä et al. 1993; Tyynelä et al. 2000). Hierbei handelt es sich um hydrophobe Glykoproteine, die als Kofaktoren zum Abbau von Sphingolipiden in den Lysosomen notwendig sind (Tyynelä et al. 1993).

Tabelle 1.3.1 Übersicht über die NCL-Gene und ihre Proteinprodukte

NCL	Gen	Protein	Lokalisation	Funktion
CLN1	<i>PPT1/CLN1</i>	Palmitoyl-Protein-Thioesterase	Lysosom	α/β -Serin Hydrolase
CLN2	<i>TPP1/CLN2</i>	Tripeptidyl-Peptidase1	Lysosom	Serin-Carboxy-Peptidase
CLN3	<i>CLN3</i>	CLN3	Lysosom	unbekannt
CLN4	<i>DNAJC5/CLN4</i>	<i>Cysteine-String Protein α</i>	Cytoplasma	unbekannt
CLN5	<i>CLN5</i>	CLN5	Lysosom	unbekannt
CLN6	<i>CLN6</i>	CLN6	ER	unbekannt
CLN7	<i>MFSD8/CLN7</i>	MFSD8/CLN7	Lysosom	Transporter, Substrat unbekannt
CLN8	<i>CLN8</i>	CLN8	ER, ERGIC	unbekannt
CLN9	unbekannt	CLN9	unbekannt	unbekannt
CLN10	<i>CTSD/CLN10</i>	Cathepsin D	Lysosom	Aspartat-Protease

Der Krankheitsverlauf der NCLs zeichnet sich durch einen progressiven Verlust von Neuronen speziell in der Retina, im cerebralen Cortex und Cerebellum aus. Dies führt zum Verlust des Sehvermögens, zu motorischen Störungen, Epilepsie, Demenz und schließlich zum frühzeitigen Tod der Patienten (Haltia 2003; Jalanko und Braulke 2009). Da die lysosomale Speicherung von nicht abbaubaren Material nicht auf das Gehirn beschränkt ist, kommt es auch in peripheren Organen zu Symptomen wie Hypertrophie des Herzens (Ostergaard et al. 2011).

Bislang gibt es für NCL-Patienten keine Therapiemöglichkeiten. In ersten klinischen Studien wurde bereits ein gentherapeutischer Ansatz für die CLN2-Erkrankung (Worgall et al. 2008) durchgeführt, der eine Verlangsamung des

Krankheitsverlaufes zur Folge hatte. Weiterhin wurde eine Stammzelltherapie für CLN1- und CLN2-Patienten getestet (Jacobs et al. 2011), jedoch ohne positiven Effekt auf die Krankheitssymptome. Im Tiermodell erprobt werden Enzyersatztherapien für lösliche NCL-Proteine wie TTP1 (Vuilleminot et al. 2011).

1.3.1 CLN6

Da CLN6 und die damit assoziierte Krankheit im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, soll auf dieses Gen bzw. Genprodukt näher eingegangen werden. Mutationen im *CLN6*-Gen verursachen sowohl eine spätinfantile als auch eine adulte Form von NCL (Arsov et al. 2011; Gao et al. 2002; Wheeler et al. 2002). Das *CLN6*-Gen ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert und umfasst sieben Exone über ~22 kb. Die 2,4kb große mRNA codiert für einen offenen Leserahmen von 936 bp und wird ubiquitär in Geweben exprimiert, jedoch ist über eine Verteilung der Expression im Gehirn nichts bekannt (Gao et al. 2002; Wheeler et al. 2002). Das resultierende CLN6-Protein hat eine Größe von 311 Aminosäuren (AS) und ist ein nicht-glykosyliertes Membranprotein mit sieben Transmembrandomänen (Abb. 1.3.1).

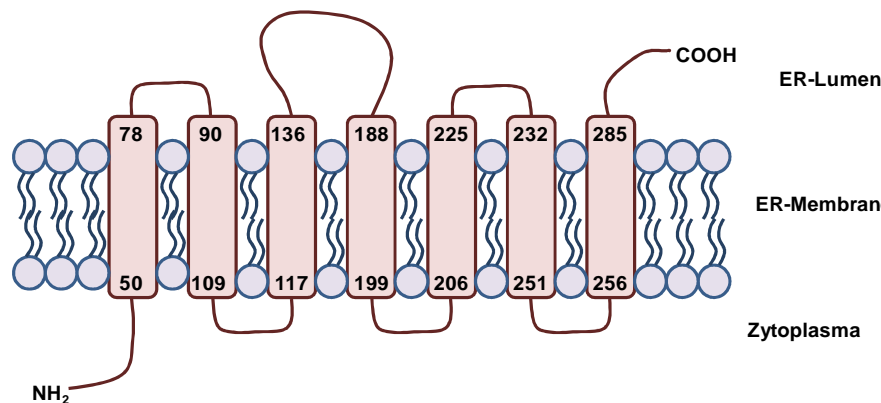


Abb. 1.3.1 Struktur des CLN6-Proteins

Das Schema zeigt CLN6 mit sieben Transmembrandomänen. Jeweils die erste und die letzte Aminosäure einer Transmembrandomäne sind nummeriert.

CLN6 ist im ER lokalisiert und hat einen cytosolischen N-Terminus und einen luminalen C-Terminus (Heine et al. 2004; Heine et al. 2007; Mole et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass CLN6 Homodimere bildet (Heine et al. 2004). CLN6 besitzt keine Homologien zu anderen Proteinen und ist zwischen

Säugetieren stark konserviert. Die Aminosäuresequenz von CLN6 zwischen Mensch und Maus bzw. Schaf sind zu 80 % bzw. 90 % identisch (Gao et al. 2002; Tammen et al. 2006). Die Funktion von CLN6 und wie Mutationen im *CLN6*-Gen zu lysosomalen Speichererkrankungen führen, ist bislang nicht bekannt. Als Interaktionspartner wurden bisher CLN5 und das *collapsin-response-mediator protein 2* (CRMP2) identifiziert (Benedict et al. 2009; Lyly et al. 2009). Mögliche Zusammenhänge dieser Interaktionen mit der Pathologie der CLN6-Erkrankung sind unklar (Benedict et al. 2009).

Derzeit sind 55 pathogene Mutationen im *CLN6*-Gen bekannt, die die Erkrankung auslösen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl>). Die CLN6-Krankheit manifestiert sich, bis auf wenige identifizierte adulte Patienten (Arsov et al. 2011), durch einen Beginn der ersten Symptome im Alter zwischen 18 Monaten und acht Jahren (Mole et al. 2005). Im fortschreitenden Krankheitsverlauf kommt es zum Verlust der Seh- und Sprechfähigkeit sowie zum kognitiven und motorischen Abbau. Der Tod tritt zwischen dem 9. und 17. Lebensjahr ein (Sharp et al. 2003).

1.3.1.1 CLN6 Tiermodelle

Natürliche Mutationen in den *CLN6*-Orthologen von Maus, Schaf und Hund führten zu unterschiedlichen Tiermodellen, die eine dem humanen Krankheitsverlauf ähnliche Erkrankung zeigen. Eines der am besten charakterisierten Modelle ist das South-Hampshire-Schafmodell, das eine bislang unbekannt Mutation im *CLN6*-Gen aufweist (OCL6-Schaf). OCL-Schafe zeigen die ersten klinischen Symptome, wie Erblindung, im Alter von 10-14 Monaten (Jolly et al. 1989). Erstmals konnte die für NCLs charakteristische Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase im Speicher material dieser Schafen nachgewiesen werden (Fearnley et al. 1990; Palmer et al. 1989b). Im Hirn der Schafe ist ab dem zweiten Lebensmonat eine fortschreitende Atrophie zu beobachten (Oswald et al. 2005), die von einer bereits pränatal einsetzenden Astro- und Mikrogliaaktivierung begleitet wird (Kay et al. 2006; Oswald et al. 2005). Sowohl in Fibroblasten von CLN6-Patienten als auch im Hirn von OCL6-Schafen sind erhöhte Mengen und Aktivität der Mn^{2+} -abhängigen Superoxid-Dismutase detektiert worden, was auf oxidativen Stress

hindeutet (Heine et al. 2003). Des Weiteren wurden durch metabolomische Analysen erhöhte Mengen von Glutamin und Succinat sowie niedrigere Spiegel von Aspartat, Acetat, Glutamat, N-Acetylaspartat und γ -Aminobuttersäure (GABA) in verschiedenen Hirnregionen der Schafe im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt (Pears et al. 2007). Niedrige Spiegel von GABA gehen mit dem Verlust GABAerger Interneurone in betroffenen Schafen einher (Oswald et al. 2008). Ein weiteres Schafmodell der CLN6-Erkrankung ist das australische Merinoschaf mit einer Missense-Mutation im *CLN6*-Gen (c.184C>T), die zum Austausch von Arginin zu Cysteine führt (p.Arg62Cys). Seine Symptomatik ist mit der von OCL6-Schafen vergleichbar (Tammen et al. 2006).

Ein natürliches Mausmodell der CLN6-Erkrankung stellt die *nclf*-Maus dar. Sie hat eine Frameshift-Mutation im murinen *Cln6* (c.307insC), die mit einer humanen Patientenmutation identisch ist und zu einem vorzeitigen Stop-Codon und somit einem trunkierten Protein führt (p.R103PfsX62)(Kurze et al. 2010; Wheeler et al. 2002). In *nclf*-Mäusen kommt es im Alter von vier Monaten zu ersten Symptomen wie retinaler Atrophie, gefolgt von motorischen Funktionsstörungen und spastischer Lähmung der hinteren Extremitäten ab dem Alter von acht Monaten. Erste Anzeichen von autofluoreszentem Speicher material sind bereits ab dem elften Lebensstag im Hirn zu beobachten. Des Weiteren zeigen auch Kupferzellen, Nierenepithelzellen, Pankreasinseln, Adipocyten und Zellen des Myokards Speicher material ab dem 3. Lebensmonat. Im Hirn der Maus ist ab dem sechsten Monat eine zunehmende Astrogliose nachweisbar. Der frühzeitige Tod tritt mit ca. zwölf Monaten ein, im Vergleich zur normalen Lebenserwartung von 24 Monaten (Bronson et al. 1998). Weitere krankheitsassoziierte Veränderungen im Hirn von *nclf*-Mäusen stellen erhöhte Mengen an GM2- und GM3-Gangliosiden und lipid gebundenen Oligosacchariden dar (Cho et al. 2005; Jabs et al. 2008).

1.4 Neuronaler Proteinabbau

Die Gesamtheit aller Proteine befindet sich in einem Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau. Der Proteinabbau findet durch zwei Arten von

Abbauwegen statt: lysosomale Abbauwege und das Ubiquitin-Proteasom System (UPS). Bei den NCL-Erkrankungen kommt es zu Störungen des Proteinabbaus. Bei Neuronen handelt es sich um postmitotische Zellen, die zumeist nicht ersetzbar sind (Gould 2007). Daher sind sie in besonderem Maße auf eine konstante Erneuerung von Proteinen und Organellen angewiesen. Außerdem besitzen Neurone eine komplexe Morphologie mit weiten dendritischen Verzweigungen und Axonen, sodass ihr Verhältnis von Zelloberfläche zu Volumen wesentlich größer ist als bei anderen Zelltypen. Dies macht einen erhöhten Umsatz an Oberflächenproteinen notwendig (Tai und Schuman 2008).

1.4.1 Lysosomale Abbauwege

In den Lysosomen werden durch saure Hydrolasen Makromoleküle degradiert. Der Abbau von Proteinen in diesen Organellen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, die in Abb. 1.4.1 dargestellt sind. Proteine der Zelloberfläche können durch Ubiquitin an ihren zytoplasmatischen Domänen markiert werden (Hicke und Dunn 2003) und gelangen nach Endozytose durch vesikulären Transport zum Lysosom. Intrazelluläre Proteine oder Organellen können durch verschiedene Arten der Autophagie dem lysosomalen Abbau zugeführt werden. Durch Invagination ihrer äußeren Membran können von Lysosomen Bereiche des Zytoplasmas aufgenommen werden (Mikroautophagie).

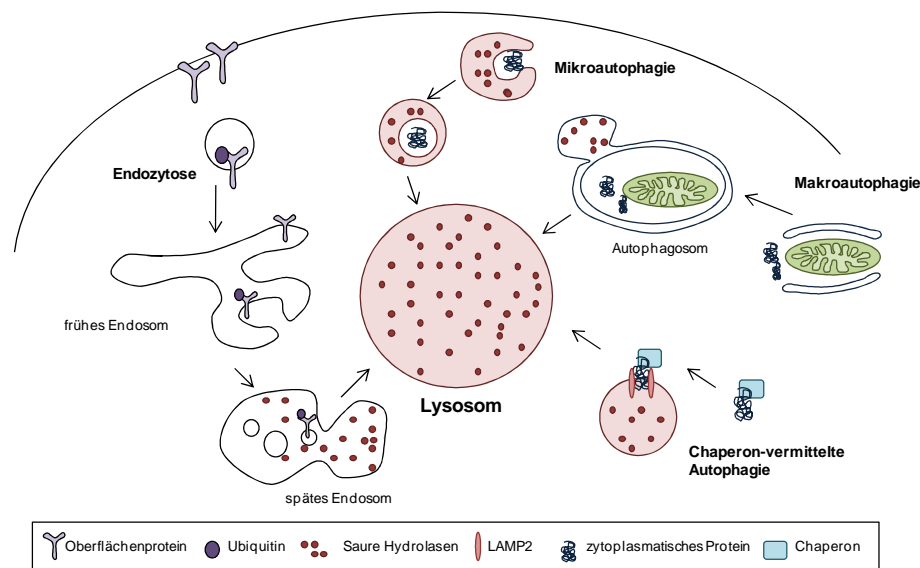


Abb. 1.4.1 Lysosomale Wege des Proteinabbaus

Zelloberflächenproteine werden endozytiert und vom frühen Endosom über späte Endosomen zum Lysosom transportiert. Intrazelluläre Proteine und Organellen werden durch verschiedene Mechanismen der Autophagie zum Abbau ins Lysosom transportiert. Abbildung modifiziert nach Tai und Schuman 2008.

Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden spezifisch für die Degradation im Lysosom bestimmte Proteine durch Chaperone gebunden, entfaltet, und translozieren dann durch Interaktion mit dem lysosomalen Membranprotein LAMP2 in das lysosomale Lumen (Bandyopadhyay et al. 2008; Dice 2007). Im Laufe der Bildung von Autophagosomen werden Bereiche des Zytoplasmas oder ganze Organellen von einer Doppelmembran unbekannter Herkunft umschlossen und nach Fusion mit Lysosomen degradiert. Dieser Prozess wird als Makroautophagie bezeichnet (Tai und Schuman 2008). Bei der Makroautophagie (im Folgenden als Autophagie bezeichnet) handelt es sich um einen katabolen Prozess, der durch verschiedene Faktoren, wie Nährstoffmangel oder Wachstumsfaktoren, initiiert werden kann. Autophagie dient einerseits dem unspezifischen Abbau von Bereichen des Zytoplasmas. Andererseits kann es auch zu einer selektiven Degradation von Proteinaggregaten oder Mitochondrien (Mitophagie) kommen, die durch Rezeptoren wie z.B. das Protein p62 vermittelt wird (Bjorkoy et al. 2005; Geisler et al. 2010).

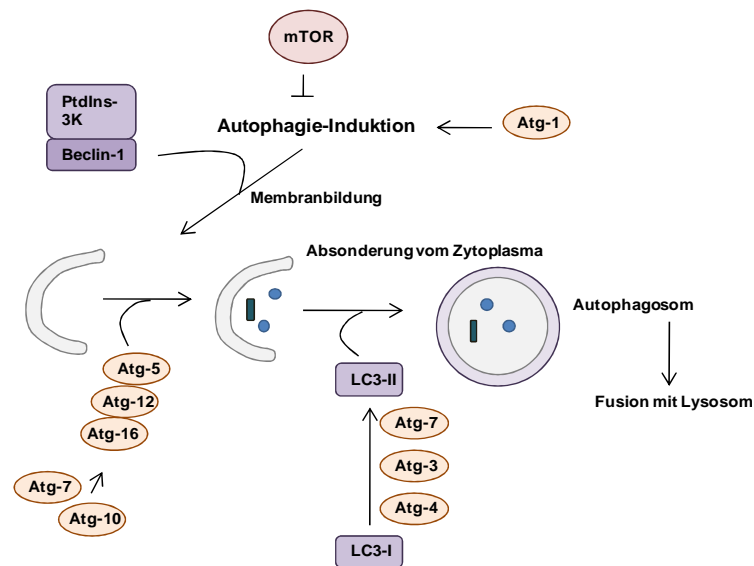


Abb.1.4.2 Vereinfachte schematische Darstellung der Bildung von Autophagosomen

Die Autophagie-Induktion erfolgt durch den Atg-1 Komplex und kann durch mTOR inhibiert werden. Zur weiteren Induktion der Membranbildung ist der PtdIns-3K-Beclin-1-Komplex notwendig. Die Elongation der Autophagosomenmembran und die Absonderung vom Zytoplasma wird sowohl durch den Atg5-Atg12 Komplex sowie durch die proteolytische Prozessierung und Lipidierung von LC3 vermittelt. Nach der Bildung des Autophagosoms erfolgt die Fusion mit dem Lysosom und die Degradation. Abbildung modifiziert nach www.cellsignal.com.

Komplexe Signaltransduktionswege regeln die Induktion oder Inhibition der Autophagie, und es gibt eine Vielzahl involvierter Proteine, die hauptsächlich in der Hefe identifiziert wurden, wie die *autophagy related genes* (Atgs) (Levine und Kroemer 2008). Es gibt vier sogenannte Kernkomplexe, die für jede Art der Autophagie benötigt werden: Die Initiierung der Autophagosomenbildung geschieht durch den Atg-1-Komplex und kann durch den mTOR-Signalweg inhibiert werden. Der nächste Schritt ist die Bildung der Autophagosomenmembran, vermittelt durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PtdIns3K)-Beclin-1-Komplex. Zur Elongation der Membran und zur Absonderung vom Zytoplasma werden der Atg-5-Atg-12 Komplex sowie der LC3-Komplex benötigt. Schließlich fusionieren Autophagosomen mit dem Lysosom, und die innere Autophagosomenmembran samt ihres Inhaltes wird im Autophagolysosom degradiert (Levine und Kroemer 2008; Yang und Klionsky 2010).

In Mäusen, die für einen der Schlüsselfaktoren der Autophagie, Atg5, defizient sind, kommt es zur Neurodegeneration (Komatsu et al. 2006). Auch in LSDs ist

die Akkumulation von Autophagosomen beschrieben worden (Settembre et al. 2008), unter anderem in Mausmodellen der NCL-Erkrankungen CLN3 und CLN10 (Cao et al. 2006; Koike et al. 2000; Shacka und Roth 2007).

1.4.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System regelt den Abbau von z.B. cytosolischen oder falsch gefalteten Proteinen. So wird das durch eine Baseninsertion verursachte verkürzte CLN6-Protein (p.R106PfsX26) bei CLN6-Patienten und in der *ncf*-Maus (p.R103PfsX62) durch Proteasomen degradiert (Kurze et al. 2010). Für den proteasomalen Abbau bestimmte Proteine werden durch das 76-Aminosäuren-große Protein Ubiquitin markiert. Dazu gibt es verschiedene Klassen von Ubiquitin-Ligasen. Zunächst wird ein Ubiquitin-Molekül unter ATP-Verbrauch an eine E1-Ligase gebunden und von dort auf eine E2-Ligase transferiert. Diese überträgt schließlich das Ubiquitin an eine E3-Ligase, die das zu markierende Protein an einem Lysinrest durch eine Isopeptidbindung mit dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins koppelt. In mehreren Schritten können nun weitere Ubiquitin-Moleküle durch eine Isopeptidbindung miteinander verknüpft werden, so dass das Protein polyubiquitiniert und anschließend durch Proteasomen zu Peptiden abgebaut wird. Die Ubiquitinmoleküle werden vor der Degradation von deubiquitinierenden Enzymen abgespalten und recycelt (Abb. 1.4.1). Das humane Genom codiert für über 500 verschiedene E3-Ligasen, was auf eine hohe Substratspezifität hinweist (Hershko und Ciechanover 1998; Tai und Schuman 2008). Die Ubiquitinierung von Proteinen kann sie nicht nur zur proteasomalen Degradation markieren sondern z. B. auch zur Internalisierung von der Plasmamembran oder zum Abbau durch das Lysosom (Barriere et al. 2007). Durch unterschiedliche Ubiquitinierungen an den sieben Lysinresten des Ubiquitins und durch die Länge der Ubiquitinketten werden Proteine bzw. Organellen spezifisch markiert. Die genaue Bedeutung verschiedener Ubiquitinierungsmuster ist allerdings nicht vollständig geklärt (Tai und Schuman 2008).

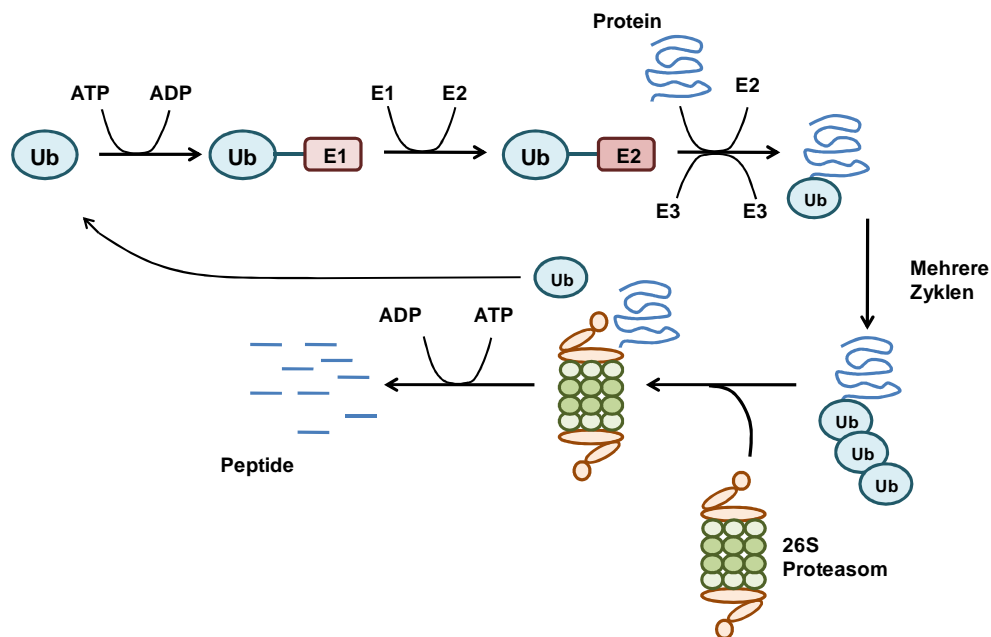


Abb. 1.4.1 Vereinfachte schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom Systems

Proteine, die zum Abbau durch das Proteasom bestimmt sind, werden durch die Ubiquitin-Ligasen E1-E3 mit poly-Ubiquitinketten markiert und im Proteasom zu Peptiden abgebaut. Die Ubiquitinmoleküle werden recycelt und erneut zur Markierung von Proteinen verwendet. Abbildung modifiziert nach www.cellsignal.com.

Für den Abbau von Proteinen durch das Proteasom ist deren Entfaltung notwendig. Daher können Proteinaggregate nicht durch das Proteasom abgebaut werden. Mehrere neurodegenerative Erkrankungen wie Huntington oder Parkinson werden mit dem fehlenden proteasomalen Abbau von aggregierten Proteinen in Verbindung gebracht (Rubinsztein 2006).

2 Zielsetzung

Bei der CLN6-assoziierten Neuronalen Ceroid-Lipofuszinose handelt es sich um unheilbare neurodegenerative Erkrankungen im Kindesalter, für die die zugrundeliegenden Pathomechanismen nicht bekannt sind. Die Funktion des ER-residenten CLN6 ist unbekannt.

Um zu überprüfen, ob *Cln6* nur in bestimmten Regionen oder Zelltypen des Hirns exprimiert wird oder ob entwicklungsabhängige Expressionsmuster vorhanden sind, die möglicherweise mit dem Verlauf der Erkrankung und morphologischen Veränderungen korrelieren, soll zunächst die *Cln6*-Genexpression im Hirn von *nclf*-Mäusen verschiedener Altersstadien durch *in-situ* Hybridierung und Realtime-PCR untersucht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Untersuchung von Mechanismen, die zur Pathogenese der Erkrankung beitragen könnten. Dazu soll sowohl Speichermaterial aus Hirn, Leber und Herz der *nclf*-Maus als auch die Aktivierung von Gliazellen und Autophagieprozesse durch Elektronenmikroskopie, Immunhistochemie und Western-Blot untersucht werden. Um krankheitsrelevante Veränderungen zu bestimmen die einen Hinweis auf die Funktion von CLN6 geben könnten, soll das lysosomalen Proteoms von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen durch subzelluläre Fraktionierung, Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie analysiert werden.

Schließlich sollen Interaktionsstudien, die mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Screenings durchgeführt werden sollen, weitere Hinweise auf die Funktion von CLN6 geben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Arbeitsgeräte und Apparaturen

Gerät	Typ	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wetttenberg
Blockthermostat	Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
	TM130-6	HLC, Bovenden
Counter	β-Counter LS3801	Beckman Counter, Krefeld
Cemi Doc XRS	Imager	Bio-Rad, München
Douncer	5 ml Volumen	Wheaton, USA
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,
Inkubationsschrank	CO ² -Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
	Gasboy C20A	Labotect, Wiesbaden
	Innova CO-170	NewBrunswick,Nürtingen
	Innova 4230	NewBrunswick,Nürtingen
Kryo-Einfriergerät	Nalgene™ Cryo 1°C	Nalgene, Däne mark
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
	Ultra-View VoX®	Perkin Elmer
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	Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Tpersonal Real-Time, MX3000P™ Mastercycler, Gradient	Biometra, Göttingen Stratagene, USA Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	TE62 & TE22	Hofer, Holliston, USA
Ultraschallgerät	Sonopuls HD60	Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Berlin
Ultra Thurrax	Dremel®	BioSpec Products, USA
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, USA
Waagen	AC100 BP2100 S	Mettler Toledo, Giessen Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt, Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge 5418 Centrifuge 5415R Centrifuge 5804 R Minifuge RF MC6 Centrifuge Sorvall Discovery M120	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Sarstedt, Nümbrecht Kendro, Newtown, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein
Dialyseschlauch (Visking 8/32)	Roth, Karlsruhe
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Heckt
Einmalküvetten	Plastibrand, Wertheim
Einwegmaterial für Zellkultur	BD Falcon, Heidelberg
Einweg-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht
Filmkassetten	Rego, Augsburg
Filterschwämme	Amersham
Gel-Glasplatten	Amersham
Gewebekulturflaschen, -schalen	Sarstedt, Nümbrecht
Glasperlen	Sigma-Aldrich, München
Immersionsöl 518 F	Zeiss, Oberkochen
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Linsenpapier MN 10 B	Zeiss, Oberkochen
Mobitec-Säulen (2,5 ml)	Mobitec, Göttingen
Objektträger	Engelbrecht, Kassel
Protran™ Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH, Dassel

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Sensor Chip CM5	GE Healthcare, München
Skalpelle	Braun, Melsungen
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	VWR, Darmstadt
<i>Stripes</i> /Deckel für Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Scintillationsröhrchen	Perkin-Elmer, Waltham ,USA
Teflonkämme	Hoefer, Holliston, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel

3.1.3 Chemikalien

[³² P]-dCTP	Hartmann, Braunschweig
[³⁵ S]-UTP	Hartmann, Braunschweig
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal)	Sigma-Aldrich, München
Adenin	Sigma-Aldrich, München
Affi-Gel 10	Bio-Rad, München
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alanin	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Arginin	Sigma-Aldrich, München
Asparagin	Sigma-Aldrich, München
Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Coomassie blue	Serva, Heidelberg
Cystein	Sigma-Aldrich, München
Denhardts's Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DNA-Standard, 1 kb-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Standard, 100 bp-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Set	Amersham, Freiburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Glutamin	Sigma-Aldrich, München
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, München
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HBS-N	GE Healthcare, München
Hefe Stickstoff Basis	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Histidin	Sigma-Aldrich, München
Inositol	Sigma-Aldrich, München
Isoleucin	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	J.T. Baker, Griesheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Lachssperma DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Leucin	Sigma-Aldrich, München
Lithiumactetat (LiOAc)	Roth, Karlsruhe
Lubrol	MP Biomedicals, Solon, USA
Luminol	Roth, Karlsruhe
Lysin	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mannitol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Methionin	Sigma-Aldrich, München
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

Mowiol	Hoechst, Frankfurt a.M.
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin(TEMED)	Roth, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nonidet 40	Roche, Mannheim
p-Aminobenzoesäure	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
p-Cumarinsäure	Roth, Karlsruhe
p-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Phenanthroline	Sigma-Aldrich, München
Phenylalanin	Sigma-Aldrich, München
Pipes	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Prolin	Sigma-Aldrich, München
Protein G Sepharose	GE Healthcare, München
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham, Freiburg
Rapid Hyb™ buffer	GE Healthcare, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Saccharose	J.T. Baker, Griesheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma-Aldrich, München
Serin	Sigma-Aldrich, München
Threonin	Sigma-Aldrich, München
Tricin	Sigma-Aldrich, München
TriReagent®	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Tryptophan	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck, Darmstadt
Tyrosin	Roth, Karlsruhe
Uracil	Sigma-Aldrich, München

Valin	Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.1.4 Kits und Assays

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Fire Silver Staining Kit	Proteome Factory, Berlin
Gene Jet™ Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, St Leon-Rot
Gene Jet™ PCR Purification Kit	Thermo Scientific, St Leon-Rot
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, St Leon-Rot
High Capacity cDNA Reverse Transcription	AppliedBiosystem, Darmstadt
illustra™ProbeQuant™G50 Microcolumns	GE Healthcare, München
MaxiScript®Labelling kit	AppliedBiosystem, Darmstadt
Mouse Neuronal Tissue Northern Blot	Gentaur, Aachen
pcDNA™Gateway®Directional TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
QIAplasmid® Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® gel Extraction Kit (50)	QIAGEN, Hilden
qPCR Assay Mouse Developmental Tissue	Origene, Rockville, MD, USA
Rediprime II Random Prime Labelling Kit	GE Healthcare, München
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN, Hilden
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystem, Darmstadt
Y2H Membrane Protein Kit	MoBiTec, Göttingen

3.1.5 Plasmide und Konstrukte

pcDNA3.1 A (-)myc/His	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1 A (-)myc/His-CLN6	(Heine et al. 2004)
pcDNA3.1 A (+)myc/His-CLN6	G. Galliciotti, Arbeitsgruppe
pBlueskriptII SK (+)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
pBT3-N	MoBiTec, Göttingen
pPR3-C	MoBiTec, Göttingen
pCCW-Alg5	MoBiTec, Göttingen
pDL2-Alg5	MoBiTec, Göttingen
pAI-Alg5	MoBiTec, Göttingen
Human Adult Brain cDNA Library in pPR3-N	MoBiTec, Göttingen

3.1.6 Bakterienstämme

Escherichia coli

TOP 10F	Rif ^r , F', proAB, lacIqz_M15, Tn10, Tet ^r	Invitrogen, Karlsruhe
---------	--	-----------------------

3.1.7 Hefestämme

NMY51	MATa his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3 112 Ade2 LYS2::(lexAop) ₄ -HIS3 ura3:: (lexAop) ₈ -lacZ ade2::(lexAop) ₈ -ADE2 GAL4	MoBiTec, Göttingen
-------	--	--------------------

3.1.8 Maus- und Zelllinien

B6.Cg-Cln6 ^{nc1f}	Jackson Laboratories, Maine, USA
C57Bl6/J10	Charles River, Köln
<i>Baby hamster kidney cells</i> (BHK)	Prof. Figura, Institut für Biochemie 2, Georg-August-Universität, Göttingen
Menschliche Cervixkarzinomzellen (Hela)	ATCC, Rockville, USA

3.1.9 Medien und Zusätze

3.1.9.1 Medien zur Anzucht von Bakterien

LB Medium	Bacto-Trypton	10 g/l
	NaCl	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l

Wenn erforderlich wurde vor Gebrauch Antibiotikum zugegeben (100 μ g/ml Ampicillin; 50 μ g/ml Kanamycin). Für die Herstellung von Festmedium wurden 15 g/L Agar hinzugefügt.

3.1.9.2 Medien zur Anzucht von Hefen

YPAD Medium	Hefeextrakt	10 g/l
	Bacto-Trypton	10 g/l
	Glukose	20 g/l
	Adeninsulfat	0,04 g/l

SD-Medium	Hefe Stickstoff Basis	6,7 g/l
	Dropout Mix	2 g/l
	Glucose	20 g/l

Drop-out mix			
Adenin	5 g	Leucin	30 g
Alanin	20 g	Lysine	20 g
Arginin	20 g	Methionin	20 g

Asparagin	20 g	p-Aminobenzoesäure	2 g
Aspartatsäure	20 g	Phenylalanin	20 g
Cystein	20 g	Prolin	20 g
Glutamin	20 g	Serin	20 g
Glutaminsäure	20 g	Threonin	20 g
Glycin	20 g	Tryptophan	20g
Histidin	20 g	Tyrosin	20 g
Inositol	20 g	Uracil	20 g
Isoleucin	20 g	Valin	20 g

Für die Herstellung von Medium ohne Histidin, Leucin und/oder Tryptophan wurde der Drop-out Mix ohne die jeweilige Aminosäure erstellt. Für die Herstellung von Festmedien wurden 20 g/l Agar hinzugefügt.

3.1.9.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Österreich
GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
jetPEI™ Transfektions-Reagenz	PEQLAB, Erlangen
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem®-1 + GlutaMax™	GIBCO/BRL, Eggenstein
Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.10 Antikörper

3.1.10.1 Primäre Antikörper

Name/Antigen	Spezies	Anwendung	Referenz
Cathepsin D	Kaninchen	WB 1:1000	(Claussen et al. 1997)
CD68	Ratte	IHC 1:500	AbD Serotec, Oxford, UK
GFAP	Maus	IHC 1:500	Sigma-Aldrich, München
GFP	Maus	WB 1:1000	Roche, Mannheim
His	Maus	WB 1:500	Dianova, Hamburg
LC 3	Maus	WB 1:500	Nanotools, Teningen
Mannose-6-Phosphat	Fc Fragment mit myc tag	WB 1:1000	(Müller-Loennies et al. 2010)
myc	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma-Aldrich, München
p62	Kaninchen	WB 1:500	MBU, Nakaku

p62	Kaninchen	IHC 1:600	Enzo ,Lörrach
Tubulin	Maus	WB 1:1000	Hybridoma Bank
Ubiquitin	Maus	WB 1:1000	Cell Signaling,
β -F1 Untereinheit	Maus	WB 1:1000	MitoSciences, USA

3.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Name/Antigen	Anwendung	Referenz
Ziege α Kaninchen IgG HRP	WB 1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus IgG HRP	WB 1:2000	Dianova, Hamburg
Ziege α RatttelgG HRP	WB 1:1000	Dianova, Hamburg

3.1.11 Computersoftware

Software:

Adope Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
Clone Manager 9	Sci-Ed, Cary, USA
Leica Confocal Software 2.61	Leica, Wetzlar
Microsoft Office Standard Edition 2007	Microsoft, Redmond, USA
Quantity One 2.61	Bio-Rad, München
MxPro 4.6.1	Stratagene, Amsterdam

Online-Programme/Datenbanken:

Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
MASCOT	http://www.matrixscience.com
NCBI Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifizierung von DNA

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden DNA-Fragmente vervielfältigt. Bei Genotypisierungen wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte aus genomischer DNA amplifiziert, als Polymerase wurde hierbei eine *Taq*-Polymerase verwendet. Zur Subklonierung von cDNA diente Plasmid-DNA als *Template*, und es wurde die *Phusion*[®] *High-Fidelity* DNA-Polymerase benutzt. Für die PCR Reaktion wurde folgendes Programm verwendet, bei dem die Dauer des Elongationsschrittes sowie die Denaturierungstemperatur den zu amplifizierenden Produkten bzw. den Primern angepasst wurden:

PCR-Programm für *Phusion*[®]-Polymerase

1. 98°C 3-10 min Vorlauf
2. 98°C 30 sec Denaturieren
3. * °C 30 sec Annealing
4. 72°C ** Polymerisation
5. 72°C 3 min finale Polymerisation
6. 10°C bis zur Aufbewahrung

} 35 Zyklen

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

PCR-Ansatz:

1 µl dNTP-Mix (10 mM)
 Je 2,5 µl 5' und 3' Primer 10pM
 10µl 5-fach Reaktionspuffer
 100 ng *Template* DNA
 0,5 µl DNA Polymerase (5 U/ µl)
 ddH₂O zu einem Volumen von 50 µl

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer

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

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe wurden Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1-1,5 % (w/v) in TAE Puffer verwendet. Die entsprechenden Mengen von Agarose in TAE-Puffer wurden in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Erkalten der Lösung auf 60 °C wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugefügt und die Lösung wurde zur Aushärtung in eine Gelform gegossen. Der Gellauf erfolgte bei 120 V in TAE-Puffer. Zur Dokumentation wurde das Gel mit dem Kamerasystem *Darkroom Evo III* (Raytest) unter UV-Bestrahlung aufgenommen.

3.2.3 Klonierung von DNA-Konstrukten

Durch PCR wurde die zu klonierende cDNA amplifiziert. Durch Wahl entsprechender Primer wurden 5'- und 3'- terminal Restriktionsschnittstellen

abzentrifugiert. Nach wiederholtem Resuspendieren in 20 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung und erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 6 ml resuspendiert, in 100 μl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.5 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Vervielfältigung von DNA-Konstrukten wurden diese in chemisch kompetente *E.coli* TOP10 Bakterien transformiert. Hierzu wurden 100 μl Zellen aufgetaut, mit der DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ für 45 sec und eine Abkühlung auf Eis für 2 min. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 30 min bei 220 rpm und $37\text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt, anschließend auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden jeweils 5 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) mit Einzelkolonien der Platte inokuliert und für 12-14 h geschüttelt. Diese Kulturen wurden dann entweder zur Plasmidisolierung oder zum Animpfen größerer Kulturen verwendet.

3.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurden entweder das *GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific, bis 20 μg DNA) oder das *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (Qiagen, bis zu 100 μg DNA) getreu den Herstellerangaben verwendet. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen wurde ebenfalls das *GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) verwendet. Das Zellpellet von 3 ml Übernachtkultur wurde in 250 μl Lysispuffer resuspendiert. Hierzu wurde ein Volumen Glasperlen hinzugegeben und zweimal 1 min gevortext, um die Zellwand der Hefezellen aufzubrechen. Die Glasperlen wurden durch 30 sec zentrifugieren bei $500 \times g$ sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gemäß den Herstellerangaben weiter verfahren.

3.2.7 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien wurden diese in 500 µl Lysispuffer über Nacht bei 56 °C geschüttelt. Unlösliche Bestandteile wurden für 5 min bei 15.000 x g abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde daraufhin bei 15.000 x g für 5 min sedimentiert, das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals bei 15.000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und anschließend in 100 µl ddH₂O resuspendiert.

Lysispuffer	100 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,3 % (w/v) SDS 4 µg/ml Proteinase K
-------------	---

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma Sequence Laboratories Göttingen durchgeführt.

Sequenzierungsansatz:	0,6 µg DNA 20 pmol Primer ddH ₂ O zu einem Volumen von 7 µl
-----------------------	--

3.2.9 Genotypisierung von B6.Cg-Cln6^{ncfl} Mäusen

Bei der Mauslinie B6.Cg-Cln6^{ncfl} (*ncfl*) handelt es sich um ein natürliches Mausmodell mit einer 1bp-Insertion in Exon 4 (c.307insC), die zu einem Frameshift und somit zu einem verkürzten Protein führt. Zur Genotypisierung wurde ein die Mutation umschliessendes, 297 bp grosses DNA-Fragment der genomischen *Cln6*-Sequenz amplifiziert und anschließend sequenziert (Primer siehe 8.1.1).

3.2.10 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen oder Mausgewebe wurde ein Zellpellet oder maximal 100 mg Mausgewebe in 500 µl *Tri Reagent* (Sigma-Aldrich) resuspendiert bzw. mit einem UltraTurrax zerkleinert und 5 min bei RT

inkubiert. Daraufhin wurden 100 µl Chloroform hinzugegeben und alles 15 sec durch Vortexen vermischt. Anschließend folgten 5 min Inkubation bei RT, und die Proben wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C sedimentiert. 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 Isopropanol wurde 15 min bei RT inkubiert und die RNA durch 15 min bei 16.000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, erneut 5 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert, dann bei RT getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Quantität und Qualität der RNA wurde photometrisch überprüft.

3.2.11 Quantitative Realtime-PCR

Mittels quantitativer Realtime-PCR wurde die Expressionsrate von mRNA spezifischer Gene durch Messung der Amplifikatmenge in der exponentiellen Phase einer PCR bestimmt. Zunächst wurde aus RNA mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers cDNA synthetisiert. Die Messung erfolgte durch Verwendung des *TaqMan® Gene Expression Assays* mit genspezifischen *TaqMan* Sonden (siehe 8.1.3). Die Auswertung der relativen Genexpression wurde nach der $2^{-\Delta\Delta ct}$ Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen 2001). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor Mx3000P™.

PCR-Ansatz:	10 µl <i>Maxima™ Probe qPCR Master Mix</i>
	7 µl ddH ₂ O
	1 µl <i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>
	2 µl Template-cDNA

PCR-Zyklus	95°C 10 min	
	95°C 30 sec	40 Zyklen
	60°C 1 min	

3.2.12 Northern Blotting

Ein Northern Blot dient der qualitativen und quantitativen Analyse von RNA und kann genutzt werden, um die Expression eines Gens und dessen Transkriptgröße zu untersuchen. Hier wurde der *Mouse Neuronal Tissue*

Northern Blot(Gentaur) verwendet, bei dem jeweils 20 µg RNA pro Probe aufgetrennt und auf eine Membran geblottet vorliegt.

3.2.12.1 Markierung einer Sonde mit α -[³²P]-dCTP

Zur Herstellung einer Hybridisierungssonde wurde die vollständige cDNA des murinen *Cln6* bzw. *Gapdh* als Ladekontrolle durch PCR vervielfältigt (die verwendeten Primersequenzen sind in 8.1.5 zu finden). Zur Markierung der Sonde wurde das *Rediprime™ II Random Labelling System*(GE Healthcare) nach Herstellerangaben verwendet und die markierte Sonde anschließend durch eine *illustra™ ProbeQuant™ G-50 Column*(GE Healthcare) von ungebundenen Nukleotiden befreit. Zur Elution wurden 200 µl Elutionspuffer eingesetzt. 10 µl des Eluats wurden zur Messung der Cerenkovstrahlung am Flüssigkeitsszintillationszähler verwendet. Die spezifische Aktivität wurde berechnet und lag in der Regel bei 10⁹cpm/µg DNA.

3.2.12.2 Hybridisierung eines Northern Blot mit α -[³²P]-markierten Sonden

20 x SSC-Lösung	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
Waschlösung 1	2 x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung 2	0,2 x SSC 0,1% (w/v) SDS

Der Blot wurde mit 70 µl/cm² *Rapid-Hyb™ Buffer* (GE Healthcare) für 30 min bei 65 °C im Hybridisierungsofen vorinkubiert. Dann wurden 3x10⁶ cpm radioaktiv markierte Sonde pro ml Puffer mit 100 µl Heringsperma-DNA vermischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis gekühlt. Diese Mischung wurde zu dem Hybridisierungspuffer hinzugegeben und der Blot über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Am Folgetag wurde der Blot mit Waschlösung 1 und 2 jeweils zweimal für 15 min bei RT gewaschen. Dann folgten zwei weitere Waschschrirte mit Waschlösung 2 bei 65 °C, bevor der Blot in Plastikfolie eingeschlagen und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert wurden.

Zur Entfernung der Sonde wurde der Blot mit 100 ml kochender 0,1 % (w/v) SDS Lösung übergossen und 15 min bei RT unter Wippbewegung inkubiert.

3.2.13 In-situ-Hybridisierung

Durch In-situ-Hybridisierung können mRNA-Transkripte in Gewebeschnitten detektiert werden. Zur Detektion wird eine Antisense-mRNA (3'-5') Sonde verwendet, als Negativkontrolle dient die entsprechende Sense-Sonde (5'-3'). Die In-situ Hybridisierungen in dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Fehr, Zentrum für molekulare Neurobiologie (ZMNH) Hamburg, durchgeführt.

3.2.13.1 Markierung einer Sonde mit [³⁵S]-UTP

Zur Detektion der *Cln6* mRNA wurde eine 243 bp lange Sonde verwendet, die durch einen Restriktionsverdau der *Cln6* cDNA mit dem Enzym KpnI erzeugt wurde. Dieses Fragment wurde einmal in 5'-3' Richtung (Sense Sonde) und einmal in 3'-5' Richtung (Antisense Sonde) in den Vektor *pBluescript* (Thermo Scientific) eingefügt. Durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym HindIII wurde das jeweilige Konstrukt linearisiert und konnte zur Synthese einer mit [³⁵S] radioaktiv markierten Sonde mit dem *MaxiScriptTM Labelling Kit* (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerangaben verwendet werden. Anschließend wurden ungebundene Nukleotide durch Aufreinigung mit einer *illustraTM ProbeQuantTM G-50 Column* (GE Healthcare) nach Herstellerangaben entfernt.

3.2.13.2 Hybridisierung von Hirnschnitten

Hybridisierungspuffer	25 mM Pipes pH 6,8
	50 % (v/v) Formamide
	25 mM EDTA
	750 mM NaCl
	0,2% (w/v) SDS
	10 mM DTT
	5 x Denhardt's Lösung
	250 µg/ml denaturiertes Heringsperma
	250 µg/ml Hefe-tRNA

Waschpuffer 1	4 x SSC
Waschpuffer 2	10 mM Tris/HCl pH 7,5 500 mM NaCl 1 mM EDTA
Waschpuffer 3	2 x SSC

Mäuse verschiedener Altersstufen wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Hirne entnommen und auf Trockeneis eingefroren. Kryoschnitte von 14 μm Dicke wurden an einem Cryomikrotom angefertigt und auf mit Aminalkylsilan beschichtete Objektträger aufgenommen. Die Schnitte wurden in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert und dann 10 min in 0,1 M Triethanolamine, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Dehydrierung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe von 60, 80, 95 und 100 % Ethanol, gefolgt von Chloroform und 100 und 95 % Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet und für 3 h bei 50 °C in Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Für die Hybridisierung wurden dem Hybridisierungspuffer zusätzlich 10 % (w/v) Dextransulfat und 5 ng markierte Sonde zugesetzt. Die Schnitte wurden für 12-14 h bei 50 °C in wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Es folgten vier Waschschriffe in Waschpuffer 1 und zwei Inkubationen in Waschpuffer 2 für 30 min bei 37 °C, einmal davon mit 40 $\mu\text{g/ml}$ RNase A, und zwei Waschschriffe bei 50 °C in Waschpuffer 3. Die Schnitte wurden durch eine weitere Inkubation in der aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet. Zur ersten Entwicklung wurden die Schnitte auf einen Kodak MR X-Ray Film exponiert. Zur zweiten Entwicklung in Fotoemulsion wurden die Schnitte kurz in Kodak NTB-3 Nuclear Track Emulsion getaucht und für 8 Wochen exponiert. Nach Entwicklung in Kodak D19 und Fixierung in Kodak Unifix wurden die Schnitte mit Hämalaun gefärbt und eingedeckelt.

3.2.14 Membran-Hefe-2-Hybrid System

Mittels des Hefe-2-Hybrid Systems können Protein-Protein Interaktionen in der eukaryotischen Hefezelle untersucht werden. Die Grundlage dieses Systems ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren bei bestehender Interaktion von

einem so genannten *Bait* und einem *Prey* Protein. Der aktivierte Transkriptionsfaktor induziert die Expression von Reportergenen, die eine Selektion auf Mangelmedien erlaubt. In dieser Arbeit wurde das „Y2H Membrane Protein Kit“ (MoBiTec) verwendet, dass auf einem Split-Ubiquitin-System basiert (Claussen et al. 1997). Bei dem Split-Ubiquitin System liegt das *Bait*-Protein gekoppelt an eine C-terminale Proteindomäne des Ubiquitins vor. Das *Prey*-Protein ist an den N-terminalen Teil des Ubiquitins fusioniert. Interagieren *Bait* und *Prey* führt dies zur Rekonstruktion eines funktionellen Ubiquitins. Ubiquitin-bindende Proteine spalten dann einen am Ubiquitin gebundenen Transkriptionsfaktor, der im Nukleus die Transkription verschiedener Reportergene initiiert. Das Prinzip ist in Abb. 3.2.1 dargestellt.

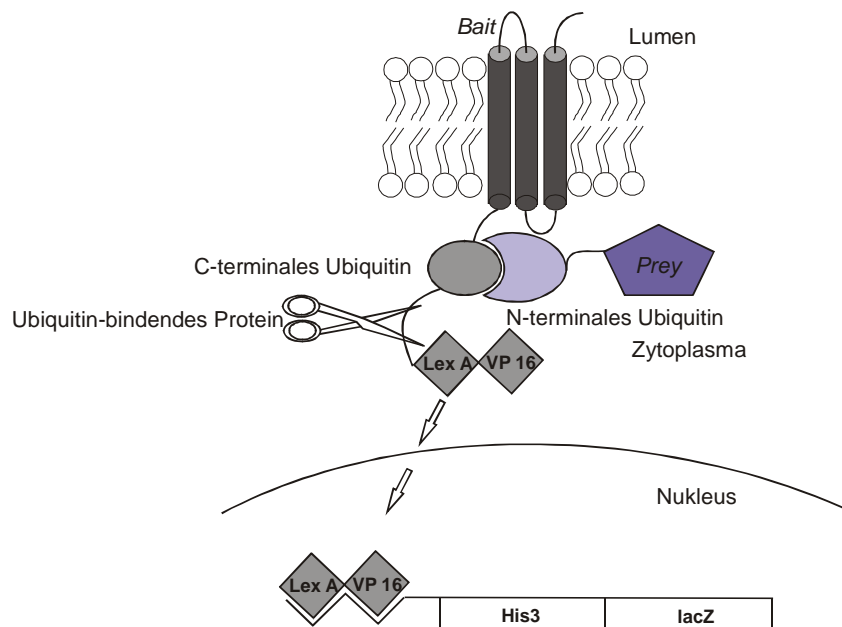


Abb. 3.2.1 Prinzip des Split-Ubiquitin Systems

Ein membranständiges *Bait* Protein ist an den C-terminalen Teil eines Ubiquitin-Moleküls und einen artifiziellen Transkriptionsfaktor gekoppelt. Interagiert dieses *Bait*-Protein mit einem *Prey* Protein, das an den N-terminalen Teil des Ubiquitins fusioniert ist, kommen beide Teilstücke des Ubiquitins in enge räumliche Nähe und fügen sich zu einem vollständigen Ubiquitin. Daraufhin wird durch Ubiquitin-bindende Proteine der Transkriptionsfaktor Lex A-VP 16 abgespalten und kann zum Nukleus translozieren, wo es zu Initiierung der Transkription von Reportergenen kommt.

Verwendet man als *Prey* einen cDNA-Mix, z.B. synthetisiert aus neuronaler RNA, ist es möglich mit Hilfe des Selektionssystems neue, unbekannte Interaktionspartner für ein Protein zu identifizieren. Die zur Durchführung dieses Screenings notwendigen Schritte sind in Abb. 3.2.2 dargestellt. Zunächst erfolgt

die Klonierung der cDNA des zu untersuchenden Proteins in einen *Bait*-Vektor. Anschließend wird eine Kontrolle der Expression des *Bait*-Proteins durchgeführt. Wird das *Bait*-Protein exprimiert, kann der Hefestamm sequentiell mit dem *Bait*-Konstrukt und der cDNA-Bibliothek transformiert werden. Anschließend folgt die Transformation des *Bait*-exprimierenden Hefestammes mit einer cDNA-Bibliothek und eine Anzucht der Hefezellen auf Mangelmedium ohne Histidin. Der nächste Selektionsschritt ist der β -Galactosidase Test. Aus den so ausgewählten Hefekolonien werden die *Prey*-Vektoren isoliert und in *E.coli* amplifiziert. Durch Restriktionsverdau und Sequenzierung der Vektoren können die möglichen Interaktionspartner identifiziert werden. Zur weiteren Verifizierung der Interaktion werden schließlich *Bait*- und *Prey*-Vektor kotransformiert, um eine mögliche Interaktion zu bestätigen.

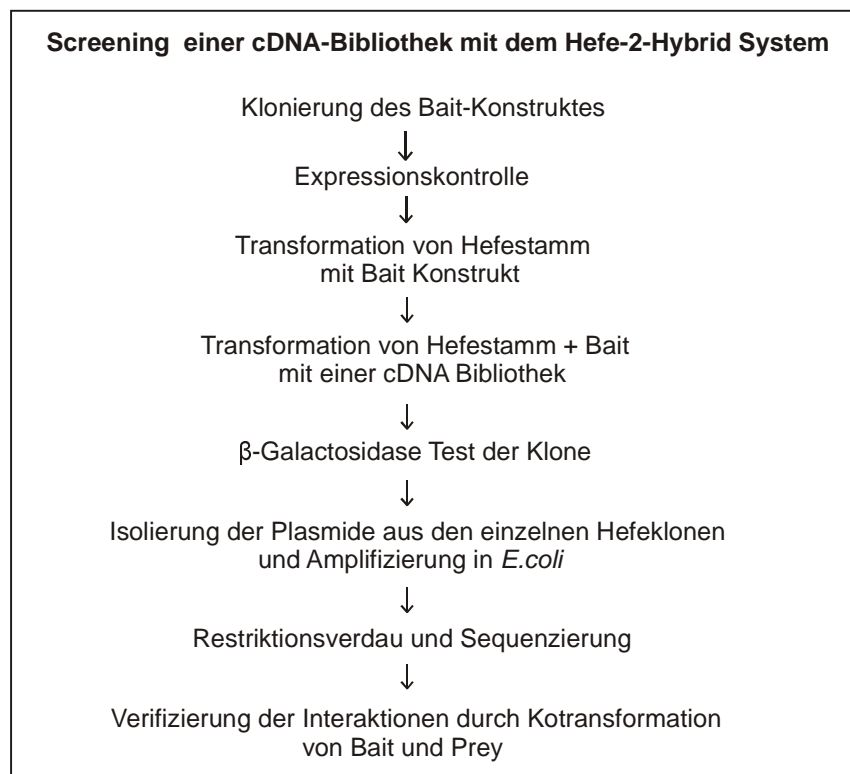


Abb. 3.2.2 Schema über die Durchführung eines cDNA-Bibliothek Screenings mit dem Hefe-2-Hybrid System

3.2.14.1 Kultivierung des Hefestammes NMY51

Der Hefestamm wurde in YPAD Medium mit 25 % (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert. Zur Kultivierung wurde mit einem sterilen Inokulationsstab etwas

gefrorene Kultur abgekratzt, auf einer YPAD Agar Platte ausgestrichen und für 3-4 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde bei 4 °C gelagert und alle 8 Wochen neu ausgestrichen.

3.2.14.2 Transformation von Hefen mit Plasmid DNA

Als Vorbereitung für das Screening einer cDNA-Bibliothek oder zur Überprüfung von Protein-Protein Interaktionen durch das Hefe-2-Hybrid System werden Hefezellen mit einem bzw. mit zwei verschiedenen Konstrukten transformiert. Die Selektion der transformierten Hefezellen erfolgt durch Mangelmedien, da der verwendete Hefestamm unter anderem die Aminosäuren Leucin und Tryptophan nicht selbstständig synthetisieren kann. Die hierzu benötigten Gene werden durch die *Bait*- (Leucin) oder *Prey*-Vektoren (Tryptophan) kodiert.

PEG/LiOAc-Mix	50 % (v/v) PEG 4000	3,6 ml
	1 M LiOAc	540 µl
	Lachssperma-DNA	375 µl

Vor Verwendung wurde Lachssperma-DNA bei 95 °C für 5 min denaturiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Als Vorkultur wurden 5 ml YPAD-Medium mit mehreren Hefekolonien angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt (220 rpm). Für bis zu 25 Transfektionsreaktionen wurden 50 ml YPAD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Kultur wurde dann bei 3.200 x g für 5 min sedimentiert und das Pellet in 2,5 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Zur Transfektion wurden jeweils 1,5 µg DNA pro Konstrukt in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach der Zugabe von 300 µl PEG/LiOAc-Mix wurden 100 µl Zellsuspension hinzugegeben und durch pipettieren vermischt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 min, anschließend wurden die Zellen bei 3.200 x g für 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 150 µl 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert. Jeweils 50 µl wurden auf den entsprechenden Platten (SD-leu oder SD-leu-trp) ausplattiert und 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.2.14.3 Transformation von Hefen mit einer cDNA-Bibliothek

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wird der Hefestamm NMY51, der bereits das *Bait*-Konstrukt trägt, mit einer cDNA Bibliothek transformiert. Durch

Selektion auf Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin werden einzelne Klone, die Konstrukte miteinander interagierende *Bait* und *Prey* Protein enthalten, angezüchtet.

10 x TE-Puffer	100 mM Tris/HCl pH 7,5 20 mM EDTA	
LiOAc/TE-Mix	1M LiOAc 10 x TE-Puffer pH 7,5 ddH ₂ O, steril	1,1 ml 1,1 ml 7,8 ml
PEG/LiOAc-Mix	50 % (v/v) PEG 4000 1 M LiOAc 10 x TE-Puffer pH 7,5	12 ml 1,5 ml 1,5 ml

Als Vorkultur wurden 10 ml SD-leu-Medium mit mehreren Kolonien NMY51 + *Bait*-Konstrukt angeimpft und für 8 h bei 30 °C geschüttelt (220 rpm). Mit dieser Kultur wurden weitere 100 ml SD-leu angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden 200 ml SD-leu-Medium mit der Übernachtskultur bis zu einer OD₆₀₀ = 0,15 inokuliert, zu einer OD₆₀₀ = 0,6 herangezogen, dann in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 5 min bei 700 x g sedimentiert. Die resultierenden Pellets wurden in jeweils 30 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Nach Resuspension der Pellets in jeweils 1 ml LiOAc/TE Mix wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 5 min bei 700 x g sedimentiert und die Pellets in 600 µl PEG/LiOAc-Mix resuspendiert. Für die Transfektionsreaktion wurden in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen die folgenden Bestandteile durch Vortexen vermischt:

Transfektionsreaktion	cDNA-Bibliothek Lachssperma-DNA Zellsuspension PEG/LiOAc-Mix	7 µg 100 µl 600 µl 2,5 ml
-----------------------	---	------------------------------------

Die Reaktion wurde für 45 min bei 30 °C inkubiert und währenddessen im Abstand von 15 min durchmischt. Anschließend wurden pro Ansatz 160 µl DMSO zugegeben, durch Schütteln sofort vermischt und für 20 min bei 42 °C

inkubiert. Nach diesem Hitzeschock wurden die Zellen bei 700 x g für 5 min abzentrifugiert, jedes Pellet in 3 ml YPAD-Medium resuspendiert, alle Zellsuspensionen zusammengeführt und für 90 min unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Diese Kultur wurde wiederum bei 700 x g für 5 min sedimentiert und in 4,8 ml 0,9 % NaCl resuspendiert. Jeweils 300 µl dieser Zellsuspension wurden auf 16 SD-leu-trp-his-Platten (Ø 16 mm) ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum auf dem Mangelmedium SD-leu-trp-his wird zum einen durch Kotransformation mit *Bait*- und *Prey*-Konstrukten, die die cDNA für Schlüsselenzyme der Leucin bzw. Tryptophanbiosynthese tragen, ermöglicht. Zum anderen wird durch Interaktion von *Bait* und *Prey* das Wachstum auf Medium ohne Histidin ermöglicht.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden von der Zellsuspension Verdünnungen von 1:100, 1:1000 und 1:10000 in 0,9 % NaCl gemacht und 100 µl jeder Verdünnung auf eine SD-leu-trp-Platte (Ø 10 mm) ausgestrichen. Nach der vorgeschriebenen Inkubationszeit wurden alle Kolonien auf den SD-leu-trp-his-Platten nummeriert und ein Teil der Kolonie auf einer frischen Platte (Ø 10 mm) ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend für einen β-Galactosidase-Test verwendet. Die Kolonien der Verdünnungsreihe auf SD-leu-trp-Platten wurden gezählt und die Anzahl der transformierten Klone berechnet, die bei mindestens $2 \cdot 10^6$ liegen sollte.

Anzahl der transformierten Klone

$$= \text{Anzahl der Kolonien} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10 * 4,8$$

3.2.14.4 β-Galactosidase-Test

Reaktionsmix	0,5 M Na ₃ PO ₄ pH 7,0	10 ml
	10 % (w/v) SDS	200 µl
	1 M KCl	200 µl
	1 M MgCl ₂	20 µl

Durch Aktivität des Enzyms β-Galactosidase, dessen Transkription ebenfalls durch LexA-VP16 initiiert wird, wird das Substrat X-Gal oxidiert, was in einer blauen Färbung von β-Galactosidase-positiven Kolonien resultiert. Pro Platte (Ø 16 mm) wurden 10 ml 0,2 %-ige (w/v) Agaroselösung in der Mikrowelle zu Kochen gebracht und anschließend zu dem Reaktionsmix gegeben. Nach

Abkühlen der Lösung auf ca. 40 °C wurden 200 µl X-Gal Substrat (40 mg/ml in DMSO) hinzugegeben und die Mischung zügig und gleichmäßig auf der jeweiligen Platte des Screens verteilt. Nach einer Inkubation von 30 - 60 min bei RT war eine blaue Färbung der β -Galactosidase positiven Kolonien zu erkennen.

3.2.14.5 Überprüfung von Interaktionen

Um das Wachstum von Hefezellen, die ein möglicherweise interagierendes *Bait-Prey* Paar enthielten zu überprüfen, wurden immer die gleichen Mengen an Hefezellen nach der folgenden Methode ausplattiert: Nach der Kotransformation wurden von den jeweiligen Platten mehrere Klone zum Animpfen von 5 ml SD-leu-trp-Medium verwendet und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Von dieser Kultur wurde die OD₆₀₀ bestimmt, eine OD-Einheit Zellsuspension auf ein Volumen von 1000 µl aufgefüllt und 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen mit sterilem ddH₂O angefertigt. Von jeder Verdünnung wurden 4 µl auf SD-leu-trp und SD-leu-trp-his Platten gespottet, 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert und das Wachstum dokumentiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden routinemässig bei 37 °C unter 5 % CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt. Alle drei Tage wurde eine Passage durchgeführt. Standardmässig wurde DMEM mit GlutaMax™, 10 % (v/v) FKS und Penicillin/Streptomycin verwendet.

3.3.2 Trypsinieren von Zellen

Vor der Trypsinierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um die Inhibition von Trypsin durch FKS aus dem Medium zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit 0,05 % (w/v) Trypsin/EDTA bei 37 °C bis zur Ablösung der adhären Zellen inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von

Kulturmedium mit FKS abgestoppt und die Zellen nach Vereinzelung durch Pipettieren in der gewünschten Dichte ausplattiert.

3.3.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen einer konfluenten 75 cm²-Kulturflasche trypsinisiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1.000 x g abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 3 ml DMEM mit 10 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO aufgenommen und jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein Kryogefäß überführt. Danach wurden die Zellaliquots in einem *Nalgene™Kryo 1 °C Freezing Container* bei -80 °C für 24 h eingefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.3.4 Transiente Transfektion von Zellen

Um Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren wurde das *JetPei™ Transfektionsreagenz*(Peqlab) nach Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzten Mengen von DNA und Reagenz richteten sich nach der Größe der Kulturschale. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80 % und 12 h nach Transfektion wurde ein Medienwechsel vorgenommen.

3.3.5 Immunhistochemie von Gewebeschnitten

Die Mäuse wurden mit 750 µl 12 % Ketamin, 8 % Xylazin in PBS betäubt und mit PBS gefolgt von 4 % Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Die benötigten Organe wurden entnommen und über Nacht im gleichen Fixativ bei 4 °C inkubiert. Zur Lagerung wurden die Organe in 30 % (w/v) Sucrose in PBS überführt. Schnitte und Färbungen wurden von Dr. Markus Damme, Universität Bielefeld, durchgeführt (Damme et al. 2011).

3.3.6 Elektronenmikroskopie

Die Mäuse wurden mit 750 µl 12 % Ketamin, 8 % Xylazin in PBS betäubt und mit PBS gefolgt von 4 % Paraformaldehyd/1 % Glutaraldehyd in PBS perfundiert. Die benötigten Organe wurden entnommen und über Nacht im gleichen Fixativ bei 4 °C inkubiert. Von den entnommenen Hirnen wurde am

nächsten Tag Vibratomschnitte von 150 µm Dicke angefertigt und in PBS gelagert. Herzen und Lebern wurden in ca. 1 x mm große Würfel geschnitten. Die folgende Einbettung in Epon, die Anfertigung von 60 nm Ultradünnschnitten sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Michaela Schweizer, Serviceeinheit Elektronenmikroskopie, ZMNH Hamburg durchgeführt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Gewebehomogenaten

Homogenisierungspuffer	mM Tris/HCl pH 7,4
	250 mM Sucrose ¹⁰
	1 mM EDTA
	Protease-Inhibitor-Cocktail

Mausgewebe wurde in 5-fachem Volumen Homogenisierungspuffer mit 20 Hüben in einem Dounce Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 500 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand mit einem Volumen Homogenisierungspuffer mit 1 % Triton-X 100 versetzt und vor der Lagerung bei -20 °C 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Auftrennung in Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktionen wurden die Homogenate 15 min bei 15.000 x g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt (lösliche Fraktion). Das Pellet wurde in 50 µl PBS pro 250 µg Ausgangsgewebe mit 1 % (w/v) SDS und Proteaseinhibitoren resuspendiert (unlösliche Fraktion).

3.4.2 Herstellung von Zellhomogenaten

Konfluente Zellen wurden in ihrer Kulturschale zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS (6 cm Schale) mit einem Zellschaber abgeschabt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 1.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µl PBS + 0,5 % (v/v) Triton X-100 + Proteaseinhibitoren resuspendiert und 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden anschliessend bei 15.000 x g für 15 min bei

4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Mit Hilfe des *Bio-Rad Protein Assay* wurde die Proteinkonzentration in Zell- und Gewebehomogenaten bestimmt. Dazu wurden je nach zu erwartender Konzentration 2-5 µl Proteinextrakt mit ddH₂O auf ein Volumen von 800 µl verdünnt, mit 200 µl des Reagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt und die Probenkonzentration mittels einer BSA-Eichgeraden ermittelt.

3.4.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Sammelgel	100 mM Tris/HCl pH 6,8 4 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel	375 mM Tris/HCl pH 8,8 12,5 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (w/v) SDS 0,016 % (w/v) APS 0,08 % (v/v) TEMED
Solubilisierungspuffer (2x)	250 mM Tris/HCl pH 6,8 2 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin Coomassie® Blue G
Anodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,6 192 mM Glycin
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,6 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Größe wurde durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Für große Gele erfolgte der Gellauf bei RT und 55 mA/Gel für ca. 2 h, für Mini-Gele wurde bis zum Erreichen der Lauffront des Trenngels bei 85 V und anschließend für weitere 45 min bei 180 V aufgetrennt.

3.4.5 Western Blot Analyse

Transferpuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Blockpuffer	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20 5 % (w/v) Milchpulver
Waschpuffer	1 x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20

Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Lösung 1	100 mM Tris/HCl pH 8,5 0,44 mM p-Cumarinsäure 2,7 mM Luminol
Lösung 2	0,1 mM Tris/HCl pH 8,5 0,015 % H ₂ O ₂

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine zur Immundetektion auf ein Nitrozellulose-Membran transferiert. Dies erfolgte in einer Elektrobplot-Apparatur mit Transferpuffer. Proteine aus grossen Gelen wurden mit insgesamt 81.000 mA bei einer maximalen Geschwindigkeit von 900 mA/min übertragen, für Proteine aus Minigelen wurden 24.000 mA bei 400mA/min verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h mit Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (siehe 3.1.10.1) in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei RT unter konstanter Wippbewegung. Nach drei 10 minütigen

Inkubationen mit Waschpuffer wurde für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper in Blockpuffer (3.1.10.2) inkubiert. Zur Detektion der Proteinbanden wurden jeweils 5 ml Lösung 1 und 2 vermischt, die Membran 1 min in der Mischung geschwenkt und anschließend durch Exposition eines Röntgenfilm oder mit der *ChemiDoc™ XRS Maschine* (Biorad) entwickelt.

Zur Entfernung der gebundenen Antikörper wurden Membranen für 5 min in ddH₂O, 5 min in 0,2 M NaOH und erneut 5 min in ddH₂O inkubiert. Danach konnten sie für eine Immundetektion mit anderen Antikörpern erneut verwendet werden.

3.4.6 Subzelluläre Fraktionierung von Hirnhomogenaten

Puffer A	320 mM Sucrose 1 mM NaHCO ₃ 1 mM MgCl ₂ 1mM CaCl ₂
----------	--

Puffer B	320 mM Sucrose 1 mM NaHCO ₃
----------	---

Nach Tötung durch Genickbruch wurde das Maushirn entnommen und in 4 ml Puffer A + Proteaseinhibitor pro Gramm Gewebe mit 40 Hüben im Dounce Homogenisator homogenisiert. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 1.400 x g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Pellet erneut in 2 ml Puffer A mit Proteaseinhibitoren pro Gramm Gewebe homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurden die Überstände vereinigt und die lysosomale/mitochondriale Fraktion bei 13.800 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,4 ml Puffer B pro Gramm Ausgangsmaterial resuspendiert. Anschließend wurde ein Sucrosegradient durch Überschichtung von je 2,6 ml 0,85 M, 1M und 1,2 M Sucrose gebildet und das resuspendierte Pellet als oberste Schicht hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 83.000 x g für 2 h in der *Sorvall Discovery M120* Zentrifuge im *SW40 Ti* Rotor waren zwischen den einzelnen Schichten drei weiße Banden erkennbar, sowie ein Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens. Die sichtbaren Banden 1-3 wurden vorsichtig

abgenommen, mit 250 mM Sucrose auf ein Volumen von 1,5 ml verdünnt und für 30 min bei 100.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die resultierenden Pellets (= Fraktion I, II, III) sowie das Pellet am Boden des Gradienten wurden in 200 µl 0,5 % (v/v) Triton X-100 resuspendiert (= Fraktion IV).

3.4.7 Isolierung von Mannose-6-Phosphat-haltigen Proteinen

Waschpuffer 1	PBS 0,2 % (v/v) Triton X-100
Waschpuffer 2	PBS 0,2 % (v/v) Triton X-100 10 mM Glucose-6-Phosphat 10 mM Mannose
Elutionspuffer	PBS Proteaseinhibitoren 10 mM Mannose-6-Phosphat

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Mannose-6-phosphat (M6P)-haltigen Proteinen wurde eine Matrix aus M6P-Antikörper (3.1.10.1) an *Affi-Gel10-Beads* (Bio-Rad) (Müller-Loennies et al. 2010) verwendet. Zur Isolierung von M6P-haltigen Proteinen aus Proteinextrakten wurden jeweils 500 µg Protein in 1 ml 0,5 % (v/v) Triton X-100 und Proteasinhitoren in PBS und 200 µl Mannose-6-Phosphat-Beads eingesetzt. Zunächst wurden die Beads mit 10-fachem Volumen 10 mM Phenanthrolin in PBS gewaschen und anschließend mit dem Proteinextrakt für 30 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mischung aus Proteinextrakt und Beads in eine Mobitec Säule überführt. Die nicht-gebundene Fraktion wurde aufbewahrt und die Beads mit jeweils 20 Volumen Waschpuffer 1 und 2 gewaschen. Der letzte Waschschrift wurde aufbewahrt. Zur Elution wurden dreimal jeweils 200 µl Elutionspuffer für 10 min hinzugegeben und anschließend zusammengeführt. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zur restlosen Entfernung aller gebundenen Proteine erfolgte ein finaler Waschschrift mit 3-fachem Volumen 100 mM Glycin (pH 2,7), der mit 1 M Tris/HCl (pH 8) neutralisiert und ebenfalls aufbewahrt wurde. Zur Analyse

wurden jeweils 1% der eingesetzten Menge, des Durchflusses und des letzten Waschschruttes sowie 100 % der Eluate durch SDS-PAGE Elektrophorese aufgetrennt und durch Western Blot oder massenspektrometrische Analyse analysiert.

3.4.8 Messung der β -Hexosaminidase-Enzymaktivität

Substratpuffer	100 mM Natriumcitrat pH 4,6 10 mM p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucoopyranosid 0,04 % Natriumazid 0,2 % BSA
Stoppuffer	0,4 M Glycin/NaOH pH 4,6

Zur Messung der β -Hexosaminidase-Enzymaktivität wurden 5-10 μ l der jeweiligen Probe mit ddH₂O auf ein Volumen von 100 μ l verdünnt, mit 100 μ l Substratpuffer vermischt und für 30 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 800 μ l Substratpuffer wurde die OD₄₀₅ photometrisch gemessen und die Enzymaktivität nach der folgenden Formel berechnet.

$$A = \frac{\left(\frac{\Delta E}{\Delta t}\right) * V_M}{(\epsilon * d * V_P)}$$

A = Enzymaktivität [U; 1 U = 1 μ mol/min]

$\Delta E/\text{min}$ = Differenz der Extinktion (Absorption) pro Zeit

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [für Nitrophenol 18,45 / μ mol x cm]

d = Schichtdicke der Küvette [1 cm]

V_M = Meßvolumen in der Küvette [1000 μ l]

V_P = Probenvolumen während der Reaktion [200 μ l]

3.4.9 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Um Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren, wurden 20 μ g des entsprechenden Proteinextraktes durch SDS-PAGE von Detergenzien wie Triton X-100 befreit. Dazu wurde der Gellauf, nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, beendet und die Proteine durch eine Silberfärbung angefärbt. Die Silberfärbung wurde laut Herstellerangaben mit dem *FireSilver*

Staining Kit (Proteome Factory) durchgeführt. Zur massenspektrometrischen Identifizierung der enthaltenen Proteine wurden die entsprechenden Banden des Gels von Dr. Maria Trusch, Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, ausgeschnitten, proteolytisch verdaut und durch LC-MS/MS mit Electron Spray Ionisation (ESI)-Trap massenspektrometrisch analysiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit *Mascot MS/MS Ion Search* (www.matrixscience.com).

3.4.10 Protein Fragment Complementation Assay

Der Protein Fragment Complementation Assay (PCA) ist eine Methode zur Überprüfung von Protein-Protein Interaktionen. Die cDNA des verwendeten Reporterproteins, hier des *yellow fluorescent protein* (YFP), wird in eine N- und eine C-terminale Hälfte aufgeteilt (Nyfeler und Hauri 2007). Diese cDNAs werden an ein *Bait* bzw. *Prey*-Protein fusioniert. Zur Untersuchung einer möglichen Expression wurden *Bait*- und *Prey*-Konstrukt in eukaryotische Zellen transfiziert (3.3.4). Bei Interaktion des *Bait*- und *Prey*-Proteins kommt es zur Rekonstitution der beiden YFP-Hälften. Die resultierende Fluoreszenz konnte bei einer Wellenlänge von 514 nm im Fluoreszenzmikroskop Perkin Elmer Ultra-View VoX[®] detektiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der *Cln6*-mRNA-Expression

Sowohl das humane als auch das murine *Cln6* werden ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert (Gao et al. 2002; Wheeler et al. 2002). Regionale oder temporäre Expressionsmuster im Hirn könnten Hinweise auf die Funktion des CLN6-Proteins liefern. Da für die Detektion von Cln6 auf Proteinebene kein Antikörper existiert, wurde im Folgenden die Genexpression von *Cln6* durch verschiedene Methoden an Wildtyp-Mäusen untersucht. Um zu analysieren, ob die Expression von *Cln6* durch krankheitsverursachende Mutationen beeinflusst wird, wurde die Expression im Mausmodell der CLN6-Erkrankung, der *nclf*-Maus, untersucht.

4.1.1 Regionale Expression von *Cln6* im Hirn

Zur Analyse der regionalen Expression von *Cln6* im Maushirn wurde ein *Mouse Neuronal Tissue Northern Blot* mit [³²P]-radioaktiv-markierten cDNA Sonden gegen *Cln6* bzw. *Gapdh* als Ladekontrolle hybridisiert (Abb.4.1.1 A). Die Signalstärke wurde auf die Expression von *Gapdh* normalisiert und die Expression im Lobus frontalis, dem frontalen Cortex, gleich 1 gesetzt. Für *Cln6* konnte ein einzelnes Transkript mit einer Größe von 2,1kb nachgewiesen werden, was der Größe der Referenzsequenz der mRNA (NM_001033175.2) entspricht. Weitere Transkripte, die auf alternatives Spleißen hindeuten könnten, wurden nicht detektiert. *Cln6* wurde in jeder getesteten Region exprimiert, wobei die Werte zwischen dem 0,8-fachen im Hippocampus und Bulbus olfactorius und dem 2-fachen im Ponschwanken (Abb. 4.1.1 A). Zusätzlich wurden Realtime-PCR-Analysen durchgeführt (Abb.4.1.1 B). Als *Template* wurde ein standardisierter cDNA-Pool verwendet, der aus Hirnregionen von *NIH Swiss Mice* am postnatalen Tag (P) 35 gewonnen wurde (*qPCR Assay Mouse Developmental Tissue*). Zur Normalisierung wurde die Expression von β -Aktin verwendet und die relative *Cln6*-Expression im Lobus frontalis gleich 1 gesetzt.

Hohe *Cln6*-Expressionen konnten im Cerebellum (2,5-fach), im Hypothalamus (2,3-fach), sowie im Mesencephalon (1,9-fach) und im Bulbus olfactorius (1,6-fach) beobachtet werden (Abb. 4.1.1 B).

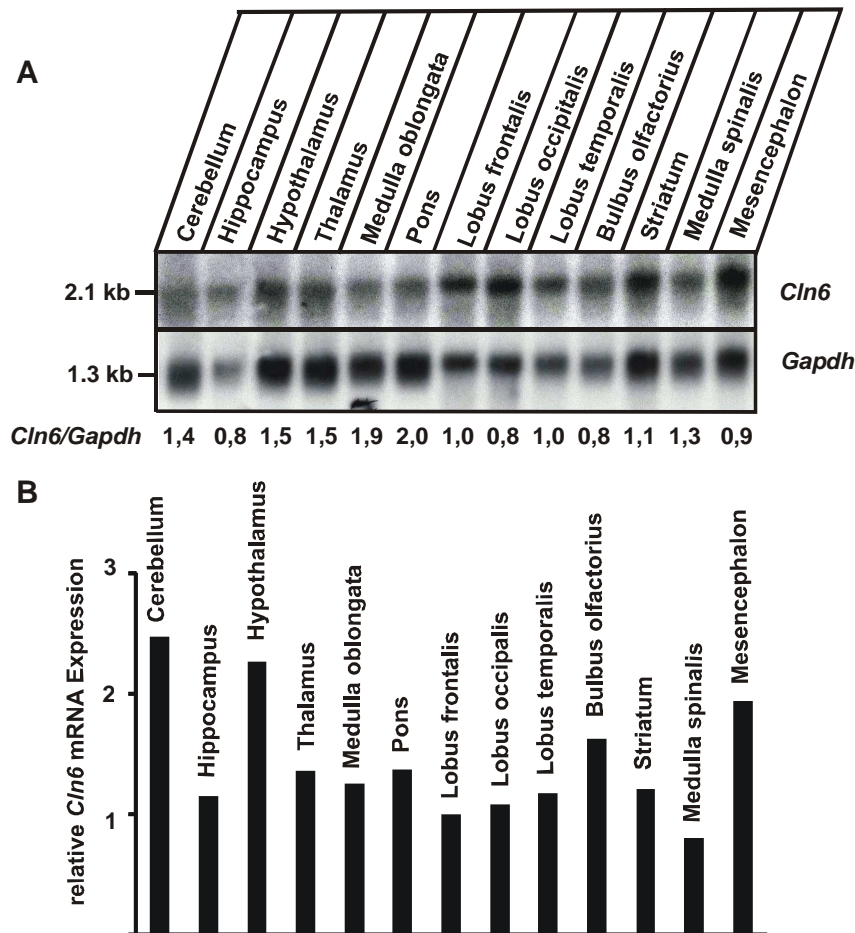


Abb. 4.1.1 Expression der *Cln6*-mRNA in verschiedenen Hirnregionen der Maus

(A) Ein Northern-Blot, der 20 µg total RNA pro Gewebe enthält (*Mouse Neuronal Tissue Northern Blot*), wurde mit [³²P]-markierten cDNA-Sonden (3.2.12.1) gegen *Cln6* und *Gapdh* als Ladekontrolle hybridisiert und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. Die *Cln6*-Expression wurde quantifiziert und auf die Expression von *Gapdh* normalisiert. Die Expression im *Lobus frontalis* wurde gleich 1 gesetzt. **(B)** Durch Realtime-PCR wurde die relative *Cln6*-mRNA-Expression bestimmt. Als Template wurde ein cDNA-Pool verwendet, der aus poly-A⁺ RNA am postnatalen Tag 35 gewonnen wurde (*qPCR Assay Mouse Developmental Tissue*). Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA Expression von β-Aktin. Die Auswertung erfolgte nach der ΔΔCt-Methode, die Expression im frontalen Cortex wurde gleich 1 gesetzt.

Zum direkten Nachweis der *Cln6*-mRNA in Zellschichten und Zellpopulationen des Hirns der Maus wurde die *in-situ*-Hybridisierungsmethode genutzt. Hierzu wurden sagittale Hirnschnitte (16 µm) angefertigt und mit einer *Cln6*-

spezifischen, [^{35}S]-radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle diente eine Sense-Sonde (siehe auch Abb. 4.1.3).

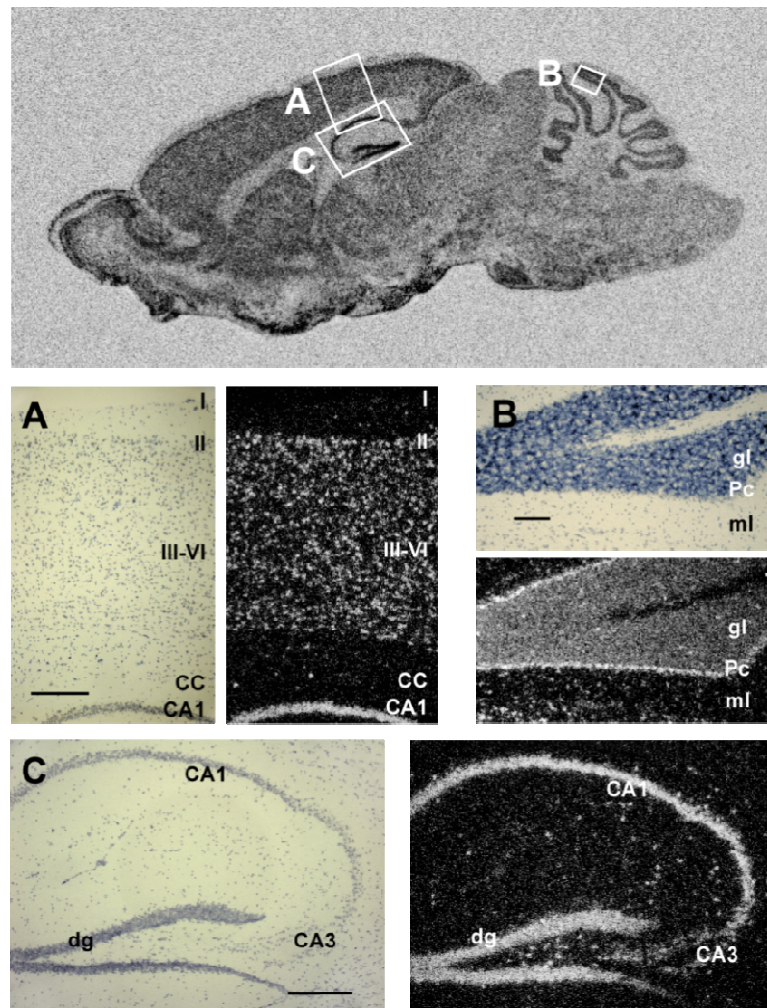


Abb. 4.1.2 In-situ Hybridisierung zum Nachweis von *Cln6*-mRNA im Maushirn.

Sagittale Kryoschnitte eines adulten Maushirns wurden in PFA fixiert, mit einer [^{35}S]-markierten Antisense-*Cln6*-RNA-Sonde hybridisiert und auf einen Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurden Zellkerne mit Hämalaun blau angefärbt, die in den Hellfeldaufnahmen der vergrößerten Ansichten zu sehen sind. Die *Cln6*-Transkripte wurden als reduzierte Silberkörner in einer Photoemulsionsschicht sichtbar gemacht. **(A)** Detailaufnahme des Cortex. I-IV = Schichten des Cortex, CC = Corpus Callosum, CA = Cornu Ammonis. **(B)** Vergrößerte Aufnahme des Cerebellums. gl = Granularschicht, Pc = Purkinjezellschicht, ml = Molekularschicht. **(C)** Detailaufnahme des Hippocampus. CA = Cornu Ammonis, dg = Gyrus dentatus. Die Länge der angegebenen Balken entspricht jeweils 500 μm .

In Abb. 4.1.2 ist erkennbar, dass *Cln6* in allen Regionen des Hirns exprimiert wird. Durch Vergleich der Hell- und Dunkelfeldaufnahmen konnte die *Cln6*-Expression regionalen Zellschichten zugeordnet werden. In der ersten, zellarmen Schicht des Cortex war *Cln6* wenig exprimiert, während die Schichten II-IV eine stärkere Expression aufwiesen. Auffällig war, dass im

Corpus Callosum, einer Schicht, die sehr reich an Gliazellen ist, keine *Cln6*-Expression zu beobachten war (Abb. 4.1.2 A). Im Cerebellum (Abb. 4.1.2 B) ist zu sehen, dass die *Cln6*-mRNA-Spiegel besonders in der Purkinjezellschicht sowie der Molekularschicht stark ausgeprägt sind, während eine niedrige *Cln6*-Expression in der Molekularschicht erkennbar ist. In der primär aus Neuronen bestehenden Hippocampus-Formation sind sowohl Zelldichte als auch *Cln6*-Expression stark ausgeprägt (Abb. 4.1.2 C). Die Daten lassen vermuten, dass hohe Mengen an *Cln6*-mRNA in neuronalen Bereichen zu finden sind, während in Regionen, die hauptsächlich aus Gliazellen bestehen, die *Cln6*-Expression niedrig ist.

4.1.2 Altersabhängige Expression von *Cln6* im Hirn

Die CLN6-Krankheit hat einen progressiven Verlauf. Um zu untersuchen, ob die Expression von *Cln6*-mRNA im Hirn von Mäusen verschiedener Altersstufen unterschiedlich ist, wurden die Menge und zelluläre Lokalisation von *Cln6*-Transkripten durch Realtime-PCR und *in-situ*Hybridisierung untersucht. Die Expression von *Cln6* wurde im Cortex, Cerebellum sowie im Hippocampus im Alter von 0, 7, 14 und 28 Tagen durch Realtime-PCR bestimmt und auf β -Aktin normalisiert (Abb. 4.1.3 A). Der Wert des Cortex am Tag P0 wurde gleich 1 gesetzt. In allen untersuchten Regionen des Maushirns konnte eine altersabhängige Steigerung der *Cln6*-Expression festgestellt werden. Im Cortex bzw. Cerebellum war die *Cln6*-mRNA-Menge im Vergleich von P0 und P28 um das 3- bzw. 3,6-fache erhöht (Abb. 4.1.3 A). Während sich die *Cln6*-Expression im Cortex und Hippocampus nicht wesentlich voneinander unterschied, war die relative *Cln6*-Expression im Cerebellum im Vergleich zum Cortex am P28 um das 1,7-fache erhöht. In einem zweiten Realtime-PCR-Experiment wurde die *Cln6*-mRNA Menge mit Hilfe eines standardisierten cDNA-Pools bestimmt, der aus murinen Hirnregionen am embryonalen Tag (E) 18 bzw. am P 7 oder 35 gewonnen wurde (*qPCR Assay Mouse Developmental Tissue*) (Abb. 4.1.3 B). Die Normalisierung der Werte wurde durch die β -Aktin-Expression in den entsprechenden Proben vorgenommen. Der Wert des Cortex am E18 wurde gleich 1 gesetzt. Da die Entwicklung des Cerebellums hauptsächlich postnatal verläuft, wurde die Genexpression in dieser Hirnregion nur postnatal bestimmt.

Der altersabhängige Anstieg der Expression von *Cln6* konnte mit diesem Experiment bestätigt werden, ebenso die Expressionsunterschiede zwischen Cortex und Cerebellum (Abb. 4.1.3 A, B). Die altersabhängige Steigerung der *Cln6*-Expression war im Hippocampus nicht so stark ausgeprägt wie im Cortex (3-fach) oder im Cerebellum (3,6-fach). Im Vergleich von P0 und P28 war die Expression 1,7-fach (Abb. 4.1.3 A), im Vergleich zwischen E18 und P35 1,6-fach erhöht (Abb. 4.1.3 B).

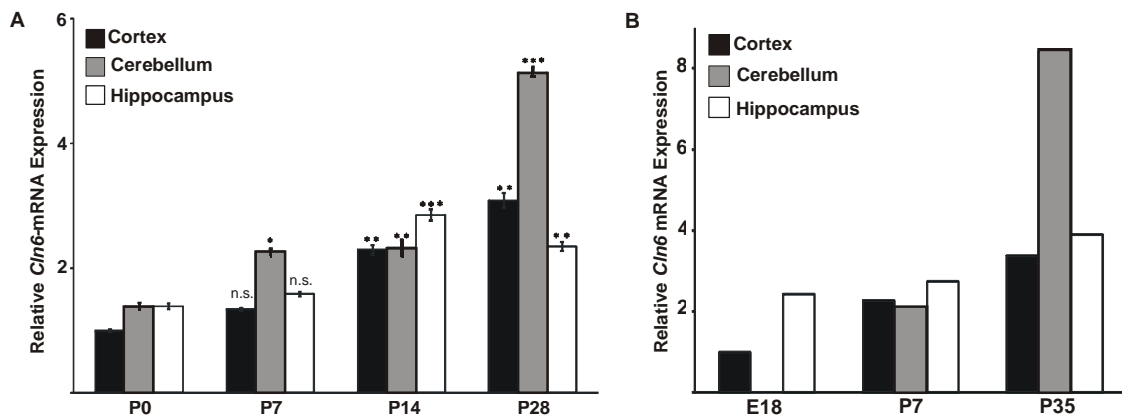


Abb. 4.1.3 Expression von *Cln6* während der Entwicklung des Maushirns

(A) Aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus von Mäusen in verschiedenen Altersstufen wurde RNA isoliert und die *Cln6*-mRNA-Expression durch Realtime-PCR quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Tieren pro Altersstufe. Die Werte sind auf die β -Aktin-Expression normalisiert, und der Quotient des Cortex am P0 wurde gleich 1 gesetzt. Statistische Signifikanzen wurden mittels des *least significant difference test* bestimmt. * = $p < 0,01$, ** = $p < 0,05$, *** = $p < 0,005$ vs. P0, n.s. = nicht signifikant. **(B)** In einem weiteren Experiment wurde als Template für die Realtime-PCR ein cDNA-Pool verwendet, der aus poly-A⁺ RNA gewonnen wurde (*qPCR Assay Mouse Developmental Tissue*). Eine Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Expression von β -Aktin. Die *Cln6*-mRNA-Expression im frontalen Cortex wurde gleich 1 gesetzt.

Bei der Analyse der *Cln6*-Expression in murinen Hirnen verschiedener Altersstufen mittels *in-situ* Hybridisierung konnte ebenfalls eine Steigerung der *Cln6*-mRNA-Menge mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Besonders in der Granularschicht des Cerebellums und im Cortex ist eine auffällige Zunahme der Expression ab P 14 bzw. P 28 zu beobachten. Aufgrund der unterschiedlichen Schnittqualität sowie des schwankenden Hintergrundsignals ist eine quantitative Auswertung nicht möglich (Abb. 4.1.4).

4.1.3 mRNA-Expression von *Cln6* in der *nclf*-Maus

Die *nclf*-Maus hat eine 1bp-Insertion in Exon 4 (c.307insC) des *Cln6*-Gens, die zu einem Frameshift und somit zu einem vorzeitigen Translationsende

(p.R103PfsX62) führt. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Expression der *Cln6*-mRNA zwischen Wildtyp- und *nclf*-Mäusen gibt, wurden *in-situ* Hybridisierungen und Realtime-PCR-Analysen durchgeführt.

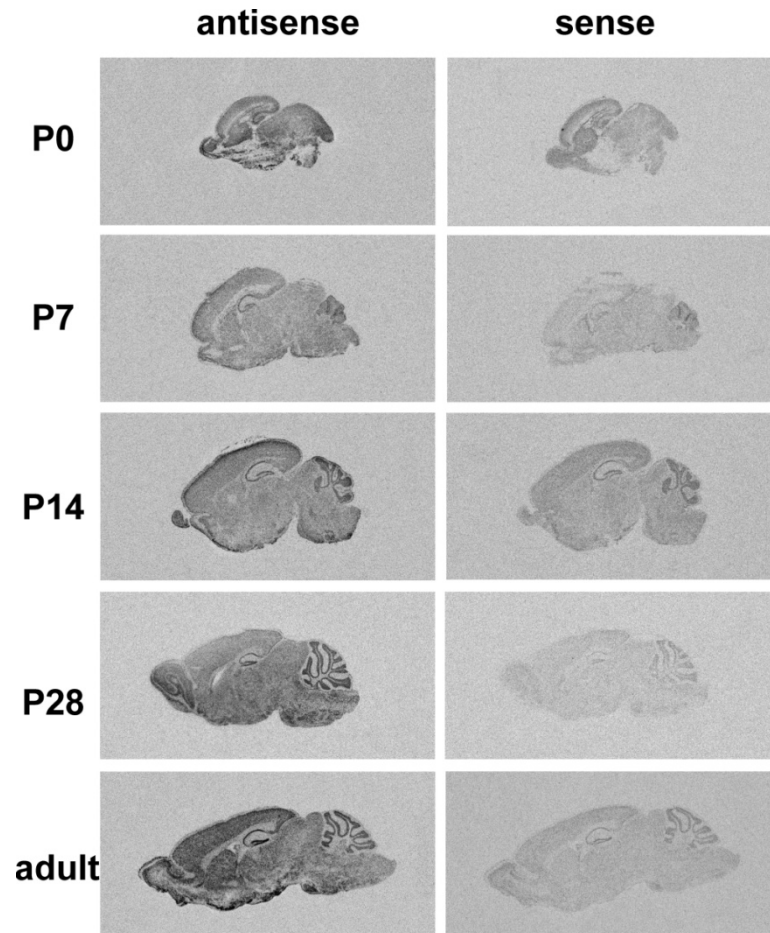


Abb. 4.1.4 Expression von *Cln6* während der postnatalen Entwicklung des Maushirns

Sagittale Kryoschnitte von Maushirnen verschiedener Altersstufen wurden fixiert, mit einer [³⁵S]-markierten Antisense (3'-5') *Cln6*-RNA-Sonde hybridisiert und auf einen Röntgenfilm exponiert. Als Negativkontrolle diente eine entsprechende Sense-(5'-3') Sonde. P = postnataler Tag.

Die Verteilung der *Cln6*-Expression im Hirn der *nclf*-Maus am P 28 ist vergleichbar mit der Wildtyp-Kontrolle, allerdings ist die Intensität des Signals und somit der *Cln6*-mRNA-Spiegel geringer (Abb.4.1.5 A). Die geringere Menge von *Cln6*-mRNA wurde durch Realtime-PCR in verschiedenen Hirnregionen von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen im Alter von 0 und 28 postnatalen Tagen bestätigt. Insgesamt ist die Expression von *Cln6* in *nclf*-Mäusen beider Altersstufen um 30 - 40 % reduziert (Abb. 4.1.5 B). Die altersabhängige

Zunahme der *Cln6*-mRNA ist auch in *nclf*-Mäusen zu beobachten, ebenso die Unterschiede zwischen Cortex, Hippocampus und Cerebellum.

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass *Cln6* in allen Regionen des murinen Hirns exprimiert wird, wobei die Expression besonders in der Purkinjellschicht des Cerebellums sowie der CA1-Region und dem Dentate Gyrus des Hippocampus stark ausgeprägt ist.

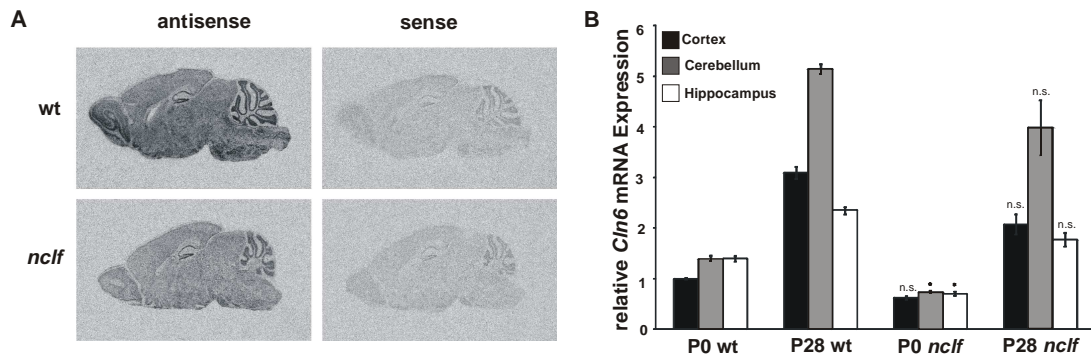


Abb. 4.1.5 *Cln6*-Expression in *nclf*-Mäusen

(A) Sagittale Kryoschnitte von Hirnen aus Wildtyp (wt) und *nclf*-Mäusen im Alter von 4 Wochen wurden fixiert, mit einer [³⁵S]-markierten Antisense (3'-5') *Cln6*-RNA-Sonde hybridisiert und auf einen Röntgenfilm exponiert. Als Negativkontrolle diente eine entsprechende Sense-(5'-3') Sonde. (B) Aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus von P0 und P28 Mäusen wurde RNA isoliert und die *Cln6*-mRNA-Expression durch Realtime-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei Tieren pro Altersstufe. Die Werte sind auf die β-Aktin Expression normalisiert, und der Wert des Cortex von P0 Wildtyp-Tieren wurde gleich 1 gesetzt. Statistische Signifikanzen wurden mittels des *least significant difference test* bestimmt. * = $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant

Im Verlauf der Entwicklung des Maushirns steigt die *Cln6*-Expression an. In der *nclf*-Maus ist eine im Vergleich zum Wildtyp um 30-40 % reduzierte Expression zu beobachten.

4.2 Pathologie der *nclf*-Maus

Die *nclf*-Maus ist ein natürliches Mausmodell der CLN6-Erkrankung mit einer 1bp-Insertion in Exon 4 (c.307insC) (Bronson et al. 1998; Gao et al. 2002). Diese Insertion führt zu einem Frameshift und einem vorzeitigen Translationsabbruch (p.R103PfsX62). Es wurden Analysen zur Pathologie dieses Mausmodells durchgeführt, da die genauen Mechanismen der Neurodegeneration bislang unbekannt sind.

4.2.1 Hirnatrophie, Akkumulation von Speichermaterial und Mikrogliose

Bei der CLN6-Erkrankung kommt es zur Neurodegeneration und zur Speicherung von autofluoreszentem Material in verschiedenen Geweben der Maus (Bronson et al. 1998). Um die Verteilung dieses Speichermaterials zu untersuchen, wurden von fixierten Hirnen 54 Wochen alter *nclf*- und Wildtyp-Mäusesagittale Schnitte angefertigt und mikroskopisch analysiert.

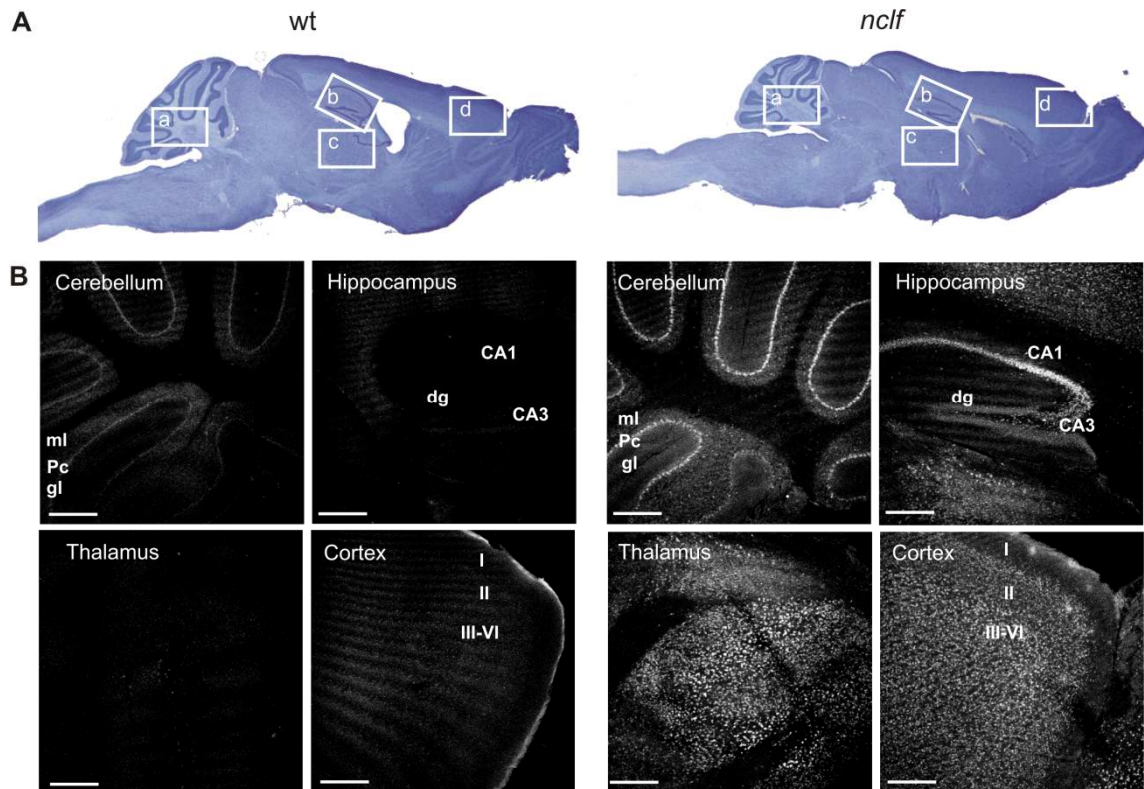


Abb. 4.2.1 Autofluoreszentes Speichermaterial im Hirn von *nclf*-Mäusen

(A) Nissl-Färbung an 35 μm sagittalen Hirnschnitten von Wildtyp- (wt) und *nclf*-Mäusen. Markiert sind a) Cerebellum, b) Hippocampus, c) Thalamus und d) Cortex. (B) Vergrößerte Ausschnitte der markierten Regionen zeigen autofluoreszentes Speichermaterial in verschiedenen Regionen des *nclf*-Hirns. gl = Granularschicht, Pc = Purkinjzellschicht, ml = Molekularschicht, CA = Cornu Ammonis, dg = Gyrus dentatus, I-VI = cortikale Schichten. Als Kontrollen sind Wildtyp-Hirnschnitte im gleichen Alter dargestellt. Der Balken entspricht jeweils 500 μm .

Mittels einer Nissl-Färbung wurde grob das Erscheinungsbild des Hirns von 54 Wochen alten Wildtyp- und *nclf*-Mäusen begutachtet und es war zu sehen, dass die Größe des Hirns, insbesondere des Cerebellums, in *nclf*-Mäusen leicht verringert war (Abb. 4.2.1 A). Autofluoreszentes Speichermaterial war im gesamten Hirn der *nclf*-Maus verteilt. Bei höherer Auflösung war auffällig, dass sich im Bereich des Cerebellums besonders die Purkinjzellschicht durch starke

Autofluoreszenz hervorhob. Weiterhin zeigten die Neurone der CA1-Region des Hippocampus sowie des Thalamus eine vermehrte Akkumulation von Speichermaterial (Abb. 4.2.1 B). In der kortikalen Schicht I dagegen war kaum Autofluoreszenz nachweisbar, während in den Schichten II-VI die Intensität des Speichermaterials zunahm (Abb. 4.2.1 B).

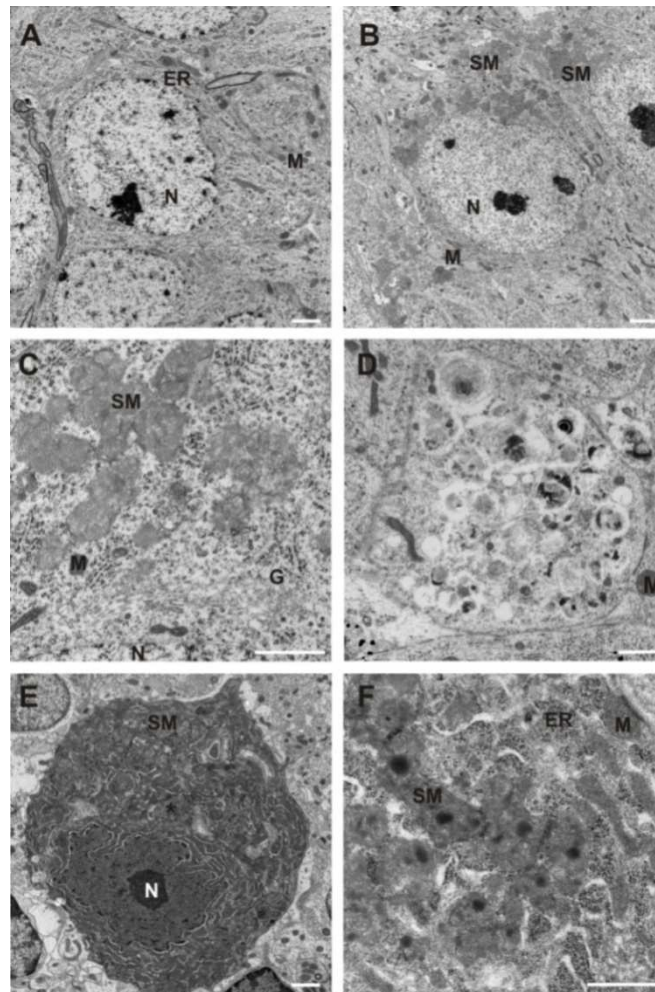


Abb. 4.2.2 Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild des Speichermaterials

Von in PFA/Glutaraldehyd fixierten Hirnen von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und analysiert. N= Nukleus, M= Mitochondrium, G= Golgi-Apparat, SM=Speichermaterial. (A) Wildtyp-Neuron der CA1 Region des Hippocampus, (B-D) CA1-Region des Hippocampus einer *nclf*-Maus, (E-F) Aufnahmen aus Purkinjezellen einer *nclf*-Maus. Die Balken entsprechen jeweils 2 μ m.

Das elektronenmikroskopische Erscheinungsbild des Speichermaterials ist in Abb. 4.2.2 dargestellt. Es ist zu sehen, dass in CA1-Neuronen des Hippocampus von Kontrolltieren kein Speichermaterial zu finden ist (Abb. 4.2.2 A), während sich diese Region bei *nclf*-Mäusen durch Speichermaterial mit NCL-typischem rectilinearem und *fingerprint*-Profilauszeichnete (Abb. 4.2.2

B, C). Oftmals war das Zytoplasma neuronaler Zellen bis hin zur Plasmamembran mit Speichermaterial gefüllt. Die Lagen des Golgi-Apparates wirkten mitunter faserartig und zersetzt (Abb. 4.2.2 C). Vereinzelt waren vergrößerte dendritische oder axonale Strukturen zu finden, die mit nicht identifizierbaren Speicherprodukten gefüllt waren (Abb. 4.2.2 D). Die Purkinjezellen von *nclf*-Mäusen zeigten eine sehr dunkle Färbung. Das Speichermaterial in diesen Zellen wies eine sehr hohe Dichte auf, erkennbar an dem teilweise stark verdunkelten Erscheinungsbild. (Abb. 4.2.2 E,F).

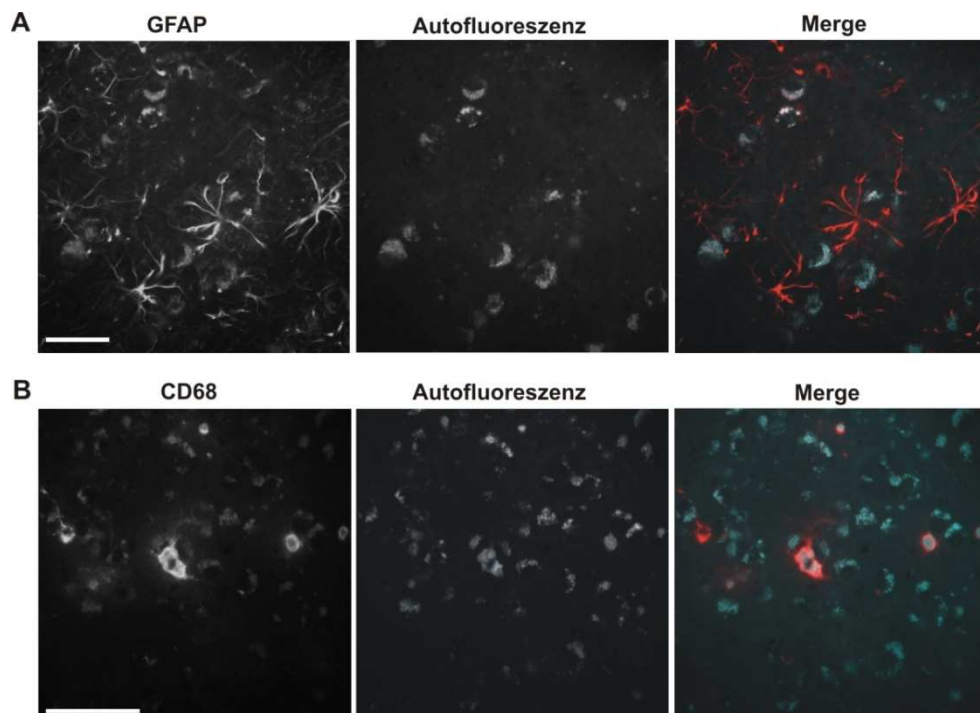


Abb. 4.2.3 Lokalisation des Speichermaterials im *nclf*-Hirn

Zur genaueren Lokalisation des autofluoreszenten Speichermaterials (türkis) wurden murine 35 μm Hirnschnitte von PFA-fixiertem *nclf*-Gewebe angefertigt und immunhistochemisch mit einem (A) anti-*glial fibrillary acid protein*(GFAP)(Astroglia)(rot) bzw. einem anti-CD 68 (rot)(Mikroglia) Antikörper angefärbt. Zu sehen sind Ausschnitte des Cortex von 54 Wochen alten Tieren. Der Balken entspricht 33 μm .

Um zu überprüfen, ob autofluoreszentes Speichermaterial auch in Gliazellen akkumulierte, wurden Hirnschnitte mikroskopisch analysiert und mit dem Astrozytenmarker GFAP oder dem Mikrogliazellmarker CD68, angefärbt (Abb. 4.2.3). Die Analyse zeigte, dass das autofluoreszente Speichermaterial im Hirn der *nclf*-Mäuse nicht mit dem Astrozytenmarker kolokalisierte (Abb. 4.2.3 A) und somit nicht in diesen Zellen lokalisiert ist. Allerdings kolokalisierte das autofluoreszente Speichermaterial mit aktivierten Mikrogliazellen,

angefärbtdurch das Markerprotein CD68.Um die Verteilung der aktivierten Mikrogliazellen im *nclf*-Hirn zu untersuchen,wurden Hirnschnitte von 54 Wochen alten Mäusenimmunhistochemisch auf die Anwesenheit des Markerproteins CD68 untersucht (Abb. 4.2.4).

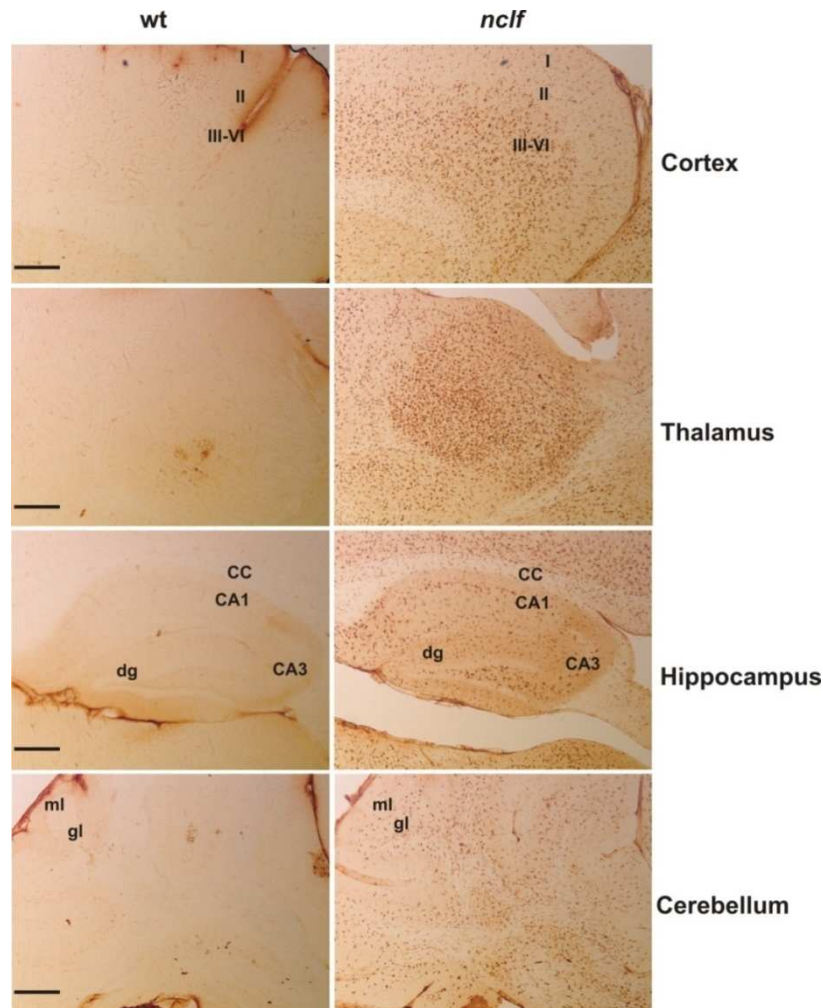


Abb. 4.2.4 Mikrogliose im Hirn der *nclf*-Maus

Zur Darstellung von aktivierten Mikrogliazellen wurden 35 µm Schnitte von PFA-fixiertem Wildtyp-(wt) oder *nclf*-Hirn angefertigt und immunhistochemisch mit einem anti-CD68 Antikörper angefärbt. Zu sehen sind Ausschnitte verschiedener Hirnregionen von 54 Wochen alten Tieren. I-VI = cortikale Schichten, gl = Granularschicht, ml = Molekularschicht, CC = Corpus callosum, dg = Gyrus dentatus, CA = Cornu ammonis. Der Balken entspricht jeweils 500 µm.

Die Verteilung der Mikrogliose war der des Speichermaterials ähnlich. In der oberen Schicht I des Cortex war nur eine schwache Färbung zu beobachten, die von Schicht II bis VI zunahm. Im Thalamus von *nclf*-Tieren war eine Häufung aktivierter Mikrogliazellen nachweisbar. Im Hippocampus gab es vereinzelte Cluster von Mikrogliose während im Corpus Callosum kaum CD 68-positive

Zellen nachweisbar waren. Im Cerebellum war die Färbung hauptsächlich auf die Granularschicht und die weisse Substanz beschränkt (Abb. 4.2.4). Die hier beschriebenen Resultate zeigen, dass im Hirn von *nclf*-Mäusen eine regional spezifische Akkumulation von autofluoreszentem Speichermaterial vorliegt. Dieses Speichermaterial ist hauptsächlich in neuronalen Zellen und in aktivierten Mikroglia lokalisiert. Die Aktivierung von Mikrogliazellen ist ebenfalls regional spezifisch und zeigt ein ähnliches Muster wie die Verteilung des Speichermaterials.

4.2.2 Autophagie im Hirn der *nclf*-Maus

Eine mögliche Ursache von Neurodegeneration kann die Blockade von Autophagie sein (Komatsu et al. 2006). Als Marker für Autophagosomen gilt das *microtubule-associated protein1 light chain 3* (LC3). LC3 wird bei der Bildung von Autophagosomen von seiner cytoplasmatischen Form LC3-I durch Lipidierung und Proteolyse in LC3-II an die Autophagosomenmembran gebunden (Kabeya et al. 2000).

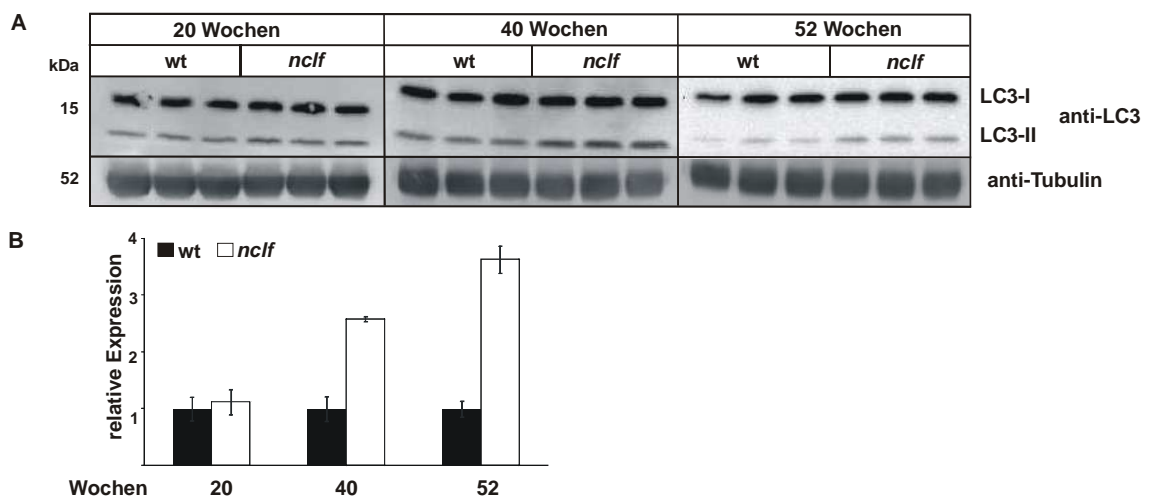


Abb. 4.2.5 Expression von LC3 im *nclf* Hirn

Homogenate der Hirne von Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäusen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und geblottet. **(A)** Als Autophagosomenmarker diente das *microtubule-associated protein1 light chain 3* (LC3), und Tubulin diente als Ladekontrolle. **(B)** Die relative Proteinexpression von LC3-II wurde densitometrisch quantifiziert und auf Tubulin normalisiert. Der Wildtyp-Wert wurde jeweils gleich 1 gesetzt.

Da LC3-II ausschließlich an autophagosomalen Membranen lokalisiert ist und schnell durch lysosomale Hydrolasen degradiert wird, ist seine Signalstärke proportional zur Menge von Autophagosomen (Tanida et al. 2005). Zur Analyse

der Autophagie in der *nclf*-Maus wurden Hirnhomogenate durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels LC3-Western-Blots analysiert. Im Hirn von *nclf*-Mäusen verschiedener Altersstufen konnten erhöhte Mengen von LC3-II detektiert werden (Abb. 4.2.5 A). Während bei Mäusen im Alter von 20 Wochen die Unterschiede noch gering waren, stieg der Spiegel von LC3-II in *nclf*-Mäusen mit fortschreitendem Krankheitsverlauf im Alter von 40 bzw. 52 Wochen auf das 2,6- bzw. 3,6-fache des Wildtyp-Wertes an (Abb. 4.2.5 A, B).

Erhöhte Spiegel von LC3-II können entweder auf einen verminderten Abbau von Autolysosomen oder auf eine gesteigerte Induktion des Autophagie-Prozesses zurückgeführt werden.

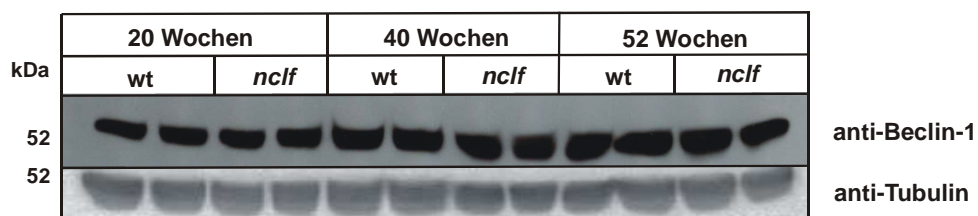


Abb. 4.2.6 Expression von Beclin-1 im *nclf*-Hirn

Homogenate der Hirne von Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäusen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Beclin-1 Western-Blot analysiert, Tubulin diente als Ladekontrolle.

Um die Induktion der Autophagie zu analysieren, wurde ein Western Blot gegen Beclin-1 durchgeführt. Dieses Protein wird zur Bildung des Autophagie-induzierenden PtdIns3K-Beclin-1-Komplexes benötigt und spielt eine Schlüsselfunktion in der Induktion von Autophagie (Funderburk et al. 2010). In keinem der hier untersuchten Altersstadien konnten Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Mäusen festgestellt werden (Abb. 4.2.6). Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Menge von Autophagosomen im *nclf*-Hirn nicht durch vermehrte Induktion von Autophagie, sondern möglicherweise durch einen reduzierten Abbau von Autophagosomen verursacht wird. Das Vorhandensein von p62-positiven Strukturen kann ein weiterer Hinweis auf gestörte Autophagie sein. p62 dient als Adaptor für ubiquitinierte Proteinaggregate, die für den Abbau durch Autophagie bestimmt sind, und interagiert mit LC3 (Bjorkoy et al. 2005; Komatsu et al. 2007). Zum Nachweis dieses Proteins wurden Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktionen aus Maushirnen präpariert und mittels Western Blot analysiert. Bereits im Alter von 20 Wochen konnten in *nclf* Mäusen

erhöhte Mengen von p62 in Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen festgestellt werden (Abb. 4.2.7.).

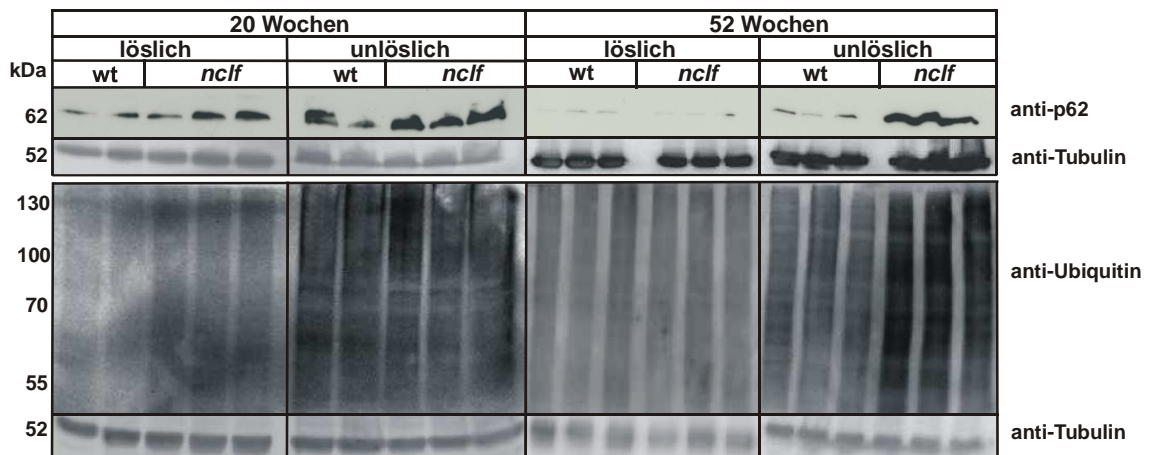


Abb. 4.2.7 Expression von p62 und ubiquitinierten Proteinen im *nclf*-Hirn

Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktionen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. p62 und ubiquitinierte Proteine wurden mittels Western Blot detektiert, Tubulin diente als Ladekontrolle.

Dies war begleitet von einer erhöhten Konzentration ubiquitiniertes Proteine in der Triton X-100-löslichen Fraktion. In 52 Wochen alten *nclf*-Mäusen fanden sich Akkumulationen von p62 und ubiquitinierten Proteinen ausschließlich in der Triton X-100 unlöslichen Fraktion der Hirnhomogenate (Abb. 4.2.7).

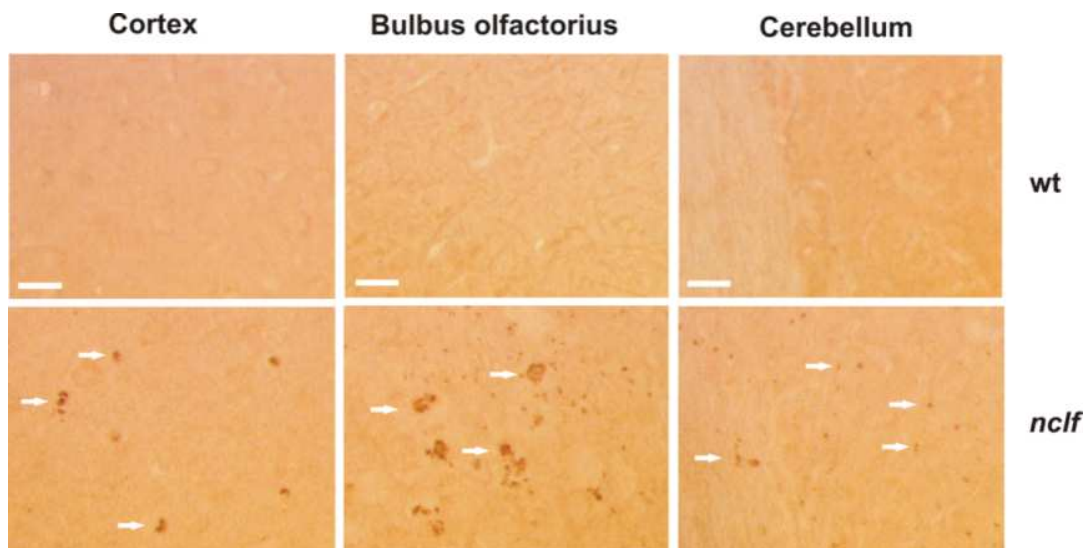


Abb. 4.2.8 Histologische Analyse von p62 in Hirngewebe

Von in PFA-fixiertem Hirngewebe 54-Wochen-alter Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäuse wurden 35 µm dicke Schnitte angefertigt. p62 positive Strukturen in verschiedenen Hirnregionen wurden immunhistochemisch sichtbar gemacht (Pfeile). Der Balken entspricht jeweils 20 µm

Durch Immunhistochemie konnten im Hirn von 54 Wochen alten *nclf*-Mäusen deutliche p62-positive Strukturen von 1 bis 10 μm Größe detektiert werden (Abb. 4.2.8). Besonders ausgeprägt waren diese p62-Aggregate im Bulbus olfactorius und im Cortex. Um die zelluläre Lokalisation dieser Strukturen zu identifizieren, wurde eine Ko-Immunofluoreszenz-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass p62-positive Aggregate nicht in GFAP-positiven Astrozyten oder CD68-positiven Mikrogliazellen lokalisiert waren. p62 wird durch Autophagie abgebaut (Ichimura und Komatsu 2010), und dazu kommt es zur Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen (Liou et al. 1997; Tooze et al. 1990). Die entstandenen Strukturen heißen Autolysosomen. Um zu überprüfen, ob sich die p62-Akkumulationen in diesen Strukturen befinden, wurde eine Ko-Immunofluoreszenz mit dem lysosomalen Membranprotein *lysosome-associated membrane protein 1* (Lamp-1) durchgeführt. Hierbei konnte keine Kolokalisation von p62 mit Lamp-1 beobachtet werden (Abb. 4.2.9).

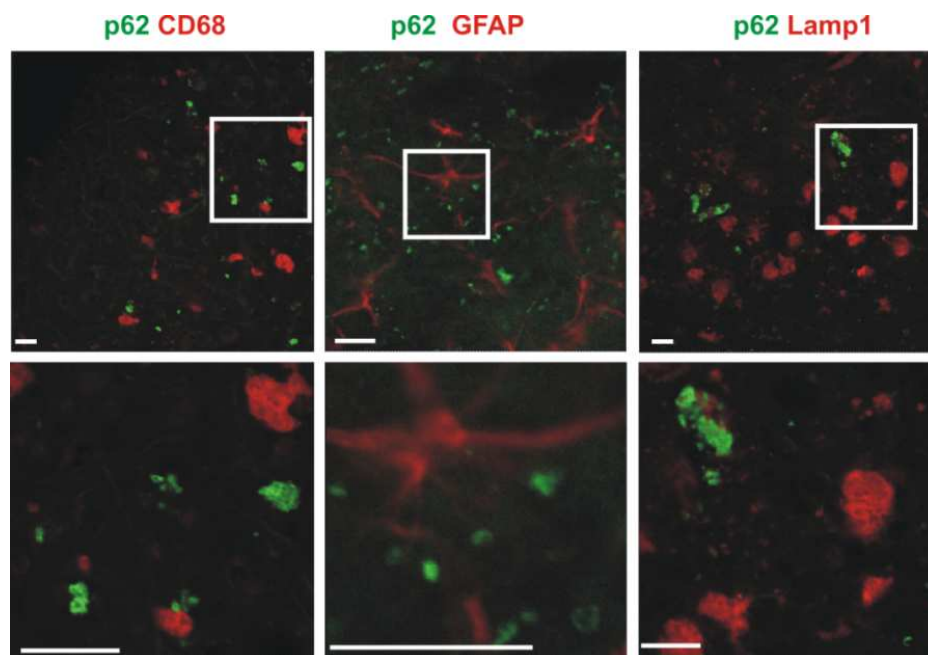


Abb. 4.2.9 Immunofluoreszenz Analyse der Lokalisation von p62

Von in PFA-fixiertem Hirngewebe 54 Wochen alter Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäuse wurden 35 μm dicke Schnitte angefertigt. Immunfluoreszenz-Analysen von p62 (grün) mit CD68 (Mikroglia) (rot), GFAP (Astroglia) (rot), und Lamp1 (Lysosomen) (rot) im olfaktorischen Bulbus von 54 Wochen alten *nclf*-Mäusen. Vergrößerte Bereiche sind weiß markiert. Die Balken entsprechen jeweils 20 μm .

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass es im Hirn von *nclf*-Mäusen zu einer Akkumulation von Autophagosomen kommt. Diese Akkumulation wird nicht von einer erhöhten Autophagie-Induktion durch Beclin-1-abhängige Prozesse verursacht. Des Weiteren kommt es im *nclf*-Hirn zu Akkumulationen von p62-positiven Aggregaten und ubiquitinierten Proteinen.

4.2.3 Pathologische Veränderungen der peripheren Organe

Die Akkumulation von Speichermaterial in NCL-Erkrankungen ist nicht auf das Nervensystem beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf andere Gewebe und Organe. Im Folgenden wurden Veränderungen der peripheren Organe Leber und Herz beschrieben.

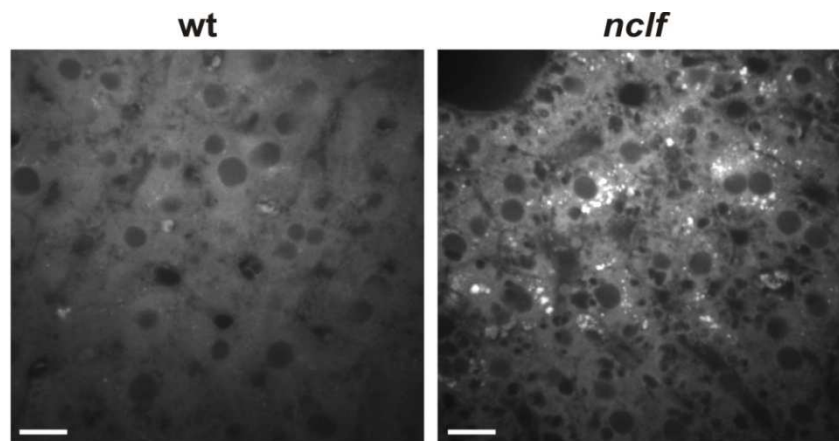


Abb. 4.2.10 Erscheinungsbild der *nclf*-Leber

Von PFA-fixierten Lebern 54-Wochen-alter Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäuse wurden 35 µm dicke Schnitte angefertigt und autofluoreszentes Speichermaterial fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Balken entsprechen 20 µm.

Immunhistochemische Analysen der Leber von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen zeigten, dass die Speicherung von autofluoreszентem Material auch in der Leber stattfindet, jedoch weniger ausgeprägt als im Hirn (Abb. 4.2.10 A). Das Speichermaterial war weder homogen verteilt, noch in allen Zellen vorhanden. Die *nclf*-Maus zeigt somit auch in der Leber pathologische Veränderungen. Das Speichermaterial der Leber wurde zusätzlich elektronenmikroskopisch untersucht und ist in Abb. 4.2.11 dargestellt. Die Speicherung hatte ein rectilineares Erscheinungsbild und war wenig kontrastreich, was auf eine geringe Dichte hinweist. Neben Hepatozyten, die meist nur kleinere Einschlüsse aufwiesen (Abb. 4.2.11B, C), waren auch

vollständig mit Speichermaterial gefüllte Kupfferzellen in der Leber von *ncf*-Mäusen vorhanden (Abb. 4.2.11D). Das morphologische Erscheinungsbild anderer Organellen, wie Mitochondrien und dem ER, war zwischen *ncf*- und Kontrolltieren vergleichbar.

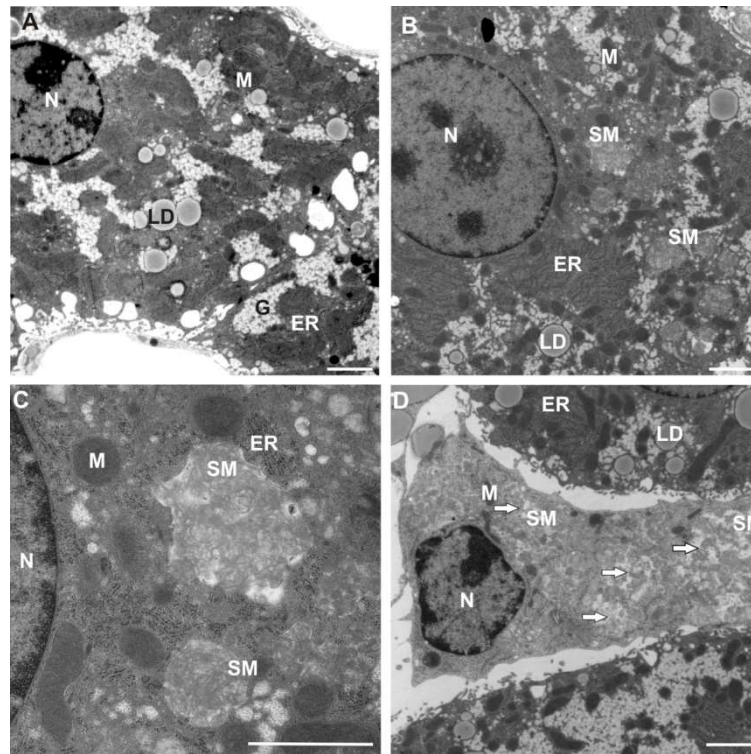


Abb. 4.2.11 Elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild der *ncf*-Leber

Von in PFA/Glutaraldehyd-fixierten Organen von Wildtyp- und *ncf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und elektronenmikroskopisch analysiert. **(A)** Wildtyp-Hepatozyt. **(B-C)** *ncf*-Hepatozyten **(D)** *ncf*-Kupferzelle. N= Nukleus, M = Mitochondrium, LD= Lipid Droplet, SM, Pfeile= Speichermaterial, ER = Endoplasmatisches Retikulum. Der Balken entspricht jeweils 2µm.

In Zellen des Myokards von 3 Monate alten *ncf*-Mäusen wurde autofluoreszentes Speichermaterial bereits beschrieben (Bronson et al. 1998), jedoch nicht näher charakterisiert. Bei der Untersuchung des Herzmuskels von Wildtyp- und *ncf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen (Abb. 4.2.12) wurde festgestellt, dass rectilineares Speichermaterial in Verbindung mit zahlreichen Membranen in *ncf*-Mäusen nachweisbar war. Die Herzmuskelzellen von *ncf*-Mäusen wiesen im Vergleich zum Wildtyp kaum Organellen wie Golgi-Apparat oder ER auf. Die zahlreichen Mitochondrien waren stark vergrößert und nicht in regelmäßigem Muster angeordnet. Des Weiteren waren die Zellkerne verkleinert und wiesen ein anomales Erscheinungsbild auf.

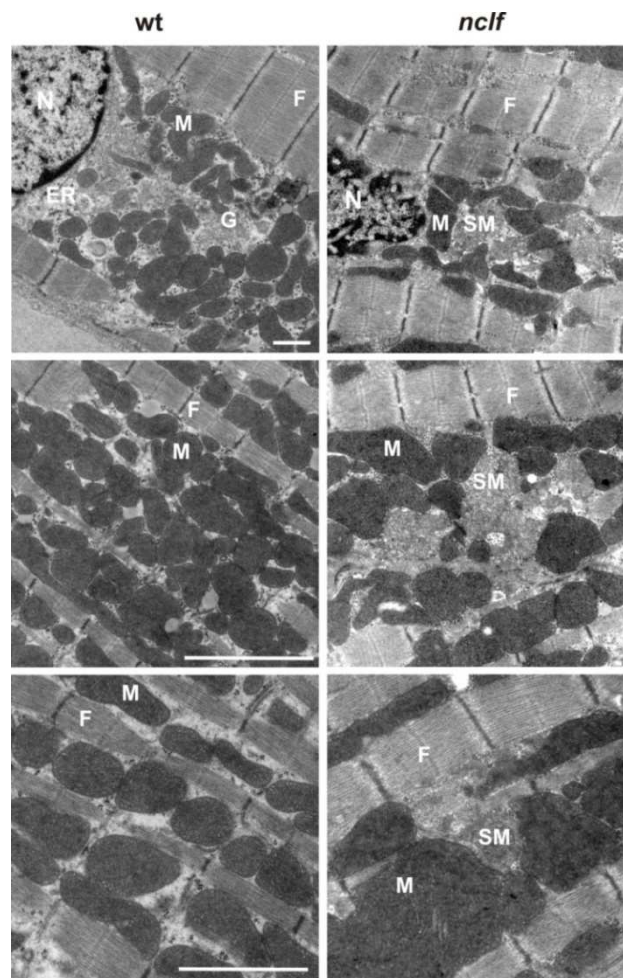


Abb. 4.2.12 Speichermaterial in Herzmuskelzellen der *nclf*-Maus

Von in PFA/Glutaraldehyd-fixierten Herzen von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und elektronenmikroskopisch analysiert. N= Nukleus, M= Mitochondrium, F= Muskelfibrillen, SM= Speichermaterial, ER = Endoplasmatisches Retikulum. Der Balken entspricht 2µm.

Im Leber-und Herzgewebe wurde eine mögliche Störung der Autophagie durch LC3-Western-Blot analysiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl in der Leber als auch im Herzen die Menge von LC3-II in *nclf*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp um das 3,5 bzw. 5-fache erhöht war (Abb. 4.2.13). Im Unterschied zu Hirngewebe konnte weder durch Western-Blot-Analyse von Homogenaten der Leber noch durch immunhistochemische Analyse von Lebergewebeschnitten p62-Aggregate nachgewiesen werden. Der Nachweis von ubiquitinierten Proteinen in Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen der Leber zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp-und *nclf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen (Abb. 4.2.14). Auch im Herzen von *nclf*-Mäusen waren durch Western-Blot-

Analysen weder p62-Akkumulationen detektierbar, noch gab es erhöhte Mengen von ubiquitinierten Proteinen im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 4.2.14).

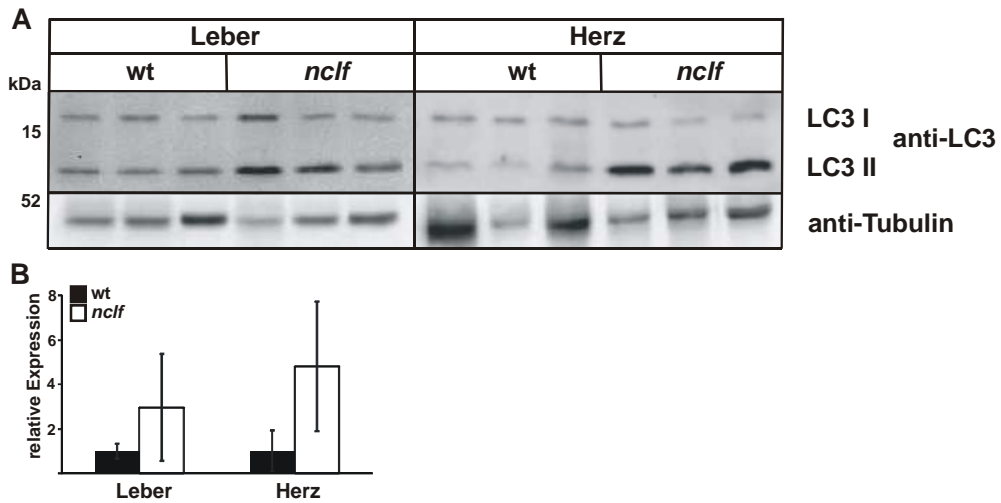


Abb. 4.2.13 Relative Expression von LC3 in der Leber und im Herz von *nclf*-Mäusen

(A) Homogenate von Leber und Herz von Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäusen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und geblottet. Die Detektion des Autophagosomenmarkers *microtubule-associated protein1 light chain 3* (LC3) und Tubulin als Ladekontrolle erfolgte mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern. **(B)** Die Proteinexpression von LC3-II wurde densitometrisch quantifiziert und auf Tubulin normalisiert, der Wildtyp-Wert wurde gleich 1 gesetzt.

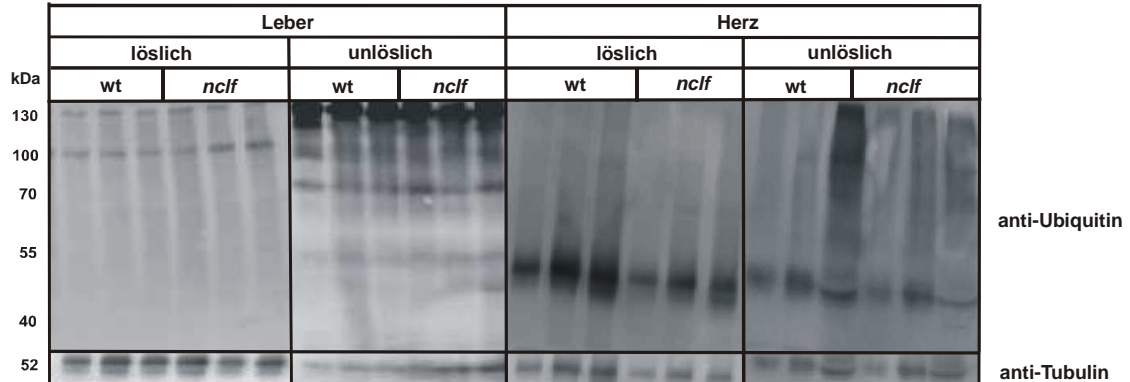


Abb. 4.2.14 Expression von ubiquitinierten Proteinen in der *nclf*-Leber und im Herz

Triton X-100 lösliche und unlösliche Fraktionen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Ubiquitinierte Proteine wurden mittels Western-Blot detektiert, Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *nclf*-Mäuse auch in peripheren Organen wie Leber und Herz eine lysosomale Dysfunktion zeigen, die zur Akkumulation von Speichermaterial führt. Dies wird von einer erhöhten Zahl von Autophagosomen, nicht aber von p62- und Ubiquitin-positiven Akkumulationen begleitet. Im Herz finden sich zusätzlich veränderte mitochondriale Strukturen.

4.3 Untersuchungen des lysosomalen Proteoms in Wildtyp- und *nclf*-Mäusen

Mutationen im Cln6-Protein führen zur Akkumulation von Speichermaterial in Lysosomen. Das im ER lokalisierte Cln6-Protein könnte an Faltung, posttranslationalen Modifikationen oder Sortierung lysosomaler Proteine beteiligt sein, und somit die Aktivität dieser Enzyme im Lysosom beeinflussen. In vorherigen Arbeiten wurden bereits selektiv die Prozessierung, der Transport und die Aktivität einzelner lysosomaler Proteine in *nclf*-Fibroblasten untersucht (Heine et al. 2004), jedoch konnten kein Unterschiede zu Kontrollzellen festgestellt werden. Im Folgenden wurde das lysosomale Proteom von Hirn und Leber von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen auf krankheitsspezifische Veränderungen untersucht.

4.3.1 Analyse des Mannose-6-Phosphat-haltigen Proteoms

Ein Großteil löslicher lysosomaler Proteine wird mit Hilfe von Mannose-6-Phosphat (M6P)-Resten zum Lysosom transportiert. Während M6P-Reste in vielen Geweben im Lysosom durch saure Phosphatasen entfernt werden (Sun et al. 2008), geschieht dies im Hirn nicht (Sleat et al. 1996).

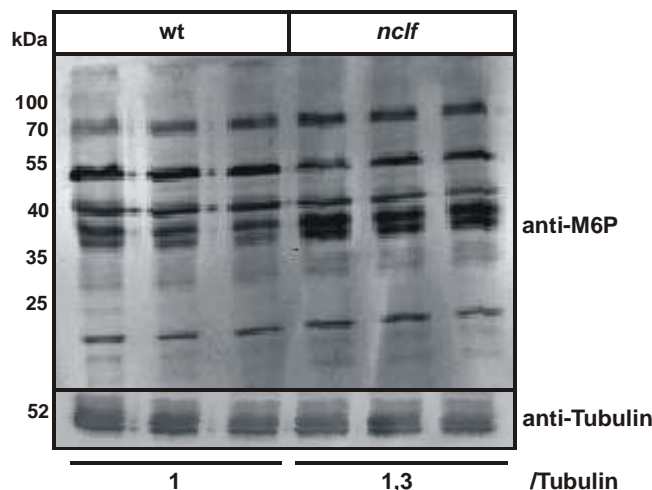


Abb. 4.3.1 Mannose-6-Phosphat-haltige Proteine im Hirn

Hirnhomogenate von 54 Wochen alten Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäusen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltige Proteine durch Western-Blot detektiert. Die Werte wurden auf Tubulin normalisiert und der Wildtyp-Wert gleich 1 gesetzt.

Mit Hilfe eines M6P-spezifischen Antikörpers (Müller-Loennies et al. 2010) wurden M6P-haltige lysosomale Proteine sowohl durch Western-Blot-Analyse als auch immunhistochemisch im Hirn von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen detektiert.

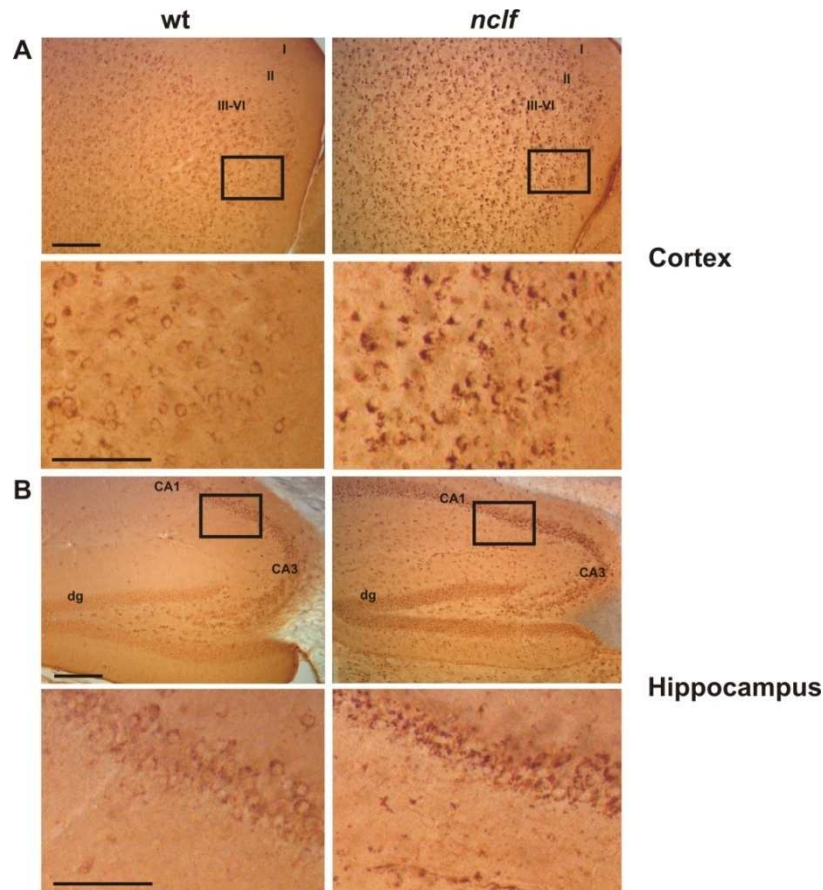


Abb. 4.3.2 M6P-haltige Proteine im Hirn von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen

Murine Hirnschnitte mit 35 µm Dicke wurden von PFA-fixiertem Wildtyp-(wt) oder *nclf*-Gewebe angefertigt und immunhistochemisch mit einem anti-M6P-Antikörper angefärbt. I-VI = cortikale Schichten, dg = Gyrus dentatus, CA = Cornu ammonis. Der Balken entspricht 200 µm.

Durch Western-Blot-Analysen von Hirnextrakten 54 Wochen alter Tiere wurde deutlich, dass im Hirn von *nclf*-Mäusen keine Unterschiede im Bandenmuster M6P-haltiger Proteine im Vergleich zu Kontrolltieren erkennbar waren. Allerdings war die Menge von M6P-haltigen Proteinen im Hirn von *nclf*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp um 30 % erhöht (Abb. 4.3.1). Auch immunhistochemisch konnte in *nclf*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich stärkere Färbung im gesamten Hirn beobachtet werden, dargestellt sind Cortex und Hippocampus (Abb. 4.3.2). In Schicht I des Cortex von *nclf*-Mäusen ist keine M6P-Färbung zu beobachten, während in den Schichten II-VI die Intensitäten

der Färbung ähnlichen sind. Bei Wildtyp-Mäusen sind Schicht I und II des Cortex nicht bzw. nur schwach angefärbt, Schicht III-VI zeigen eine vergleichbare Intensität, die allerdings schwächer ist als in *nclf*-Tieren (Abb. 4.3.2 A). Im Hippocampus von *nclf*-Mäusen ist in den Neuronen von CA1, CA3 und Dentate Gyrus deutlich mehr M6P-positives Material vorhanden als in Kontrolltieren. Im Bereich zwischen CA1 und Dentate Gyrus ist eine vermehrte Färbung erkennbar (Abb. 4.3.2 B).

Zur genaueren Untersuchung der Proteomzusammensetzung wurden M6P-haltige Proteineaffinitätschromatographisch mit Hilfe des M6P-Antikörpers aus Hirnen von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen aufgereinigt.

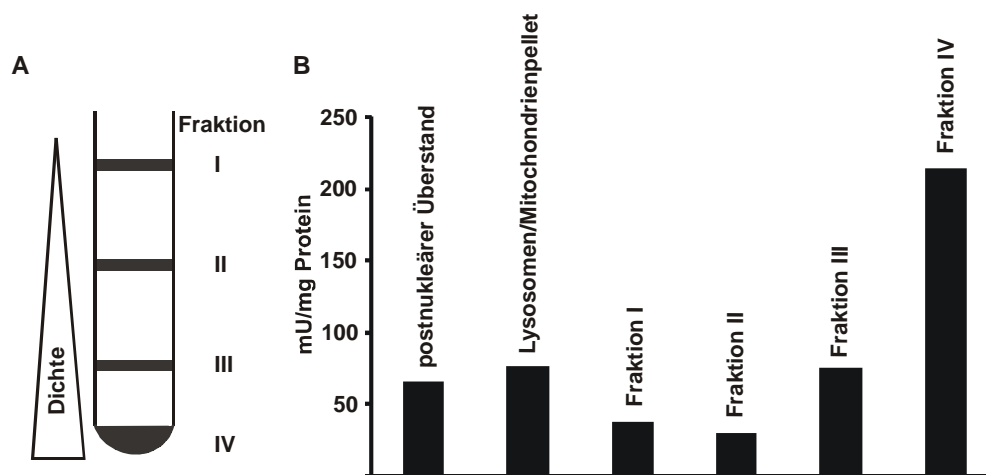


Abb. 4.3.3 Aktivitätsmessung der β -Hexosaminidase nach subzellulärer Fraktionierung

Von postnukleären Überständen des Maushirns wurden zunächst Lysosomen und Mitochondrien pelletiert und dann über einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten fraktioniert (3.4.6). (A) Schematische Abbildung des Sucrosegradienten nach Ultrazentrifugation. (B) Die verschiedenen Fraktionen wurden auf ein gleiches Volumen gebracht und 5 μ l jeder Fraktion wurden zur Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität eingesetzt. Die enzymatische Aktivität ist in mU/mg Protein angegeben.

Um lysosomale Proteine anzureichern, wurden zunächst Lysosomen/Mitochondrienfraktionen durch Differentialzentrifugation gewonnen und anschließend durch einen diskontinuierlichen Sucrose-Dichtegradienten fraktioniert. Dies resultierte in vier Fraktionen unterschiedlicher Dichte (Abb. 4.3.3). Die Aktivitätsmessung des lysosomalen Enzyms β -Hexosaminidase in allen Fraktionen zeigte, dass durch subzelluläre Fraktionierung Lysosomen in der Fraktion IV um das 4-fache im Vergleich zum postnukleären Überstand

angereichert werden konnten (Abb. 4.3.3). Die angereicherten Lysosomenfraktionen wurden als Ausgangsmaterial für die affinitätschromatographische Aufreinigung M6P-haltiger Proteine verwendet (Abb. 4.3.3).

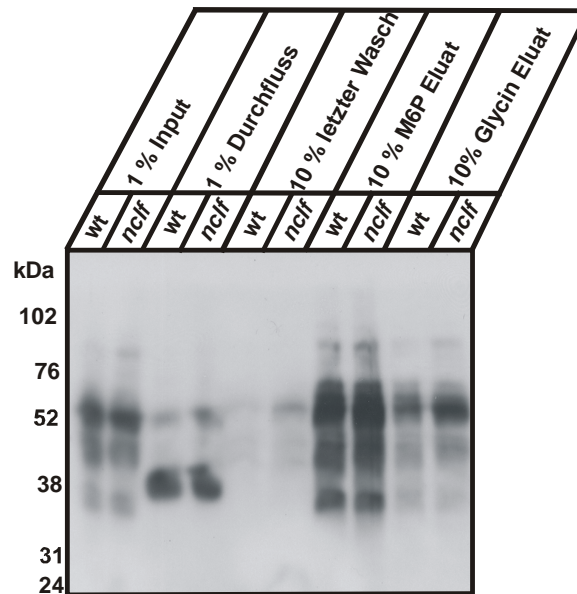


Abb. 4.3.4 M6P-Affinitätschromatographie von Lysosomenfraktionen aus Maushirn

Durch subzelluläre Fraktionierung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden aus Gesamthirn 12 Wochen alter Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäuse Lysosomen angereichert (Abb. 4.3.3). 500 µg Protein der lysosomalen Fraktion (Input) wurden solubilisiert und Mannose-6-Phosphat (M6P)-haltige Proteine durch immobilisierte M6P-Antikörper affinitätschromatographisch aufgereinigt. Ungebundenes Material wurde im Durchfluss aufgefangen und unspezifisch gebundenes Material durch mehrere Waschschrte entfernt. Die spezifische Elution M6P-haltiger Proteine erfolgte mit 10 mM M6P, gefolgt von einem sauren Elutionsschritt mit 100 mM Glycin. Von den Fraktionen wurden Aliquots (Angabe in Prozent) durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot mit einem anti-M6P Antikörper detektiert.

Die angereicherten Lysosomenfraktionen wurden mit anti-M6P-konjugierten-Beads inkubiert und die Beads anschließend gewaschen, um unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen. Die Elution M6P-haltiger Proteine erfolgte mit 10 mM M6P. Um sämtliche gebundenen Proteine zu entfernen, wurde zusätzlich eine Elution mit saurem Glycinpuffer durchgeführt. Aliquots der Fraktionen wurden durch M6P-Western-Blot detektiert. Wie in Abb. 4.3.4 gezeigt, konnten M6P-haltige Proteine mit Molekulargewichten zwischen 35 und 90 kDa in der lysosomalen Fraktion und im M6P-Eluat detektiert und spezifisch angereichert werden. Auch im Glycin-Eluat sind noch vier Banden mit Molekulargewichten von 35, 45, 52 und 80 kDa sichtbar. Im Durchfluss findet

sich lediglich eine schwache Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 52 kDa, sowie ein prominentes Signal zwischen 35 und 38 kDa.

Anschließend wurden jeweils zwei M6P Eluate von Präparationen aus Wildtyp- und *nclf*-Maushirnen massenspektrometrisch analysiert. Die Zusammensetzung und Zuordnung der analysierten Proben 1 und 2 sind in Tabelle 4.3.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.3.1 Übersicht über die Zusammensetzung der durch Massenspektrometrie analysierten spezifischen Elutionsfraktionen aus Wildtyp- und *nclf*-Maushirn

Proteine	Wildtyp 1	Wildtyp 2	<i>nclf</i> 1	<i>nclf</i> 2
total	99	89	94	104
lysosomal	26	22	24	22
mitochondrial	11	17	12	14
andere	62	50	58	68

Pro Probe konnten zwischen 89 und 104 Proteine identifiziert werden, von denen jeweils 23-26 bekannte lysosomale Proteine darstellten, die detailliert in Tabelle 8.1.1 im Anhang aufgelistet sind. Pro Probe wurden 11-17 mitochondriale Proteine identifiziert. Die übrigen Treffer verteilten sich auf Proteine, die entweder in anderen Organellen lokalisiert sind und als Kontaminationen anzusehen sind, oder deren Lokalisation noch unbekannt ist.

Die Klassifizierung der identifizierten Proteine erfolgte über den sogenannten *Protein Score*. Die durch massenspektrometrische Analyse identifizierten Peptide erhalten einen sogenannten *Peptide Score*, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der ein identifiziertes Peptid ein zufälliger Treffer ist. Aus den einzelnen *Peptide Scores* wird der *Protein Score* berechnet. Je höher dieser Wert, desto eindeutiger ist das betreffende Protein in der untersuchten Probe identifiziert worden. *Protein Scores* über 100 lassen grundsätzlich auf einen sicheren Treffer schließen. Alle nach der M6P-Aufreinigung identifizierten lysosomalen Proteine sind in Tabelle 8.1.1 mit ihrem jeweiligen *Protein Score* aufgelistet. Einige Proteine wie z.B. die saure Ceramidase oder die lysosomale α -Glucosidase haben in allen untersuchten Proben hohe *Protein Scores* und sind sowohl in Wildtyp- als auch in *nclf*-Proben zu finden. Andere wiederum, wie

z.B. die lysosomale saure Lipase, sind nur in einer Probe zu finden und haben einen geringen *Protein Score*. Insgesamt waren acht der identifizierten Proteine nicht in allen untersuchten Proben zu finden, sondern nur in einer bzw. beiden der Wildtyp- oder *nclf*-Proben. Allerdings zeigten alle diese Proteine geringe *Protein Scores* von 55 oder kleiner, so dass nicht von tatsächlichen Unterschieden zwischen Wildtyp- und *nclf*-Proben ausgegangen werden kann. Somit konnten mit dieser nicht-quantitativen Methode keine qualitativen Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Proben festgestellt werden.

Zusammenfassend ergab die Analyse des M6P-haltigen Proteoms von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen, dass die Menge M6P-haltiger Proteine in *nclf*-Mäusen erhöht war. Bezüglich der Zusammensetzung des Proteoms konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Mäusen ermittelt werden.

4.3.2 2D-Elektrophoretische Analyse lysosomaler Fraktionen

In einem weiteren Ansatz wurden lysosomale Proteine der Leber analysiert. Lysosomen können aus der Leber als sogenannte Tritosomen isoliert werden. Dazu wird Mäusen das Detergenz Triton-WR1339 injiziert, das sich in den Lysosomen der Leber anreichert und dadurch deren Dichte verringert. Durch differentielle Zentrifugation, gefolgt von einer Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation, können diese Lysosomen spezifisch aufgereinigt werden (Leighton et al. 1968; Wattiaux et al. 1963). Die Isolierung von Tritosomen aus Lebern von Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäusen sowie deren anschließende Darstellung im 2D-Gel wurde von Dr. Markus Damme, Universität Bielefeld, durchgeführt (Damme et al. 2010). Durch 2D-Gelelektrophorese wird die Darstellung posttranslationaler Modifikationen wie proteolytische Prozessierung oder *N*-Glykosylierung ermöglicht, die charakteristisch für verschiedene Protein „Isoform“-Spezies sind. In den hier gezeigten 2D-Gelen mit pH-Bereich von 4 - 7 (Abb. 4.3.5) konnten in Wildtyp-Mäusen ungefähr 100 mit Coomassie anfärbbare Spots detektiert werden. Diese Spots repräsentieren zum Teil verschiedene posttranslational modifizierte Formen lysosomaler Proteine, die in vorausgegangenen Studien identifiziert wurden (Damme et al. 2010) (Dr. G. Makrypidi, UKE, unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Vergleich zwischen Wildtyp- und *nclf*-Tritosomen waren im 2D-Gel charakteristische Unterschiede zu beobachten. Wie in Abb. 4.3.5 A und B zu sehen, war die Verteilung der Prozessierungsintermediate von Cathepsin D und Cathepsin Z in den Tritosomen von *nclf*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tritosomen reproduzierbar unterschiedlich. Cathepsin D-Isoformen sind durch eine enge horizontale Reihe von fünf Spots repräsentiert, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden. Bei *nclf*-Tritosomen sind die Cathepsin D Spezies mit isoelektrischen Punkten zwischen 4,85 und 5,25 schwächer ausgeprägt als im Wildtyp (Abb. 4.3.5 B). Cathepsin Z hingegen liegt verstärkt in Formen mit isoelektrischen Punkten zwischen 4,6 und 4,9 vor (Abb. 4.3.5 B).

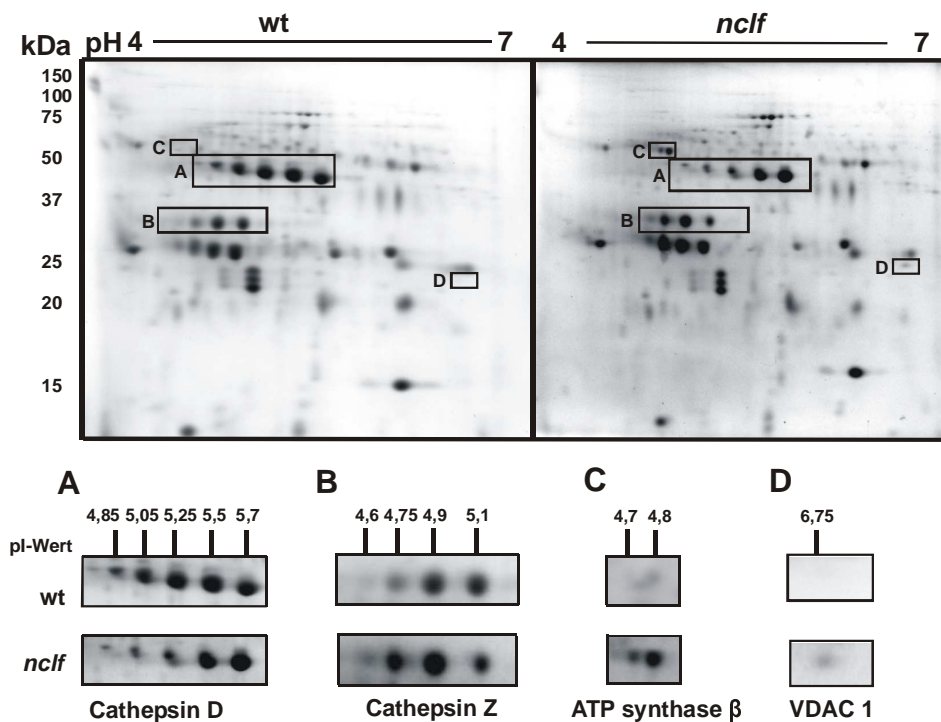


Abb. 4.3.5 2D-Gelelektrophorese lysosomaler Fraktionen

Nach der Isolierung von Tritosomen aus Lebern von jeweils drei Wildtyp-(wt) und *nclf*-Mäusen wurden 300 μ g der isolierten lysosomalen Fraktionen zunächst durch isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie blau angefärbt. Proteinspots, bei denen sich ein Unterschied zwischen wt und *nclf* feststellen ließ, sind markiert und vergrößert dargestellt (A-D). Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

In Abb. 4.3.5 C ist zu sehen, dass zwei Spots in *nclf*-Tritosomen stärker ausgeprägt waren als in Wildtyp-Tritosomen. Diese Spots konnten durch massenspektrometrische Analyse als Untereinheit β der mitochondrialen ATP-Synthase identifiziert werden. Ein zweites mitochondriales Protein, dessen

Menge zwischen *nclf*- und Wildtyp-Tritosomen unterschiedlich war, war der *voltage-dependent selective anion channel 1* (VDAC1, Abb. 4.3.5 D).

Die Unterschiede in der Menge der Untereinheit β der mitochondrialen ATP-Synthase wurden durch Western-Blot-Analysen von Tritosomen verifiziert (Abb. 4.3.6). Zusätzlich dazu ist die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase im Western Blot untersucht worden. Dieses Protein ist eine weitere Untereinheit der ATP-Synthase und als Hauptbestandteil des Speichermaterials in NCL-Erkrankungen bekannt (Palmer et al. 1989a). Auch hier findet sich eine deutliche Akkumulation in *nclf*-Tritosomen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abb. 4.3.6).

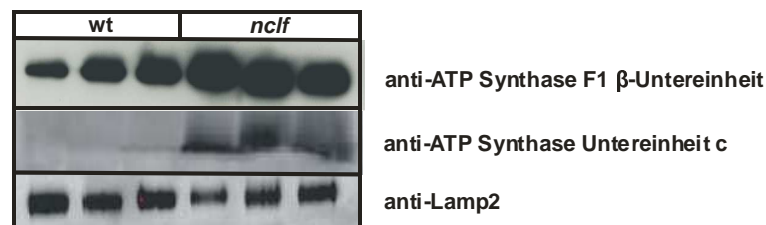


Abb. 4.3.6 Nachweis der Untereinheiten β und c der mitochondrialen ATP Synthase in Tritosomen

Nach der Isolierung von Tritosomen aus den Lebern von jeweils drei Wildtyp (wt) und *nclf* Mäusen im Alter von 12 Wochen wurden 12,5 μ g Protein von drei unabhängigen Präparationen durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Untereinheiten β und c der mitochondrialen ATP-Synthase wurden durch Western Blot detektiert. Lamp-2 diente als Ladekontrolle.

Die Tritosomen-Fractionen wurden in einem zweiten Experiment zusätzlich durch massenspektrometrische Analysen untersucht. Pro Genotyp wurden zwei verschiedene Präparationen aus jeweils drei Tieren analysiert. Eine Übersicht der Ergebnisse findet sich in Tabelle 4.3.2

Tabelle 4.3.2 Zusammensetzung der durch Massenspektrometrie analysierten Tritosomen-Fractionen aus Wildtyp- und *nclf*-Leber

Proteine	Wildtyp 1	Wildtyp 2	<i>nclf</i> 1	<i>nclf</i> 2
total	130	144	158	156
lysosomal	51	49	50	38
mitochondrial	26	26	28	27
andere	53	69	80	91

Die totale Anzahl der pro Probe identifizierten Proteine lag zwischen 130-158. Davon konnten pro Probe 38-51 als lysosomale Proteine und 26-28 als mitochondriale Proteine identifiziert werden, wobei die Zusammensetzung der Proben der verschiedenen Präparationen zu 95 % (Wildtyp) bzw. 75 % (*nclf*) identisch war. Alle anderen Proteine waren laut Literatur in anderen Kompartimenten lokalisiert. In jeder Probe wurden Untereinheiten der V-H⁺ATPase identifiziert. Diese Protonenpumpe ist zur Aufrechterhaltung des sauren lysosomalen pH-Wertes nötig. Da sie allerdings auch an anderen Membranen zu finden ist, wurden ihre Untereinheiten nicht den lysosomalen Proteinen zugeordnet (Della Valle et al. 2011). Insgesamt konnten 54 lysosomale Proteine identifiziert werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1.2), bei denen es sich um 46 lösliche und 8 membrangebundene Proteine handelte. Auch hier erfolgte die Klassifizierung anhand des *Protein Score* (erläutert in 4.3.1). Bei Proteinen mit hohen *Protein Scores* über 100 wie z.B. Cathepsin B konnten zwischen Wildtyp- und *nclf*-Tritosomen keine Unterschiede festgestellt werden. Sechs der identifizierten lysosomalen Proteine wurden entweder nur in einer oder beiden Wildtyp- oder *nclf*-Proben gefunden, wie zum Beispiel die β -Untereinheit der β -Hexosaminidase. Keines der Proteine, die nur in einer Probe gefunden wurde, hatte einen Score über 100. Es konnten somit durch die hier durchgeführte massenspektrometrische Analyse keine konsistenten Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Proben festgestellt werden.

Zusammenfassend konnten mit den hier angewandten Methoden zur Analyse des lysosomalen Proteoms der Leber in Wildtyp- und *nclf*-Mäusen Unterschiede in der Verteilung der Isoformen von Cathepsin D und Z in Leber-Tritosomen-Präparationen aus Wildtyp- und *nclf*-Mäusen festgestellt werden. Des Weiteren fanden sich in Tritosomen aus *nclf*-Mäusen erhöhte Mengen der Untereinheiten β und c der mitochondrialen ATP-Synthase und des Proteins VDAC1. Durch massenspektrometrische Analysen konnten keine quantitativen Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Tritosomen festgestellt werden.

4.4 Identifizierung von potentiellen CLN6-Interaktionspartnern mit dem Membran-Hefe-2-Hybrid-System

Die Identifizierung von Interaktionspartnern des CLN6-Proteins könnte Hinweise auf seine bislang unbekannte Funktion liefern. Daher wurde ein Split-Ubiquitin basiertes Membran-Hefe-2-Hybrid-System verwendet, das für die Untersuchung von Interaktionen mit membranständigen Proteinen entwickelt wurde (Johnsson und Varshavsky 1994). Das humane CLN6-Protein (*Bait*) wurde an seinem zytosolisch lokalisierten N-Terminus mit dem C-terminalen Anteil des Ubiquitins und dem Transkriptionsfaktor LexA fusioniert und in Hefe exprimiert. Potentielle Interaktionspartner (*Prey*) wurden als Fusionsprotein mit der N-terminalen Domäne des Ubiquitins koexprimiert. Interagieren die untersuchten Proteine, wird durch die räumliche Nähe ein funktionelles Ubiquitin erzeugt und es kommt durch Ubiquitin-bindende Proteasen zur Abspaltung des Transkriptionsfaktors LexA, der im Nukleus die Expression von Reporter genen initiiert (siehe auch 3.2.14).

4.4.1 Verifizierung der Funktionalität des CLN6-Fusionsproteins im Membran-Hefe-2-Hybrid-System

Die cDNA des humanen *CLN6* wurde in den *Bait*-Vektor durch *SfiI*-Restriktionsschnittstellen inkloniert und in Hefe exprimiert. Aufgrund der geringen Expressionsrate in dem verwendeten Hefestamm NMY51 konnte das Protein nicht mittels Western Blot nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der korrekten Expression wurde ein Kontroll experiment durchgeführt. Die Kontroll-*Prey*-Konstrukte enthalten ein Fusionsprotein aus dem Protein Alg5, einem ER-residenten Membranprotein der Hefe, und der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins. Im Falle des positiven Kontrollvektors enthält das N-terminale Ubiquitin seine originale Sequenz und zeigt damit eine hohe Affinität zum C-terminalen Ubiquitin, das zusammen mit dem artifiziellen Transkriptionsfaktor LexA-VP-16 an den N-Terminus des CLN6-Proteins fusioniert vorliegt. Bei einer Kotransformation des *Bait* Proteins mit dem positiven Kontroll-*Prey* kommt es zu einer spontanen Rekonstitution des Ubiquitins und somit zur Reporter genaktivierung. Im Falle des negativen Kontrollvektors ist die Affinität

der beiden Ubiquitin-Hälften durch einen Isoleucin-Glycin-Austausch an Position 3 stark reduziert. Bei einer Kotransformation von einem *Bait* und einem negativen Kontroll-*Prey* bleibt die spontane Rekonstitution des Ubiquitins aus. Hefezellen wurden mit dem CLN6-*Bait*-Konstrukt und entweder dem positiven oder negativen Kontroll-*Prey*-Konstrukt kotransformiert. Eine Kotransformation mit *Bait*- und *Prey*-Vektoren ermöglicht ein Wachstum auf Leucin/Tryptophan-freien (SD-leu-trp) Medien. Nur bei Interaktion der untersuchten *Bait*- und *Prey*-Proteine wird durch die Expression von Reportergenen ein zusätzliches Wachstum auf Leucin/Tryptophan/Histidin-freiem (SD-leu-trp-his) Medium ermöglicht. Um die Funktionalität des Experimentes zu untersuchen, wurde zusätzlich Alg5, ein ER-Membranprotein der Hefe, als *Bait* verwendet und mit dem positiven Kontroll-*Prey*pAI-Alg5 kontransformiert.

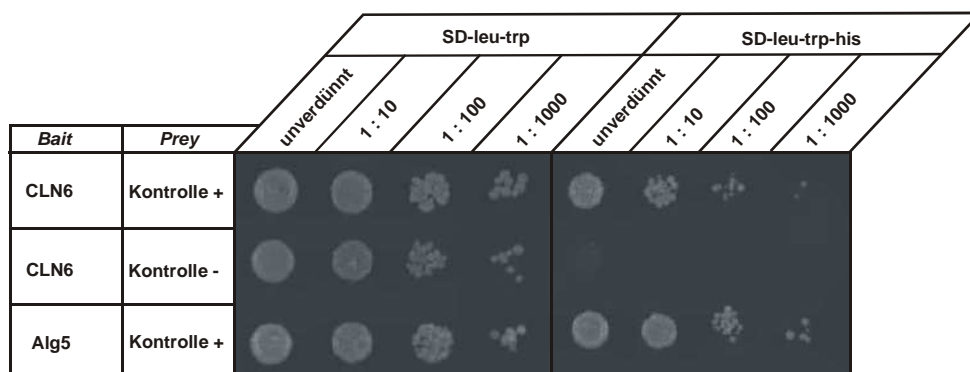


Abb. 4.4.1 Expressionsüberprüfung des CLN6-*Bait*-Konstruktes

CLN6 wurde N-terminal mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16 fusioniert. Zur Überprüfung der korrekten Expression des CLN6-*Bait*-Konstruktes wurden Hefezellen mit dem CLN6-*Bait*-Konstrukt und entweder einem positiven (pAI-Alg5) oder negativen (pDL2-Alg5) *Prey*-Kontrollvektor kotransformiert. Als Positivkontrolle wurde ein Alg5-*Bait* (pCCW-Alg5) mit dem positiven Kontroll-*Prey*pAI-Alg5 kotransformiert.

Im hier gezeigten Kontrollexperiment (Abb. 4.4.1) zeigten alle transformierten Zellen ein gleichmässiges Wachstum auf SD-leu-trp Medium, was für eine effektive Kotransformation spricht. Auf SD-leu-trp-his Medium zeigten die Kotransformation des *CLN6*- sowie des *Alg5*-*Baits* mit dem positiven Kontroll-*Prey* pAI-Alg5 bis zur höchsten Verdünnung, 1:1000, Wachstum. Dies bedeutet, dass die *Bait*-Konstrukte korrekt exprimiert werden und die C-terminale Untereinheit des Ubiquitins zytosolisch lokalisiert ist, was eine Interaktion mit löslichen oder Membranproteinen, deren zytosolischer Teil mit der N-terminalen Untereinheit des Ubiquitins fusioniert ist, ermöglicht. Für die Kotransformation

des *CLN6-Bait*-Konstruktes mit dem negativen Kontroll-*PreypAI-pDL2* war kein Wachstum auf SD-leu-trp-his-Medium zu beobachten (Abb. 4.4.1). Somit liegt keine ungewollte Aktivierung der Reportergene durch Transformation mit dem *Bait*-Protein vor. Die Prüfung einer möglichen Selbstaktivierung des *CLN6-Bait*-Konstruktes wurde ebenfalls durch Kotransformation mit dem leeren Vektor der cDNA-Bibliothek, pPR3-C, durchgeführt. Auch hier konnte kein Wachstum auf SD-leu-trp-his Platten beobachtet werden (nicht gezeigt).

4.4.2 Selektion potentieller Interaktionspartner von CLN6

Zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern des CLN6-Proteins wurde CLN6 als *Bait* im Hefe-2-Hybrid-System mit *Prey*-Plasmiden kotransformiert, die eine cDNA-Bibliothek aus adultem humanen Hirn im Vektor pPR3-C enthielten, also C-terminal mit dem N-terminalen Teils des Ubiquitins fusioniert waren (3.2.14.3). Zur Isolierung von cDNAs möglicher Interaktionspartner wurden die transformierten Hefen auf SD-leu-trp-his-Platten ausplattiert und selektioniert. Bei 140 Kolonien konnte die Reporterexpression mittels eines β -Galactosidase Tests bestätigt werden (nicht gezeigt). Aus diesen 140 β -Galactosidase-positiven Kolonien wurde das entsprechende *Prey*-Plasmid isoliert, in *E.coli* transformiert und amplifiziert (3.2.14). Die Sequenzen der *Prey*-Konstrukte wurden zunächst durch einen Restriktionsverdau mit *SfiI* analysiert. Bei 129 dieser *Prey*-Plasmide war eine inserierte cDNA nachweisbar. Sie wurden sequenziert und durch einen Vergleich mit einer Genbank einer Sequenzanalyse unterzogen. Von diesen sequenzierten Klonen konnte bei 25 keine Übereinstimmung mit bekannten cDNA-Sequenzen festgestellt werden. Weitere 35 Klone enthielten nicht-codierende Sequenzen, und bei 11 Klonen war die enthaltene Sequenz nicht eindeutig einem bekannten Protein zugeordnet. Außerdem wurden die beiden Klone ATP-Synthase Untereinheit G und ATPase 13A2 ausgeschlossen, da es sich um bekannt falsch positive Klone in dieser Art von Hefesystem handelt. Insgesamt wurden nach dieser Selektion 56 Klone zur weiteren Verifizierung ausgewählt. Bei Sequenzen, die mehrfach vorkamen (insgesamt 4), wurde jeweils nur ein Klon getestet.

Tabelle 4.4.1 Identifizierte Kandidatenproteine für eine Interaktion mit CLN6

Name	NCBI-Accession-Nr.	Offener Leserahmen	Sequenz im Screen
7-Dehydrocholesterol reductase	NM_001360.2	274-1701	62-1645
AE binding protein 1	NM_001129.3	306-3782	2144-3334
Apolipoprotein D	NM_001647.3	363-932	203-1046
CAM kinase-like vesicle associated	NM_024046.3	194-1699	82-496,496-1102
Cytoskeleton associated protein 5	NM_014756	111-6029	1259-1818
Elav-like family member 4	NM_001025089.1	397-1743	340-2122
GABA A receptor, alpha 5	NM_000810.3	533-1921	161-1579
Heat shock 70kDa protein	NM_021979	383-2302	290-2568
Low density lipoprotein receptor-related protein 1	NM_002332.2	467-14101	8192-9988
Nardilysin	NM_001101662.1	323-3778	2585-3800
Pre-B-cell leukemia homeobox 2	NM_002586.4	272-1564	756-2004
RAN binding protein	NM_006267.4	127-9801	8484-9714
THAP containing, apoptosis associated protein	NM_018105.2	238-879	657-1638
Transportin 2	NM_001136196.1	186-2879	1667-2984
Zinc finger protein 330	NM_014487.4	221-1183	28-1139

Um eine mögliche Interaktion zwischen CLN6 und dem jeweiligen *Prey* zu bestätigen, wurden *Bait*- und *Prey*-Vektor in Hefe kotransformiert um zu überprüfen, ob ein Wachstum der Hefen auf SD-leu-trp-his sowie die β -Galactosidase-Aktivität reproduzierbar waren. 15 von 56 Klonen zeigten reproduzierbare Ergebnisse (Tabelle 4.4.1). Bei 2 von 4 mehrfach im Screen gefundenen Klonen konnte die Interaktion nicht verifiziert werden. Zur Auswahl von Kandidatenproteinen aus den 15 Klonen, die für weitere Untersuchungen einer möglichen Interaktion mit CLN6 getestet werden sollten, wurden mehrere Parameter berücksichtigt. Unter anderem wurde überprüft, ob die Lokalisation und Topologie des Proteins eine Interaktion ermöglichen würden. Durch

Literaturrecherche und vereinzelte, unveröffentlichte Daten wurden zusätzliche Hinweise auf mögliche Interaktionen gewonnen.

4.4.3 Überprüfung möglicher Interaktionen

Zunächst wurden vier Proteine zu einer weiterführenden Analyse ausgewählt (Tabelle 4.4.2). Bei diesen Proteinen handelte es sich um die beiden löslichen Proteine Heat shock 70 kDa Protein (HSP70), Apolipoprotein D (APOD) und die membrangebundenen Proteine GABA A Rezeptor Untereinheit α 5 (GABA A α 5) und 7-Dehydrocholesterolreductase (DHCR7).

Tabelle 4.4.2 Ausgewählte mögliche CLN6-Interaktionspartnern

Name	Topologie	N-Terminus	C-Terminus	Lokalisation
Heat shock 70kDa Protein	löslich	Zytosol, Lumen	Zytosol, Lumen	Zytosol, ER, Mitochondrium
Apolipoprotein D	löslich	Cytosol, Lumen	Zytosol, Lumen	sezerniert
GABA A receptor, α 5	membran-gebunden	Lumen	Zytosol*	Plasmamembran
7-Dehydrocholesterol-Reductase	membran-gebunden	Zytosol oder Lumen**	Zytosol oder Lumen**	ER

*Die im Screen identifizierte Sequenz enthielt nicht den gesamten ORF, daher war der C-Terminus zytosolisch lokalisiert.

** Die genaue Lokalisation von N- und C-Terminus ist bislang nicht definiert.

In den Vektoren der cDNA-Bibliothek waren nicht immer vollständige *open reading frames* (ORFs) sowie zusätzliche untranslatierende Bereiche vorhanden. Dies kann zu einer inkorrekten Translation oder Faltung der Proteine führen. Daher wurden zunächst die ORFs in *Bait*- bzw. *Prey*-Konstrukte des Hefesystems kloniert und die Interaktion im Hefesystem erneut verifiziert.

Bei den beiden Kandidaten HSP70 und APOD handelte es sich um lösliche Proteine, deren vollständige cDNAs inklusive Stop-Codons und untranslatierten Sequenzanteilen im *Prey*-Plasmid vorhanden waren. Trotz Stop-Codon kann in der Hefe eine Translation des N-terminalen Ubiquitins erfolgen, so dass eine Interaktion von *Bait* und *Prey* möglich ist (persönliche Mitteilung, Firma

MoBiTec). Um die Interaktion zu verifizieren, wurden die Stopcodons deletiert, um eine Translation des gesamten Fusionsproteins zu gewährleisten. Die cDNAs wurden anschließend durch Restriktion mit dem Enzym *SfiI* in die *Prey*-Vektoren pPR3-C (C-terminaler Tag) und pPR3-N (N-terminaler Tag) inkloniert.

HSP70 ist sowohl im ER-Lumen als auch im Zytosol lokalisiert, könnte also theoretisch mit CLN6 interagieren. Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion wurde das Protein sowohl N- als auch C-terminal mit der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert. Bei der Kotransformation von CLN6 mit den *Prey*-Konstrukten für HSP70 zeigten die Hefezellen kein Wachstum (Abb. 4.4.2 A). Somit kommt es nicht zu einer Reporterogenaktivierung und die Interaktion konnte nicht bestätigt werden.

Die Lokalisation des zweiten löslichen Kandidaten APOD wurde bislang lediglich als extrazellulär beschrieben, es konnte allerdings auch in lysosomalen Einschlüssen detektiert werden (Schröder et al. 2007a). In beiden Fällen durchläuft das Protein das ER, wo eine potentielle Interaktion mit CLN6 stattfinden könnte. Nach der Transformation von Hefezellen mit CLN6 als *Bait* und APOD als *Prey* konnte ein Wachstum der Hefezellen auf Mangelmedium ohne Histidin beobachtet werden (Abb. 4.4.2 B). Das Wachstum der Zellen war stärker, wenn ApoD N-terminal an die Ubiquitinhälfte fusioniert war. Bei einer C-terminalen Fusion von ApoD und Ubiquitin war ein schwächeres Wachstum zu sehen. ApoD als potentieller Interaktionspartner von CLN6 konnte somit im Hefesystem verifiziert werden (Abb. 4.4.2 B). Weiterhin wurde GABA A α 5, eine Untereinheit des GABA-A-Rezeptors, als potentielle Interaktionspartner von CLN6 überprüft. Die GABA-Rezeptoren sind an der Plasmamembran lokalisiert, werden jedoch im ER aus ihren Untereinheiten zusammengesetzt, wobei CLN6 möglicherweise beteiligt sein könnte. Bei GABA A α 5 handelt es sich um ein membranständiges Protein. Daher kann es auch als *Bait* im Hefesystem eingesetzt werden. Im Falle des potentiellen Interaktionspartners GABA A α 5 wurde zur Überprüfung der Interaktion im Hefesystem nicht der vollständige ORF zur Subklonierung verwendet. Dies ist durch die Topologie dieses Proteins begründet, bei der sowohl N- als auch C-Terminus im

extrazellulären Raum bzw. im ER-Lumen lokalisiert sind. Bei der im *Prey*-Vektor der cDNA Bibliothek vorhandenen Sequenz fehlt die letzte von vier Transmembrandomänen, und der C-Terminus des trunkierten Proteins befindet sich auf der zytosolischen Seite.

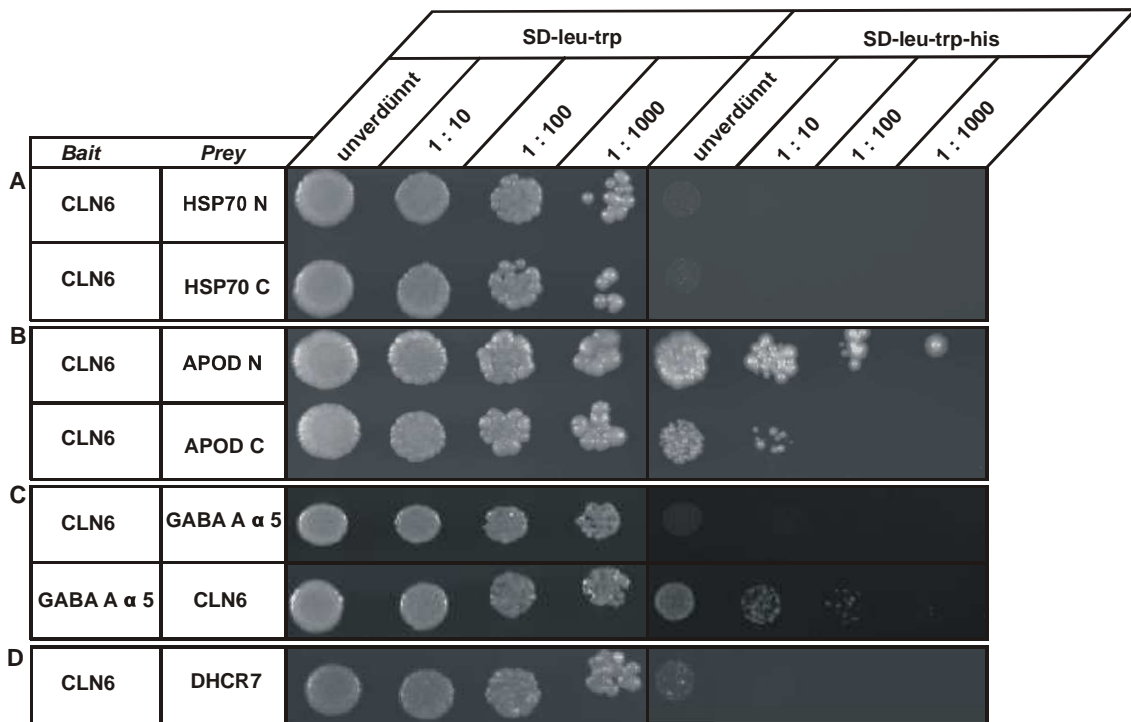


Abb. 4.4.2 Verifizierung der Interaktionen im Hefe-2-Hybrid-System

CLN6 und potentielle Interaktionspartner wurden entweder als *Bait* mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin und dem Transkriptionsfaktor LexA-VP16, oder als *Prey* mit der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin fusioniert und in Hefe koexprimiert. Die Hefezellen wurden auf SD-leu-trp- und auf SD-leu-trp-his-Mangelmedien gespottet. **(A)** HSP70 wurde entweder N- (HSP70 N) oder C-terminal (HSP70 C) mit der N-terminalen Hälfte des Ubiquitin Moleküls fusioniert. **(B)** APOD wurde entweder N- (APOD N) oder C-terminal (APOD C) mit der N-terminalen Hälfte des Ubiquitin Moleküls fusioniert. **(C)** GABA A α 5 wurde sowohl als *Bait* und als *Prey* eingesetzt und mit der C- bzw. N-terminalen Hälfte des Ubiquitin-Moleküls fusioniert. **(D)** DHCR7 wurde C-terminal als *Prey* mit der N-terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert. **(D)** CLN6 wurde immer N-terminal gekoppelt. Zu jedem Experiment wurde ein Kontrollexperiment mit positiven und negativen Kontrollvektoren vorgenommen. Gezeigt ist jeweils eines von 3 Experimenten mit identischen Ergebnissen.

Eine Interaktion von N- und C-terminalem Ubiquitin ist lediglich im Zytosol möglich. Daher wurde zur Subklonierung in den Bait-Vektor die verkürzte Sequenz verwendet. Als Prey-Vektor wurde das Konstrukt verwendet, das dem im *Screening* identifizierten entspricht. Bei der Kotransformation von GABA A α 5 und CLN6 im Hefesystem konnte nur Wachstum auf SD-leu-trp-his-Platten beobachtet werden, wenn GABA A α 5 als *Bait* und CLN6 als *Prey* eingesetzt wurde. Wurde CLN6 als *Bait* eingesetzt, konnte kein Wachstum der Hefezellen

auf Histidin-Mangelmedium beobachtet werden (Abb. 4.4.2 C). Somit ist keine eindeutige Aussage möglich, und eine Überprüfung der Interaktion mit einer weiteren Methode notwendig (siehe 4.4.4).

Bei dem Kandidaten DHCR7 handelt es sich um ein membranständiges, ER-residentes Protein. Für die Subklonierung wurde die cDNA Sequenz des ORF sowohl in einen *Bait* als auch in einen *Prey*-Vektor kloniert. In beiden Fällen befand sich die jeweilige Ubiquitinhälfte am C-Terminus des Proteins. Da das *Bait*-Konstrukt eine starke Selbstaktivierung zeigte (nicht gezeigt) konnte es zur Überprüfung einer möglichen Interaktion nicht verwendet werden. Bei der Kotransformation des DHCR7-*Prey* mit dem CLN6-*Bait* konnte die Interaktion der beiden Proteine nicht bestätigt werden, somit wurde auch dieser potentielle Kandidat ausgeschlossen (Abb. 4.4.2 D).

Von vier bislang untersuchten, möglichen Interaktionspartnern von CLN6 konnte weder die Interaktion von CLN6 mit HSP70 noch mit DHCR7 verifiziert werden. Für mögliche Interaktionen von CLN6 mit APOD oder GABA A α 5 ist es erforderlich, die im Hefesystem detektierte Interaktion mit zusätzlichen Methoden zu bestätigen.

4.4.4 Überprüfung der Interaktion von CLN6 mit GABA A α 5 mit dem *Protein Complementation Assay*

Zur Verifizierung der Interaktion von CLN6 mit GABA A α 5 wurde der *Protein Complementation Assay* verwendet. Diese Methode dient der Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen *in vivo* (Nyfeler und Hauri 2007). Die cDNA des *yellow fluorescent proteins* (YFP) ist in einen N-terminalen (YFP1) und einen C-terminalen Teil (YFP2) aufgeteilt. Diese cDNAs wurden mit den cDNAs der zu untersuchenden Proteine fusioniert. CLN6 wurde C-terminal mit YFP2 fusioniert (CLN6-YFP2), so dass sich die YFP2-Hälfte im ER-Lumen befand. GABA A α 5 wurde C-terminal mit YFP1 fusioniert (GABA A α 5-YFP1). In diesem Experiment wurde der gesamte GABA A α 5 ORF verwendet, da mit dem *Protein Complementation Assay*, im Gegensatz zum Hefe-2-Hybrid-System, auch Interaktionen im ER-Lumen detektiert werden können.

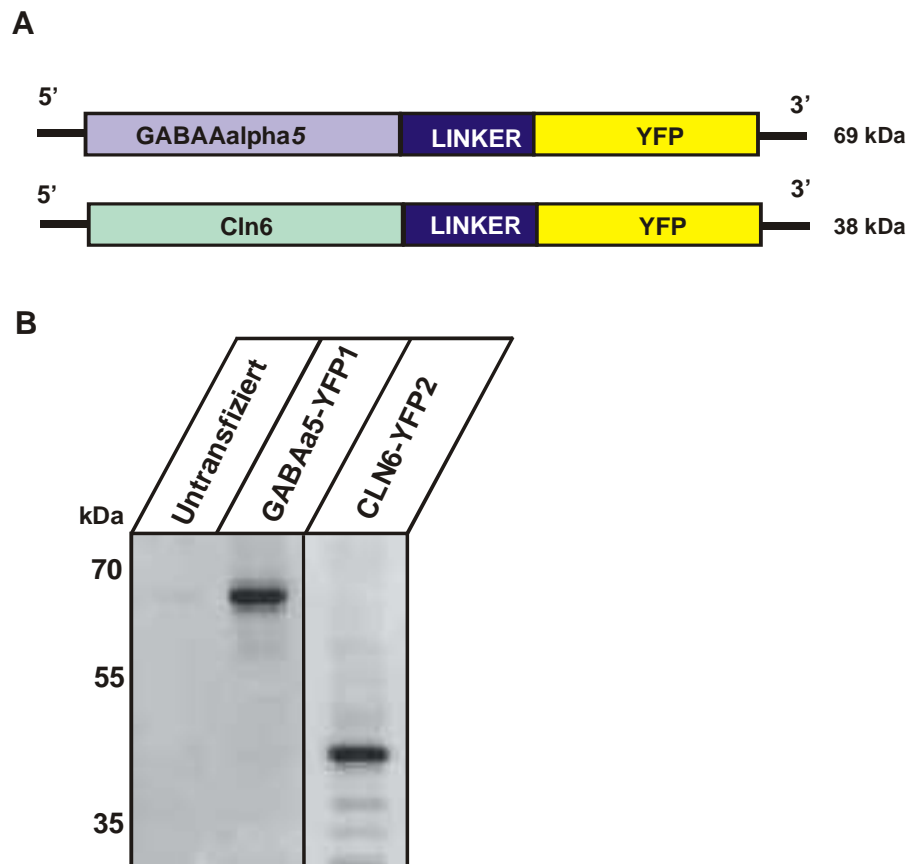


Abb. 4.4.3 Expression der YFP-Fusionsproteine für den *Protein Complementation Assay*
(A) Struktur und molare Masse der klonierten Konstrukte. **(B)** BHK-Zellen wurden mit den gezeigten Konstrukten transfiziert und Zellextrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fusionsproteine wurden mittels Western-Blot entweder mit anti-GABA A α 5 (GABA α 5-YFP1) oder anti-GFP Antikörper (CLN6-YFP2) detektiert.

Die Expression der entsprechenden Konstrukte wurde durch Western-Blot verifiziert (Abb. 4.4.3). Beide Fusionsproteine zeigten im Western-Blot die korrekte molare Masse und wurden in BHK-Zellen exprimiert.

Als Positivkontrolle wurde das dimerbildende ER-residente p53, N- und C-terminal an YFP1 und YFP2 gekoppelt, verwendet (Die Konstrukte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hans-Peter Hauri, Biozentrum Basel, zur Verfügung gestellt). Als Negativkontrolle wurde CLN6-YFP2 mit YFP1-p53 kotransfiziert. Bei einer Interaktion von zwei koexprimierten, mit YFP1 bzw. YFP2 fusionierten, Proteinen kommt es zur Rekonstitution eines funktionalen YFP und damit zu einem Fluoreszenzsignal. BHK-Zellen wurden mit jeweils einem YFP1- und einem YFP2-Konstrukt kotransfiziert. Die Kotransfektion von p53-YFP1 und YFP-p53, durchgeführt als Positivkontrolle, führte zu einem

gelben Fluoreszenzsignal in circa 30 % der Zellen (Abb. 4.4.4 A). Es ist ein netzförmiges Muster zu erkennen, dass auf eine ER-Lokalisation hindeutet. Als Negativkontrolle diente die Kotransfektion von CLN6-YFP2 mit YFP1-p53. Hier konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 4.4.4 B).

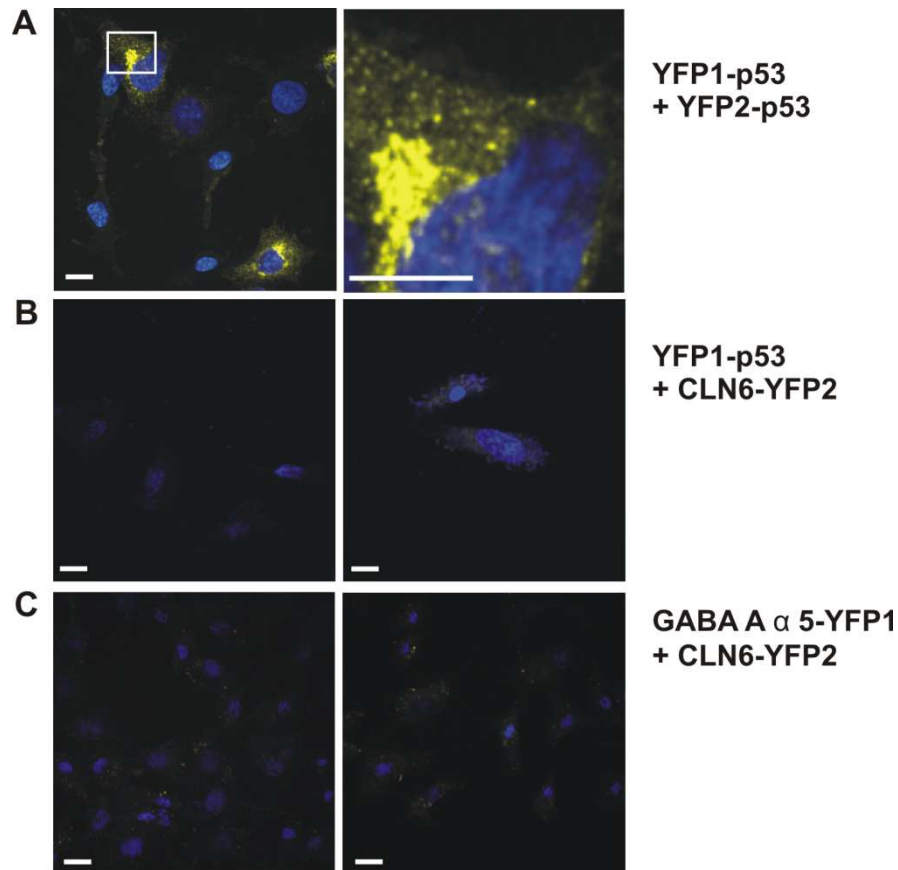


Abb. 4.4.4 Protein Complementation Assay zur Überprüfung der Interaktion von CLN6 mit GABA A α 5

BHK Zellen wurden mit cDNAs von YFP-Fusionsproteinen transfiziert, nach 24h mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. **(A)** Als Positivkontrolle wurde eine Kotransfektion mit YFP1-p53 und YFP2-p53 durchgeführt, umrahmte Bereiche sind vergrößert dargestellt. **(B)** Als Negativkontrolle diente eine Kotransfektion von YFP1-p53 und CLN6-YFP2. Zellen. **(C)** Überprüfung der Interaktion von CLN6 und GABA A α 5. Zellen, die miteinander interagierende YFP-Fusionsproteine enthalten, zeigen ein gelbes Fluoreszenzsignal. Der Balken entspricht 20 μ m.

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion wurde CLN6-YFP2 mit GABA A α 5-YFP1 kotransfiziert. Wie in Abb. 4.4.4 C gezeigt, war kein Fluoreszenzsignal zu beobachten. Somit konnte die durch das Hefe-2-Hybrid System identifizierte Interaktion von CLN6 und GABA A α 5 mit der hier verwendeten Methode nicht verifiziert werden.

5 Diskussion

Die NCL-Erkrankungen sind charakterisiert durch eine hauptsächlich neurodegenerative Pathologie, die zu Erblindung, motorischem und mentalen Abbau und schließlich zum frühzeitigen Tod führt. Die genauen Pathomechanismen sind weitestgehend unbekannt, ebenso wie die Funktion der meisten NCL-Proteine einschließlich des hier untersuchten CLN6-Proteins. Die vorliegende Arbeit hat mehrere Schwerpunkte. Zum einen wurde die regionale und zellspezifische Expression des *Cln6*-Gens im Mausgehirn während der postnatalen Entwicklung untersucht. Zum anderen wurden Autophagie und die Aktivierung von Gliazellen als pathogene Prozesse, die in anderen Mausmodellen lysosomaler Speichererkrankungen bereits als gestört beschrieben wurden, genauer studiert. Zum Verständnis der Funktion von CLN6 wurde das lysosomale Proteom in Wildtyp- und *nclf*-Mäusen untersucht sowie ein Hefe-2-Hybrid-Screening zur Identifizierung von möglichen CLN6-Interaktionspartnern durchgeführt. Dies könnte Hinweise auf mögliche Funktionen von CLN6 bei der Protein-Synthese und posttranslationalen Modifikationen oder beim Transport lysosomaler Proteine liefern.

5.1 Analyse der *Cln6*-mRNA-Expression

Die Neurodegeneration in den NCLs folgt einem stereotypen zeitlichen und regional spezifischen Ablauf. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Es besteht nur eine partielle Korrelation des Verlaufes der Neurodegeneration mit der Verteilung des Speichermaterials (Cooper 2003), das im Hirn hauptsächlich aus der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase, Ceroid-Lipopigmenten und Glykosphingolipiden zusammengesetzt ist (Jabs et al. 2008; Palmer et al. 1986; Palmer et al. 1989b). Ein möglicher Zusammenhang mit der Präsenz von *Cln6* im Hirn ist unbekannt, und aufgrund fehlender Antikörper ist eine Untersuchung der *Cln6*-Proteinexpression nicht möglich. Daher wurde die Genexpression von *Cln6* im Hirn von Mäusen mit verschiedenen Methoden untersucht.

Durch eine Northern-Blot-Analyse verschiedener Hirnregionen adulter Mäuse konnte ein einzelnes Transkript von 2,4 kb Größe detektiert werden (Abb. 4.1.1A), das in allen untersuchten Regionen des Maushirns vorhanden war. Im Unterschied dazu zeigen *Cln5* und *Cln8*, die bei anderen NCL-Formen mutiert sind (Kopra et al. 2004; Ranta et al. 1999), gewebe- und zellspezifisches alternatives Spleißen und Polyadenylierung (Holmberg et al. 2004; Lonka et al. 2005). Da die Signalstärke der *Cln6*-Expression im Northern-Blot sehr schwach ausgeprägt und zusätzlich die Beladung des kommerziellen Blots sehr unterschiedlich war, wurde zur Quantifizierung der Expression eine Realtime-PCR-Analyse (TissueScan qPCR Array, NIH Swiss Mice) durchgeführt (Abb. 4.1.1B). Die ubiquitäre Expression von *Cln6* in allen getesteten Hirnregionen konnte verifiziert werden. Verglichen mit den Cortex war die *Cln6*-mRNA-Menge im Cerebellum (2,5-fach), im Hypothalamus (2,3-fach), im Mesencephalon (1,9-fach) und im Bulbus olfactorius (1,6-fach) erhöht, während die anderen Regionen der Expression im Cortex ähnelten. Differenzen zur Quantifizierung des Northern-Blots sind vermutlich durch die oben genannte geringe Sensitivität des Blots sowie durch die Normalisierung auf verschiedene Ladekontrollen (Gapdh bzw. Tubulin) und unterschiedliche Mauslinien zurückzuführen.

Eine Analyse der *Cln6*-mRNA-Expression mittels *in-situ* Hybridisierung zeigte eine starke Expression in den kortikalen Schichten II-VI sowie in der Granular- und Purkinjzellschicht des Cerebellums. Weiterhin waren hohe *Cln6*-mRNA-Spiegel in der CA1-Region und im Dentate Gyrus des Hippocampus zu beobachten (Abb. 4.1.2). In Schichten wie dem Corpus Callosum, das hauptsächlich aus Gliazellen besteht, war keine *Cln6*-mRNA nachweisbar. Die Verteilung der mRNA und die hauptsächlich neuronale Expression von *Cln6* stimmt mit der beobachteten Expression der NCL-Gene *Cln1*, *Cln3* und *Cln5* überein, was auf einen gemeinsamen Mechanismus der Expressionskontrolle hinweist (Cotman et al. 2002; Eliason et al. 2007; Holmberg et al. 2004). Eine starke *Cln6*-Expression im Hippocampus konnte nur durch *in-situ*-Hybridisierung, nicht aber durch Realtime-PCR-Analysen festgestellt werden. Dies ist vermutlich auf die stark heterogenen Zellpopulationen bei der Isolation der Hirngewebe zur RNA-Isolation zurückzuführen, während bei der *in-situ*-

Hybridisierung Zellschichten mit hoher Expressionsrate klar abgegrenzt werden können.

Die hohe Expression von *Cln6* in der CA1-Region des Hippocampus stimmt nicht mit der von *Cln5* oder *Cln8* überein, deren Expression verstärkt in der CA3-Region des Hippocampus zu finden ist (Homberg et al. 2004, Lonka et al. 2005). Im Dentate Gyrus steigt die mRNA-Menge von *Cln3* und *Cln8* nach der Induktion von epileptischen Krämpfen stark an (Lonka et al. 2005, Eliason et al. 2007). Die basal hohe Expression von *Cln6* in dieser Hirnregion könnte auf eine Verbindung mit den in *nclf*-Mäusen auftretenden Krämpfen hindeuten.

Die quantitative Bestimmung der *Cln6*-mRNA-Spiegel während der postnatalen Entwicklung des Maushirns mit Hilfe der Realtime-PCR zeigte einen Anstieg der *Cln6*-Expression in allen untersuchten Regionen des Maushirns (Abb. 4.1.3). Leichte Unterschiede in der Expression (vergleiche Abb. 4.1.3 A und B) sind vermutlich auf Unterschiede in der Präparation der Gewebe sowie auf die verwendeten Mausstämme zurückzuführen. Der altersabhängige Anstieg der *Cln6*-Expression wurde durch *in-situ*-Hybridisierung bestätigt (Abb. 4.1.4). Ähnliche Expressionsmuster wurden für *Cln1*, *Cln3* und *Cln5* beschrieben (Eliason et al. 2007; Holmberg et al. 2004; Isosomppi et al. 1999). Dies weist darauf hin, dass die *Cln6*-Expression im Laufe der Reifung des Hirns reguliert wird, möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor STAT3, der eine Signalsequenz am Promoter des *Cln6*-Gens binden kann. STAT3 ist an der Regulation von bis zu 400 Genen beteiligt, die in verschiedene molekulare Mechanismen eingebunden sind. Er kann sowohl aktivierend als auch inhibitorisch auf die Genexpression wirken, im Falle der Bindung des *Cln6*-Promotors ist letzteres der Fall (Snyder et al. 2008).

Die krankheitsverursachende Mutation in *nclf*-Mäusen (c.307insC) ist auch in humanen CLN6-Patienten zu finden (c.316insC, Gao et al. 2002, Wheeler et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt dieser Mutation auf die *Cln6*-Expression untersucht. Die Menge der *Cln6*-mRNA war in Cortex, Cerebellum und Hippocampus von *nclf*-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren im Alter von P0 oder P28 um 35-40 % reduziert (Abb. 4.1.5). Dies weist auf eine reduzierte mRNA-Stabilität hin. Die reduzierte *Cln6*-mRNA wurde kürzlich auch in

immortalisierten cerebellären Zellen von *nclf*-Mäusen beschrieben (Cao et al. 2011). Ebenfalls reduziert ist sie im OCL6-Schafsmodell, bei dem allerdings die zugrundeliegende Mutation nicht bekannt ist (Tammen et al. 2006). Die 1bp-Insertion führt bei der Translation von Cln6 zu einem stark trunkierten Protein, das nur zwei Transmembrandomänen enthält. Expressionsanalysen zu diesem Protein (p.R103PfsX62) sowie zur homologen Mutation im humanen CLN6 (p.R106PfsX26) zeigten, dass die Syntheserate des mutanten Cln6/CLN6 sowie seine Halblebenszeit im Vergleich zum Wildtyp verringert ist. Dabei werden die verkürzten Cln6-Polypeptide dem proteasomalen Abbau zugeführt. (Kurze et al. 2010, G. Galliciotti, unveröffentlichte Ergebnisse).

Das beobachtete Expressionsmuster von *Cln6* im Cortex, Hippocampus und Cerebellum stimmt mit der Verteilung des Speichermaterials (Abb. 4.2.1) überein. Ob die Verteilung der *Cln6*-Expression auf eine spezialisierte Funktion in bestimmten Neuronenpopulationen hindeutet, muss durch nähere Analysen geklärt werden.

5.2 Pathologie der *nclf*-Maus

5.2.1 Neuropathologie

Welche molekularen Mechanismen der Neurodegeneration der CLN6-Erkrankung zugrunde liegen ist bislang unklar. Zur Untersuchung von pathologischen Veränderungen wurde die *nclf*-Maus verwendet.

Makroskopisch war im fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei 54 Wochen alten Mäusen eine Atrophie des Cerebellums zu beobachten ist, während die restlichen Hirnregionen vergleichbar mit Kontrolltieren waren (Abb. 4.2.1A). Die Atrophie des Hirns von *nclf*-Mäusen scheint somit schwächer ausgeprägt zu sein als im OCL6-Schafsmodell, bei dem eine cortikale Atrophie bereits ab dem vierten Lebensmonat beginnt, bei einer normalen Entwicklung des Hirns bis zum zweiten Monat (Oswald et al. 2005). Das Cerebellum der Schafe ist mit dem von Kontrolltieren vergleichbar. Die reduzierte Größe des Cerebellums in *nclf*-Mäusen bedarf weiterer Untersuchungen, auch in Tieren jüngerer Alters, um festzustellen, ob es sich um eine progressive Abnahme des Cerebellumvolumens oder um eine generell kleinere Größe handelt. In

Mausmodellen der CLN1- und CLN2-Erkrankung war eine Reduktion der Hirnmasse um bis zu 50 % im Alter von sechs Monaten zu beobachten (Cooper et al. 2006). Typischerweise akkumuliert in Hirnen von NCL-erkrankten Tieren und Patienten Ceroid bzw. Lipofuscin, ein heterogenes Speichermaterial aus Proteinen, Lipiden und Oligosacchariden (Jolly et al. 2002) mit autofluoreszenten Eigenschaften. Autofluoreszentes Speichermaterial ist im gesamten Hirn der *nclf*-Maus verteilt (Abb. 4.2.1B), besonders abundant in den kortikalen Schichten II-VI, der CA1-Region des Hippocampus, der Purkinjzellschicht sowie im Thalamus. Diese Verteilung ist mit der in den Mausmodellen der CLN1-, CLN3-, und CLN5-Erkrankungen vergleichbar (Eliason et al. 2007; Jalanko et al. 2005; Kopra et al. 2004; Mitchison et al. 1999). Allerdings gibt es Unterschiede in der Speicherung im Hippocampus, da in einem CLN3-defizienten Mausmodell vermehrte Akkumulation in der CA3-Region und beim CLN5-Mausmodell im Dentate Gyrus zu finden ist (Eliason et al. 2007; Kopra et al. 2004). Generell stimmt die allgemeine Verteilung des Speichermaterials mit der Expression des *Cln6*-Gens überein (5.1). Das elektronenmikroskopische Erscheinungsbild des Speichermaterials im Hirn der *nclf*-Maus weist hauptsächlich ein NCL-typisches, *fingerprint*- und rectilineares Profil auf. Dies ist identisch mit dem Speichermaterial in Patienten der CLN3-, CLN5-, CLN7- und CLN8-Erkrankung (Alroy et al. 2011), was auf eine Beteiligung der verschiedenen Proteine am gleichen molekularen Mechanismus hindeutet. Die lysosomalen Einschlüsse im Hirn von *nclf*-Mäusen füllen oftmals einen Großteil des neuronalen Zytoplasmas aus, wie es auch für das CLN2-Mausmodell beschrieben wurde (Sleat et al. 2004). Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass auch Mikrogliazellen stark mit Speichermaterial angefüllt waren (Abb. 4.2.3). Dies wurde ebenfalls für humane CLN6-Patienten (Alroy et al. 2011) sowie für das OCL6-Schafsmodell beschrieben (Oswald et al. 2005). Eine Kollokalisierung des Astrozytenmarkers GFAP mit Speichermaterial konnte in der *nclf*-Maus nicht beobachtet werden (Abb. 4.2.3), wohl jedoch im OCL6-Schafsmodell (Oswald et al. 2005). Möglicherweise ist der Grad der Speicherung in *nclf*-Astrozyten gering, wie es auch für humane Patienten beschrieben wurde (Alroy et al. 2011). Diese Differenzen könnten auf spezies-

spezifische Unterschiede hindeuten. Alternativ war das Detektionslimit zum jeweiligen Zeitpunkt der Analyse unterschiedlich, so dass ein Nachweis hier nicht möglich war.

Neurodegenerative Erkrankungen sind charakterisiert durch die Aktivierung von Astrozyten (Astroglie) und Mikroglia (Mikroglie). Die Verteilung der Mikroglie im Hirn der *nclf*-Maus wurde durch den Makrophagenmarker CD68 untersucht. Mikrogliazellen sind die Makrophagen des Hirns, die auf Signale beschädigter Neuronen reagieren, und daraufhin proliferieren und zu Phagozyten differenzieren. Die Mikroglie ist auf Bereiche, in denen sich degenerierende Neuronen befinden, begrenzt. (Graeber und Streit 1990). Im Hirn von *nclf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen konnte eine durch das gesamte Hirn verteilte Mikroglie beobachtet werden (Abb. 4.2.4). Die Verteilung war ähnlich der des autofluoreszenten Speicher-material (Abb. 4.2.1), mit einer stärkeren Ausprägung der Mikroglie in den kortikalen Schichten von II-VI und im Thalamus. Die ausgeprägte Neurodegeneration im Thalamus, aber auch im Cortex wurde bereits in Mausmodellen der CLN1-, CLN2- und CLN3-Erkrankung beobachtet (Kielar et al. 2007; Pontikis et al. 2005; Sleat et al. 2004). Trotz der beobachteten Atrophie des Cerebellums und einer starken Akkumulation von Speicher-material in Purkinjezellen war die Mikroglie dort nicht sehr ausgeprägt und auf die Granularschicht beschränkt. Auch Astroglie ist im Cerebellum erst später als im Cortex oder Thalamus zu beobachten (Dr. J.D.Cooper, King's College London, Dr. M.Damme, Universität Bielefeld, persönliche Mitteilung). Ein Verlust von Purkinjezellen war nicht nachweisbar. Dies korreliert mit Befunden an CLN3-, CLN6- und CLN8-Patienten, bei denen ebenfalls nur vereinzelt ein ausgeprägter Verlust von Purkinjezellen beobachtet wurde (Aberg et al. 2011; Aiello et al. 2011; Alroy et al. 2011). In Mausmodell der CLN1-, CLN2-, und CLN3-Erkrankung sowie in CLN1-, CLN2- CLN5- und CLN7-Patienten kommt es dagegen zum Verlust der Purkinjezellen, zur Astrozytose und zur Bergmann-Glie im Cerebellum (Aberg et al. 2011; Autti et al. 2011; Chang et al. 2011; Elleder et al. 2011; Macauley et al. 2009; Sleat et al. 2004; Weimer et al. 2009). Demnach verläuft die Neurodegeneration in den verschiedenen NCLs zumindest im Cerebellum nicht

nach dem gleichen Muster ab. Im Hippocampus der *ncif*-Maus, wo besonders die CA1-Region stark autofluoreszierte, waren vereinzelte Cluster von Mikrogliose im Stratum radiatum zu finden. Die Befunde aus Cerebellum und Hippocampus weisen darauf hin, dass das Ausmaß der lysosomalen Speicherung nicht oder nur partiell mit dem Verlauf der Neurodegeneration übereinstimmt. Zu dieser Schlußfolgerung führten auch Untersuchungen am OCL6-Schafmodell (Jolly et al. 1989; Oswald et al. 2005; Palmer et al. 2002). Demnach korreliert das Ausmaß der Neurodegeneration vielmehr mit der Aktivierung von Mikrogliazellen, die dem offensichtlichen Neuronensterben vorausgeht (Oswald et al. 2008). Weiterhin wurde in den Mausmodellen der CLN2- und CLN3 Erkrankung sowie im OCL-Schaf beobachtet, dass bestimmte Neuronenpopulationen wie GABAerge Interneurone früher degenerieren als andere (Cooper et al. 2002, Mitchison et al. 1999, Oswald et al. 2001). Da diese Degeneration jedoch einem regionalen Muster folgt und beispielweise die GABAergen Neurone des parietookzipitalen Cortex früher degenerieren als die des Motorcortex wird vermutet, dass auch Lokalisation und Konnektivität von Neuronen das Zellüberleben beeinflussen (Cooper et al. 2006; Oswald et al. 2008). Der Verlust der GABAergen Neurone geht einher mit der Abnahme der GABA-Konzentration in den Hirnregionen mit der ausgeprägtesten Neurodegeneration wie dem parietookzipitalen Cortex im OCL6-Schaf (Pears et al. 2007). Denkbar sind weiterhin spezialisierte Funktionen einzelner NCL-Proteine in bestimmten Neuronenpopulationen, hierüber ist jedoch bislang nichts bekannt.

Die chronische Aktivierung von Mikrogliazellen, wie bei denen sich im Endstadium befindlichen, hier analysierten Mäusen beobachtet, trägt vermutlich mit zur Neurodegeneration bei. Durch unterschiedliche Prozesse, wie Phagozytose von Neuronen und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, kann die Aktivierung von Mikrogliazellen zur Neurodegeneration führen (Block et al. 2007). Im Falle von lysosomalen Speichererkrankungen ist die Funktion der Mikrogliazellen zusätzlich gestört, da durch die lysosomale Dysfunktion der Abbau von phagozytiertem Material nicht erfolgen kann. Können, wie in einem Mausmodell der Sandhoff-Erkrankung durch eine

Knochenmarkstransplantation, gesunde Mikroglia ins Hirn eindringen und sterbende Zellen phagozytieren, kann die Neurodegeneration verhindert werden (Wada et al. 2000).

Autophagie ist ein ständig stattfindender Weg des lysosomalen Abbaus von Proteinen und Organellen. In Mäusen, die für essentielle Faktoren der Autophagie wie Atg5 oder Atg7 defizient sind, kommt es zur Bildung von Einschlüssen, gefolgt von Neurodegeneration (Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2006). Da es sich bei den NCLs um eine neurodegenerative lysosomale Erkrankung handelt, ist eine Beeinträchtigung von Autophagie-Prozessen wahrscheinlich und wurde bereits für die Mausmodelle der NCL-Erkrankungen CLN3 und CLN10 beschrieben (Cao et al. 2006; Koike et al. 2000; Shacka und Roth 2007). In der *nclf*-Maus wurde die relative Menge von Autophagosomen durch LC3-II Western-Blot-Analysen bestimmt (Abb. 4.2.5). Dabei konnte festgestellt werden, dass mit steigendem Alter der Mäuse die Menge an LC3-II anstieg, und somit eine Akkumulation an Autophagosomen vorliegt. Dies ist auch in anderen LSDs zu beobachten, wie z. B. der multiplen Sulfatase-Defizienz (Settembre et al. 2008), aber auch in der CLN3- und CLN10-Form der NCL (Cao et al. 2006; Koike et al. 2005; Shacka und Roth 2007). Die höhere Menge an Autophagosomen kann entweder durch eine erhöhte Induktion der Autophagie oder durch einen verminderten Abbau von Autophagosomen verursacht sein. Daher wurde die Menge von Beclin-1 bestimmt, das im Phosphatidylinositol-3-Kinase-Komplex zur Induktion von Autophagie benötigt wird (Itakura et al. 2008). Eine erhöhte Beclin-1 Expression spricht für eine vermehrte Induktion von Autophagie, wie sie bei der Niemann-Pick Typ C Erkrankung oder der GM1-Gangliosidose festgestellt wurde (Pacheco und Lieberman 2007; Takamura et al. 2008). In der *nclf*-Maus hingegen konnte in keinem der untersuchten Altersstadien eine veränderte Beclin-1-Expression beobachtet werden (Abb. 4.2.6). Somit liegt keine erhöhte Induktion, sondern vermutlich ein verminderter Abbau von Autophagosomen vor, der durch eine lysosomale Dysfunktion oder aber eine verminderte Fusion von Lysosomen und Autophagosomen verursacht sein könnte. Bei einer verminderten Degradierung von Autophagosomen kommt es sowohl in Autophagie-defizienten Mäusen als

auch in Mäusen mit lysosomalen Speichererkrankungen, wie der multiplen Sulfatase-Defizienz, zur Akkumulation von p62 (Komatsu et al. 2007; Settembre et al. 2008). Eine der Funktionen von p62 ist die eines Adaptorproteins für selektive Autophagie, wobei es für den Abbau durch Autophagie bestimmte ubiquitinierte Proteine bindet. Diese Komplexe werden anschließend durch Autophagie abgebaut (Shin 1998). Bei gestörtem Abbau häufen sich p62 und ubiquitinierte Proteine an (Rideout et al. 2004). Im Hirn von *nclf*-Mäusen sind bereits im Alter von 20 Wochen p62-Aggregate nachweisbar, die mit fortschreitendem Alter zunehmen (Abb. 4.2.7). Polyubiquitinierte Proteine waren im Hirn von *nclf*-Mäusen ebenfalls verstärkt vorhanden (Abb. 4.2.7). p62-positive Aggregate waren im *nclf*-Hirn ausschließlich in Neuronen, nicht aber in Lamp1-positiven Strukturen lokalisiert. Es ist bekannt, dass bei fehlendem Abbau von p62 in autolysosomalen Strukturen durch Oligomerisierung von p62 und die Bindung von ubiquitinierten Proteinen zytoplasmatische Aggregate entstehen (Ichimura und Komatsu 2010). Es ist somit anzunehmen, dass die im *nclf*-Hirn beobachteten Akkumulationen von p62 und ubiquitinierten Proteinen im Zytoplasma lokalisiert sind. Neben seiner Funktion als Rezeptor für selektive Autophagie kann p62 durch verschiedene Signaldomänen das Zellüberleben beeinflussen. Während durch Bindung von TRAF6 und die Aktivierung des TRAF6-NF κ B Signaltransduktionsweges das Zellüberleben gefördert werden kann (Sanz et al. 2000), kann p62 durch direkte Interaktion mit Caspase-8 Apoptose auslösen (Jin et al. 2009). Es wird daher vermutet, dass die fehlende Regulation der Menge von p62 durch Induktion von Apoptose zur Neurodegeneration beiträgt.

5.2.2 Pathologie peripherer Organe der *nclf*-Maus

In den NCLs liegt der Fokus auf den neurodegenerativen Pathomechanismen, da diese für einen Großteil der Symptome verantwortlich sind. Andere Organe sind allerdings auch von der Akkumulation von Speichermaterial betroffen, und es ist zu vermuten, dass bei einem langsamen Krankheitsverlauf weitere klinische Symptome auftreten, die auf Fehlfunktionen peripherer Organe zurückzuführen sind (Sakajiri et al. 1995, Ostergaard et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Herz und Leber von Wildtyp-Mäusen, in denen die *Cln6*-Expressionum ein Vielfaches höher ist als im Hirn (Wheeler et al. 2002, Gao et al. 2002) genauer untersucht und mit *nclf*-Mäusen verglichen, um mögliche Pathomechanismen zu identifizieren. In der Leber 54 Wochen alter *nclf*-Mäuse findet sich autofluoreszentes Speichermaterial mit rectilinearem Profil sowohl in Hepatozyten als auch in Kupfferzellen (Abb. 4.2.10A und Abb. 4.2.11). Das Ausmaß der Speicherung in Hepatozyten war allerdings geringer als in Neuronen von *nclf*-Mäusen des gleichen Alters (Abb. 4.2.1). Kupfferzellen sind Leber-residente Makrophagen. Sie waren vollständig mit Speichermaterial gefüllt (Abb. 4.2.11D), was möglicherweise auf Phagozytose zurückzuführen ist. Das Vorkommen von Speichermaterial in Kupfferzellen kann in der *nclf*-Maus bereits ab dem 3. Lebensmonat beobachtet werden (Bronson et al. 1998). Auch in Mausmodellen der CLN1-, CLN2- und CLN3-Erkrankung ist autofluoreszentes Speichermaterial in der Leber zu finden (Jalanko et al. 2005, Cotman et al. 2002, Sleat et al. 2004). In der Leber von *nclf*-Mäusen waren erhöhte Mengen von Autophagosomen nachweisbar (Abb. 4.2.13), die jedoch nicht wie im Hirn von p62- oder Ubiquitin-Akkumulationen begleitet waren. In Mäusen, die in der Leber durch konditionellen *Atg7-knock-out* Autophagie-defizient sind, zeigen sich allerdings p62/Ubiquitin-Akkumulationen (Komatsu et al. 2005). Daher ist davon auszugehen, dass der Prozess der Autophagie in der Leber von *nclf*-Mäusen weniger beeinträchtigt ist wie in Autophagie-defizienten Mäusen und im Hirn von *nclf*-Mäusen (5.2.1). In anderen lysosomalen Speichererkrankungen, wie den Niemann-Pick-Erkrankungen, kommt es zu pathologischen Veränderungen der Leber wie Hepatomegalie (vom Dahl und Mengel 2010). In den NCLs wurde jedoch bislang keine Einschränkung der Leberfunktion beschrieben. Wie Neurone sind auch Hepatozyten postmitotische Zellen, allerdings können sie durch Signale von Zytokinen das G0-Stadium des Zellzyklus verlassen und sich teilen (Fujiyoshi und Ozaki 2011). Vermutlich kann daher bei einem vergleichsweise geringen Grad der Speicherung eine mögliche Dysfunktion von Zellen bzw. der Leber durch Entfernung von geschädigten Zellen durch aktivierte Kupfferzellen und Regeneration durch Zellteilung abgewendet werden. Jedoch sind auch

Kupfferzellen von der lysosomalen Dyfunktion betroffen und nicht zur Degradierung von phagozytiertem Material fähig. Mögliche pathologische Konsequenzen sind allerdings bislang nicht bekannt.

Autofluoreszentes Speichermaterial wurde im Myokard von 3 Monate alten *ncf*-Mäusen beschrieben (Bronson et al. 1998). Auch in *Cln2*-defizienten Mäusen wurde dies beobachtet (Sleat et al. 2004). Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Herzmuskels von *ncf*-Mäusen im Alter von 54 Wochen zeigten Speichermaterial mit rectilinearem Profil (Abb. 4.2.12). Auffällig waren ebenfalls vergrößerte Mitochondrien. In humanen Patienten wurden geschwollene Mitochondrien bereits beschrieben und waren begleitet von einer Hypertrophie des Herzmuskels (Alroy et al. 2011). Auch in Patienten, die von der adulten Form der CLN6-Erkrankung betroffen sind, wurde Speichermaterial sowie eine Beeinträchtigung der Herzfunktion festgestellt (Dom et al. 1979; Sakajiri et al. 1995). Bei CLN2- und CLN3-Patienten treten ebenfalls häufig Herzprobleme auf (Hofman et al. 2001; Ostergaard et al. 2011). Wie im Hirn und in der Leber waren auch im Herzen von *ncf*-Mäusen erhöhte Zahlen von Autophagosomen zu beobachten (Abb. 4.2.13), die jedoch nicht von Akkumulationen ubiquitiniertes Proteine begleitet waren (Abb. 4.2.14). Die Anhäufung von Autophagosomen könnte mitverantwortlich sein für die veränderte Morphologie der Mitochondrien, da aufgrund des hohen Energiebedarfes Mitophagie im Herzen von großer Bedeutung ist. Auch in Mäusen mit *Atg5*-defizienten Herzmuskelzellen finden sich geschwollene Mitochondrien (Nakai et al. 2007). Die genauen Prozesse dieser Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unbekannt. Die Unterschiede zwischen den pathologischen Veränderungen der einzelnen Organe in *ncf*-Mäusen müssen noch genauer untersucht werden, um spezifische Auswirkungen der lysosomalen Dysfunktion in den jeweiligen Geweben bestimmen zu können. Ein besseres Verständnis von Krankheitssymptomen wie einer Fehlfunktion des Herzens kann zur Identifikation von Therapiemöglichkeiten wie Herzschrittmachern beitragen und somit die Lebensqualität von Patienten erheblich verbessern.

5.3 Untersuchungen des lysosomalen Proteoms

CLN6 ist ein ER-residentes Membranprotein mit unbekannter Funktion. Auf welche Weise Mutationen im *CLN6*-Gen eine lysosomale Dysfunktion auslösen können, ist ungeklärt. Es wäre denkbar, dass CLN6 eine Rolle beim Transport oder bei posttranslationalen Modifikationen von lysosomalen Proteinen spielt. Aus früheren Untersuchungen an Fibroblasten von CLN6-Patienten oder von *nclf*-Mäusen gab es Hinweise, dass weder die Aktivität der β -Hexosaminidase und Arylsulfatase A noch der Transport oder die Prozessierung von Cathepsin D unterschiedlich zu Kontrollzellen war (Heine et al. 2004). Da das Lysosom aber über 60 lösliche Enzyme enthält (Lübke et al. 2009), ist nicht auszuschließen, dass andere lysosomale Proteine durch das mutierte Cln6 in ihrer Präsenz, Stabilität oder Aktivität beeinträchtigt sind. Deshalb wurde das lysosomale Proteom von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen mit verschiedenen Methoden untersucht.

Lösliche lysosomale Proteine werden für den Transport ins Lysosom spezifisch mit M6P-Resten modifiziert (1.1.2, Braulke und Bonifacio 2009). Es ist möglich, lösliche M6P-haltige lysosomale Proteine mit einem spezifischen single-chain Antikörper nachzuweisen und affinitätschromatographisch aufzureinigen (Müller-Loennies et al. 2010). Bei dieser Analyse im Hirn von 54 Wochen alten *nclf*- und Kontrolltieren konnten um 30 % erhöhte Mengen von M6P-haltigen Proteinen festgestellt werden (Abb. 4.3.1 und Abb. 4.3.2). Mögliche Gründe hierfür könnten eine erhöhte Expression lysosomaler Proteine, ein verringerter Abbau oder eine veränderte Aktivität der lysosomalen Phosphatasen Acp5 und Acp2, die für die Entfernung der M6P-Reste zuständig sind, sein (Sun et al. 2008, Dr. G. Makypidi, UKE, unveröffentlichte Ergebnisse). Erhöhte mRNA-Spiegel von lysosomalen Enzymen sind im Zuge verschiedener Microarray-Analysen in CLN6-defizienten Fibroblasten und Neuronen nicht festgestellt worden (Texeira et al. 2006, Dr. A.K.Kurze, Dr. A.Quitsch, UKE, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine verringerte Aktivität der lysosomalen Phosphatasen ist in verschiedenen Regionen des Hirns von vier Wochen alten *nclf*-Mäusen ebenfalls nicht messbar gewesen (Pohl et al. 2007). Somit ist es wahrscheinlich, dass die erhöhten Mengen an M6P-haltigen Proteinen auf eine

höhere Anzahl von Lysosomen und einen verminderten Abbaudieser Proteine aufgrund der lysosomalen Dysfunktion zurückzuführen sind. Die vermehrte Menge von Gliazellen (5.2.1), die viele Lysosomen enthalten, könnte ebenfalls zu der erhöhten Menge M6P-haltiger Proteine beitragen. Im Hirn von sechs Wochen alten CLN3-defizienten Mäusen finden sich ebenfalls erhöhte Mengen an M6P-haltigen lysosomalen Proteinen (Dr. G. Makrypidi, unveröffentlichte Ergebnisse), ebenso im Hirn von CLN3-Patienten (Sleat et al. 1998). Das Bandenmuster M6P-haltiger Proteine im Western-Blot unterschied sich in *ncif*-Mäusen nicht von Kontrolltieren, jedoch könnten hier einzelne Signale nicht detektierbar sein oder von anderen Banden überlagert werden. Um die Zusammensetzung des lysosomalen Proteoms von Wildtyp- und *ncif*-Mäusen näher zu untersuchen, wurden daher M6P-haltige lysosomale Proteine durch subzelluläre Fraktionierung aus Hirngewebe angereichert (Abb. 4.3.3) und nach M6P-Affinitätschromatographie (Abb. 4.3.4) massenspektrometrisch analysiert. Pro Probe wurden bis zu 26 lösliche lysosomale Proteine sowie bis zu 92 Proteine andere Kompartimente, wie Mitochondrien und ER, detektiert. Es wurden keine konsistenten Unterschiede zwischen *ncif*- und Kontrolltieren festgestellt. Es gibt bislang 60 identifizierte M6P-haltige Proteine (Lübke et al. 2009), von denen allerdings nur knapp die Hälfte mit dem hier verwendeten experimentellen Ansatz identifiziert werden konnte. Dies kann z. B. dadurch begründet sein, dass einige Proteine, wie die saure Ceramidase, vier mögliche M6P-Phosphorylierungsstellen haben und somit mit höherer Affinität an die Säule binden als Proteine mit nur einem M6P-Rest, wie die saure Lipase (Sleat et al. 2006). Gleichzeitig steigt mit der Abundanz der Proteine auch die Wahrscheinlichkeit, sie aufzureinigen, sodass hochabundante Proteine eher aufgereinigt und detektiert werden können. Des Weiteren waren in den Proben nicht-lysosomale Proteine vorhanden. Dies könnte die Detektion von geringen Proteinenmengen im Massenspektrometer erschweren. Für das Vorhandensein dieser Proteine kommen mehrere Ursachen in Betracht. Zum einen kann von der Anwesenheit von Mitochondrien im Ausgangsmaterial ausgegangen werden, da die Trennung von Lysosomen und Mitochondrien aufgrund der ähnlichen Dichte der Organellen durch Sucrosegradienten nicht möglich ist.

Diese Proteine können unspezifisch an die M6P-Beads binden oder mit lysosomalen Proteinen assoziieren. Zum anderen wurden auch Keratin identifiziert, was auf eine Kontamination der Proben während der Durchführung des Experimentesschließens lässt, z. B. durch Haut- oder Haarschuppen.

Um die Aussagekraft der M6P-Proteomanalysen zu erhöhen, sind vor allem größere Mengen von Ausgangsmaterial notwendig, um die niedrig exprimierte lysosomale Enzyme erfassen zu können. In vergleichbaren Studien von Sleat und Kollegen mit immobilisiertem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, die alle 60 bekannten lysosomalen Hydrolasen identifizieren konnten, wurden zwischen 48 und 100 Gramm Hirngewebe von Ratten bzw. vom Menschen als Ausgangsmaterial verwendet (Sleat et al. 2008; Sleat et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch lediglich ein Gramm Maushirn zur Aufreinigung von lysosomalen Fraktionen und zur anschließenden Affinitätsaufreinigung genutzt. Ob die subzelluläre Fraktionierung, durch die auch mitochondriale Proteine angereichert werden, möglicherweise zur Kontamination beiträgt, sollte durch Verwendung von Gewebehomogenaten als Ausgangsmaterial überprüft werden. Um die Anzahl unspezifischer Kontaminationen zu verringern, könnten außerdem isolierte, M6P-haltige Proteine erneut affinitätsgereinigt werden, um unspezifisch bindende Proteine in weiteren Waschschrritten zu entfernen. Weiterhin könnte eine zusätzliche Analyse von unspezifischen Eluaten mit einem Glucose-6-Phosphat-Puffer dabei helfen, unspezifische Kontaminationen zu identifizieren. Die massenspektrometrische Analyse sollte quantitativ durch Verfahren wie iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantification*) erfolgen, so dass auch Unterschiede in Mengen von Proteinen bestimmt werden können. Diese gel-freie Methode erlaubt die simultane Quantifizierung von Proteinen verschiedener Quellen (Ross et al. 2004).

Zur genaueren Analyse des lysosomalen Proteoms von *ncf*- und Wildtyp-Mäusen wurden Lysosomen der Leber als sogenannte Tritosomenfraktionen isoliert. Hierbei führt die Inhibition der Lipoprotein-Lipase zu einer erhöhten Aufnahme von LDL in die Lysosomen von Hepatozyten, die dadurch ihre Dichte verringern und von Mitochondrien durch subzelluläre Fraktionierung getrennt

werden können (Wattiaux et al. 1963). Die Proteine der Tritosomenfraktionen wurden anschließend durch 2D-Gelelektrophorese nach isoelektrischem Punkt und molarer Masse aufgetrennt und analysiert. Es zeigten sich charakteristische Unterschiede in der Verteilung der Isoformen der lysosomalen Proteasen Cathepsin D und Cathepsin Z. Im Fall von Cathepsin D waren fünf Isoformen mit einer molaren Masse von ca. 47 kDa und isoelektrischen Punkten (pI) zwischen 4,85 und 5,7 zu sehen. Die Isoformen mit einem pI von 4,85, 5,05 bzw. 5,25 waren in den Tritosomen von *nclf*-Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt als die basischeren Isoformen mit pIs von 5,5 und 5,7. Das humane Cathepsin D wird als Preprocathepsin am ER translatiert, wo die ER-Signalsequenz von Signalpeptidasen abgespalten wird (Minarowska et al. 2008). Nach dem Transport ins Lysosom wird Cathepsin D durch eine Cysteinprotease zu einer 47 kDa- intermediären Form gespalten (Zaidi et al. 2008). Die Isoformen dieser intermediären Form wurden vermutlich in dem hier vorliegenden Experiment identifiziert. Im Lysosom wird das humane Cathepsin D durch Amino- und Endo-, Cysteine- und Carboxypeptidasen weiter proteolytisch prozessiert, bis zur reifen, zweikettigen Form mit molaren Massen von 14 und 34 kDa (Minarowska et al. 2008). Die hier beobachteten verschiedenen Isoformen könnten so z. B. durch Abspaltung saurer Peptide von der intermediären Form entstehen. Eine weitere Möglichkeit sind verschiedene Glykosilierungsmuster. Das humane Cathepsin D enthält zwei mögliche *N*-Glykosilierungsstellen, mindestens 15 verschiedene Glykosilierungsmuster sind möglich (Minarowska et al. 2008). Durch diese posttranslationalen Modifikationen wie M6P-Reste (Sleat et al. 2006), Sialinsäure oder Sulfatierungen (Braulke et al. 1987) können negative Ladungen den pI des Proteins beeinflussen und somit für die beobachteten Isoformen verantwortlich sein.

Cathepsin Z wurde durch vier verschiedene Isoformen mit pIs von 4,6 bis 5,1 und einer molaren Masse von ca. 34 kDa repräsentiert, was der theoretischen Masse entspricht. In *nclf*-Tritosomen waren die saureren Isoformen mit pIs von 4,6 und 4,75 und 4,9 stärker ausgeprägt, während die basischste Form mit einem pI von 5,1 schwächer ausgeprägt war. Cathepsin Z hat zwei Glykosilierungsstellen und wird ebenfalls proteolytisch prozessiert (Appenzeller-

Herzog et al. 2005). Sowohl das humane als auch das murine Cathepsin Z enthalten eine potentielle M6P-Phosphorylierungsstelle (Sleat et al. 2006). Es kann somit von verschiedenen Glykosilierungsmustern ausgegangen werden, die für die unterschiedlichen Isoformen verantwortlich sein könnten.

Die Relevanz der beobachteten Unterschiede für die Pathogenese der Erkrankung ist nicht bekannt. Weitere Schritte müssen daher auf die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Cathepsin D und Z Isoformen gerichtet sein. So könnte die Gesamtheit der Cathepsin D Isoformen durch Pepstatin-A Affinitätschromatographie isoliert werden. Nach 1- oder 2D-isoelektrischer Fokussierung könnten dann die einzelnen Isoformen durch MS-Analyse der Oligosaccharide und der tryptischen Peptide charakterisiert werden. Daran könnten sich enzymkinetische Untersuchungen zur Aktivität der Cathepsin D Isoformen anschließen, bzw. Unterschiede in der Wechselwirkung von Cathepsin D mit bekannten Interaktionspartnern wie Prosaposin und dem *lipoprotein-receptor-related protein 1* (Beaujouin et al. 2010; Gopalakrishnan et al. 2004) gemessen werden. Die so gewonnen Ergebnisse sollten sich auf andere lysosomale Proteine, die sich durch mehrere Isoformen auszeichnen, wie Cathepsin Z, Legumain und Cathepsin C (Damme et al. 2010) übertragen lassen. Durch diese Untersuchungen könnten sich eventuell Hinweise auf die Funktion von Cln6 ergeben.

Hauptbestandteil des Speichermaterials in den meisten NCL-Formen ist die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase, ein hydrophobes Protein mit einer molaren Masse von 7,5 kDa. Auch in den Tritosomenfraktionen konnten erhöhte Mengen dieses Proteins in *nclf*-Proben festgestellt werden (Abb. 4.3.6). Die ATP-Synthase ist ein Transmembranprotein der inneren Mitochondrienmembran, das aus dem membrangebundenen F₀ Komplex, dem die Untereinheit c angehört, und einem löslichen F₁ Komplex in der Mitochondrienmatrix besteht. Zu diesem F₁-Komplex gehört unter anderem die β -Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase, die ebenfalls in *nclf*-Tritosomenfraktionen vermehrt vorhanden war (Abb. 4.3.5 und Abb. 4.3.6). Ein weiteres mitochondriales Protein, von dem erhöhte Mengen in Tritosomenfraktionen festgestellt wurden, ist VDAC1, ein mitochondrialer

Anionenkanal der durch zahlreiche Transmembrandomänen ebenfalls ein hydrophobes Protein darstellt (Abb. 4.3.5) und bereits als erhöht in Cln1-defizienten- und *nclf*-Mäusen festgestellt wurde (Kielar et al. 2009). Der Abbau von Mitochondrien erfolgt durch Mitophagie, eine Form der Makroautophagie (1.4.1) und somit im Lysosom (Youle und Narendra 2011). Somit kommt es bei lysosomaler Dysfunktion und bei Beeinträchtigungen der Autophagie (5.2) zur Akkumulation von Proteinen, die normalerweise im Lysosom abgebaut werden. Besonders hydrophobe Proteine neigen zu Aggregaten und können schwerer abgebaut werden. Warum auch die β -Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase, die ein lösliches Protein ist, vermehrt in Tritosomen vorhanden ist, ist unbekannt. Eine Akkumulation von anderen Untereinheiten der mitochondrialen ATP-Synthase wurde bislang in anderen Mausmodellen der NCL nicht nachgewiesen, jedoch fanden sich erhöhte Mengen der α - und β -Untereinheiten an der Plasmamembran Cln1-defizienter Neuronen (Lyly et al. 2008). Bei den hier gefundenen Unterschieden handelt es sich um eine spezifische Anreicherung in der Lysosomenfraktion. Durch Untersuchung von vollständigen Zell- oder Gewebehomogenaten können solche spezifischen Unterschiede nicht detektiert werden. Durch die hier angewandte Methode zur Lysosomenisolierung konnten somit bislang unentdeckte Akkumulationen von Proteinen festgestellt werden.

Die isolierten Tritosomen wurden weiterhin massenspektrometrisch untersucht. Anders als bei den M6P-Proteomanalysen konnten bis zu 51 lysosomale Proteine in den einzelnen Proben detektiert werden, die sich allerdings in ihrer Zusammensetzung nicht zwischen Wildtyp- und *nclf* unterscheiden. Durch eine zusätzliche Quantifizierung wie z. B. durch die iTraQ Methode oder quantitative Massenspektrometrie (Vissers et al. 2007) könnten zusätzliche Hinweise auf Veränderungen des Proteoms gewonnen werden. Nur durch einen zweistufigen Ansatz, durch 2D-Gelelektrophorese kombiniert mit Massenspektrometrie, können Hinweise auf wichtige Unterschiede zwischen Wildtyp- und *nclf*-Lysosomen gewonnen werden, die von pathophysiologischer Bedeutung sein können. Einen methodischen Fortschritt und wichtige Unterschiede zu den bisherigen Tritosomenfraktionen der Leber könnte die stereotaktische,

ventrikuläre Applikation von Triton-WR1339 ins Maushirn sein, um Tritosomen aus Hirn zu isolieren. und die Zusammensetzung des Proteoms im Hirn zu untersuchen. Dieses unterscheidet sich wesentlich von dem der Leber, z. B. was den M6P-Gehalt betrifft, der in der Leber durch schnelle Dephosphorylierung gleich null ist (Sun et al. 2008).

Ein wichtiger Punkt, der bisher in den Experimenten und der Diskussion ausgeschlossen wurde, ist die Zusammensetzung des lysosomalen Membranproteoms. Von den ca. 140 identifizierten lysosomalen Membranproteinen (Schröder et al. 2007b) sind bisher nur etwa 20 funktionell charakterisiert worden, bei denen Mutationen zu lysosomalen Erkrankungen führen (Ruivo et al. 2009). Ob sich Defekte von Cln6 auf die Zusammensetzung, Struktur oder Funktion von einzelnen oder mehreren lysosomalen Membranproteinen auswirken kann, muss nachfolgenden Untersuchungen vorbehalten bleiben.

5.4 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von CLN6

Durch die Identifizierung von Interaktionspartnern eines Proteins können wertvolle Hinweise auf dessen Funktion gewonnen werden. Für das CLN6-Protein wurden bislang 2 Interaktionspartner identifiziert, CRMP2 (Benedict et al. 2009) und CLN5 (Lyly et al. 2009). Bei CLN5 handelt es sich um ein lösliches lysosomales Protein, dessen Funktion unbekannt ist. CRMP2 ist an der Ausbildung von Axonen und Reifung von Neuronen beteiligt. In neuronalen Kulturen von *nclf*-Mäusen konnte eine verminderte Reifung der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden (Benedict et al. 2009). Die identifizierten Interaktionen konnten jedoch bislang keine Hinweise auf die Funktion von CLN6 liefern. Um weitere Interaktionspartner von CLN6 zu identifizieren, die bessere Hinweise auf die Funktion von CLN6 geben können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Membran-Hefe-2-Hybrid-System verwendet, mit dem eine cDNA Bibliothek auf Interaktionspartner getestet wurde. Nach der ersten Verifizierung möglicher Interaktionspartner im Hefesystem konnten 15 Kandidatenproteine identifiziert werden (Tabelle 4.4.1). Zur weiteren Auswahl von näher zu untersuchenden Proteinen wurden die Art

eines Proteins und seine Lokalisation, sowie Ergebnisse aus Literaturrecherchen und Experimenten früherer Studien berücksichtigt. Bei den Kandidaten *Pre-B-cell-leukemia homebox 2* und *THAP-containing apoptosis related protein* handelt es sich um Transkriptionsfaktoren (Bessiere et al. 2008; Sugaya et al. 1994). Da in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Kandidaten hoch ist, da durch überexprimierte Transkriptionsfaktoren die Transkription der Reportgene initiiert werden kann, wurden diese Kandidaten nicht genauer untersucht. *Transportin 2*, *RAN-binding protein*, *Elav-like family member 4* und *zinc-finger protein 330* sind im Nukleus lokalisierte Proteine mit unterschiedlichen Funktionen beim Protein-Transport, RNA-Bindung oder bislang unbekanntem Prozessen (Bolivar et al. 1999; Gloerich et al. 2011; Singh et al. 2004; Siomi et al. 1997). Aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation wurden diese Proteine zunächst ebenfalls nicht weiter untersucht. Der Kandidat *Low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) ist ein Transport- und Signalrezeptor mit über 30 bekannten Liganden, unter anderem den lysosomalen Proteinen Cathepsin D und Prosaposin, der an der Plasmamembran lokalisiert und in eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen involviert ist (Beaujouin et al. 2010; Hiesberger et al. 1998; Lillis et al. 2008). Da sich allerdings der im Screen identifizierte Teil von LRP1 im Extrazellulärraum befindet, wurde dieses Protein in weiteren Untersuchungen vorerst nicht berücksichtigt. Die im Zytoplasma befindlichen Proteine *Nardilysin*, eine Metalloendopeptidase (Hospital et al. 1997), und *cytoskeleton-associated protein 5*, das an mitotische Spindeln assoziiert (Gergely et al. 2003), könnten theoretisch mit dem zytoplasmatischen Teil von CLN6 interagieren. Das Protein *CAM-kinase-like vesicle-associated* befindet sich ebenfalls im Zytoplasma und ist an die Plasmamembran assoziiert, seine Funktion ist jedoch unbekannt (Godbout et al. 1994). Da zu den genannten Proteinen keine weiteren Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an krankheitsrelevanten Prozessen bestanden, wurde zunächst auf eine nähere Analyse verzichtet.

Am ER transloziert, glykosyliert und sezerniert werden die beiden Kandidatenproteine *Apolipoprotein D* und das *AE-binding protein* (Chen et al. 2009; Drayna et al. 1986). Somit könnten sie innerhalb des ERs mit CLN6

interagieren. *Apolipoprotein D* ist ein Bestandteil des *high density lipoprotein complexes*. Es hat aber vermutlich viele weitere Funktionen, unter anderem den Transport von Lipiden. (Peitsch und Boguski 1990). Im Hirn von *nclf*-Mäusen bzw. CLN6-defizienten neuronalen Zellen gibt es charakteristische Veränderungen im Lipidmetabolismus, wie erhöhte Spiegel von GM2- und GM3-Gangliosiden und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (Jabs et al. 2008) (Dr. A. K. Kurze, UKE, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch die *7-dehydrocholesterol reductase* (DHCR7) ist ein ER residentes Protein, das den letzten Schritt der Cholesterolsynthese katalysiert (Shefer et al. 1998). In vorherigen Studien wurde ein gestörter Cholesterolhaushalt in Fibroblasten von CLN6-Patienten festgestellt (Teixeira et al. 2006). Aufgrund dieser Störungen des Lipidhaushaltes in CLN6-defekten Zellen wurden somit Apolipoprotein D und DHCR7 zur weiteren Analyse ausgewählt. Ein weiterer Kandidat war der *GABA A receptor, alpha 5* (GABAA α 5). GABA A Rezeptoren an der Plasmamembran werden aus unterschiedlichen Untereinheiten im ER zusammengesetzt (Bedford et al. 2001). Hierbei wäre eine Interaktion mit CLN6 möglich. Des Weiteren wurden reduzierte Mengen der GABAA α 2 Untereinheit im Hirn von *nclf*-Mäusen detektiert (Dr. A. Quitsch, UKE, unveröffentlichte Ergebnisse). Da GABAerge Interneurone im Hirn von CLN6-defizienten Schafen früh degenerieren (Oswald et al. 2008), ist hier ein Bezug zur Pathologie der Erkrankung gegeben. Somit wurde eine mögliche Interaktion näher untersucht. Schließlich wurde das *heat shock protein 70-2* (HSP70) in die weiteren Analysen eingeschlossen. Die HSP70-Familie setzt sich aus fünf stark homologen Proteinen mit verschiedenen Funktionen und subzellulärer Lokalisation zusammen. HSP70 befindet sich sowohl im Zytoplasma als auch im ER und fungiert u.a. als Chaperon (Young 2010). Da Hitzeschock-Proteine bei der Faltung und dem Transport von einer Vielzahl von Proteinen beteiligt sind, stellen sie häufig falsch-positive Interaktionspartner dar (Serebriiskii et al. 2000). Da allerdings HSP70 bereits in früheren Studien als potentieller Interaktionspartner von CLN6 identifiziert wurde (Dr. Yella Martin, University College London, persönliche Mitteilung) wurde eine mögliche Interaktion weiter analysiert.

Um die Interaktionen mit den ausgewählten Kandidaten weiter zu untersuchen, wurden zunächst die jeweiligen vollständigen cDNAs erneut in Vektoren des Hefesystems inkloniert. Dabei konnte die Interaktion von CLN6 mit HSP70 und DHCR7 nicht bestätigt werden. Für die Interaktion mit GABAA α 5 zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse, während die Interaktion von CLN6 und Apolipoprotein D bestätigt werden konnte (Abb. 4.4.2). Als zweite Methode zur Überprüfung der Interaktion von CLN6 und GABAA α 5 wurde der *Protein Complementation Assay* genutzt. Hierbei konnte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nicht verifiziert werden (Abb. 4.4.4). Die Überprüfung der CLN6-Apolipoprotein D-Interaktion steht noch aus. Das Vorkommen von falsch-positiven Interaktionen ist im Hefesystem weit verbreitet und beträgt im klassischen Hefe-2-Hybrid-System zwischen 25 und 45 %. Bei Membranproteinen wie CLN6 liegt diese Rate höher (Huang et al. 2007). Die Gründe für das Auftreten falsch-positiver Interaktionen können z.B. die unspezifische Abspaltung des Transkriptionsfaktors durch endogene Hefe-Proteasen oder die Aktivierung der Transkription von Reporter genen durch *Bait*- bzw. *Prey*-Überexpression sein (Serebriiskii et al. 2000). Ein weiterer Nachteil des Systems ist die hohe Zahl von 95 % falsch negativer Interaktionen (Huang et al. 2007). Die für CLN6 beschriebenen Interaktionspartner CLN5 und CRMP2 konnten mit dem hier durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Verfahren nicht verifiziert werden. Als nächstes sollten daher Apolipoprotein D und die anderen, hier noch nicht genauer untersuchten Kandidaten, weiter untersucht werden. Methodisch sollte auch ein Hefe-2-Hybrid-Screen mit einer N-terminal gekoppelten cDNA-Bibliothek durchgeführt werden. Hiermit ist die Rate positiver Interaktionen höher und es konnten bereits für eine Reihe lysosomaler Membranproteine wie das lysosomale Tetraspanin LIMP-2 und ADAM10 Interaktionspartner identifiziert werden (Michael Schwake, Universität Kiel, persönliche Mitteilung). Weitere Protein-Interaktionsmethoden, wie GST-Pull-Down Experimente und BIAcore Plasmon-Resonanz-Spektroskopie, können zusätzlich zur Überprüfung der Protein-Wechselwirkungen dienen.

6 Zusammenfassung

Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCLs) umfassen eine Gruppe neurodegenerativer lysosomaler Speichererkrankungen im Kindesalter. Ausgelöst werden diese Erkrankungen durch Mutationen in zehn verschiedenen Genen, die für lösliche und membrangebundene Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und Funktion codieren. Eines dieser Proteine ist CLN6, ein ER-residentes Transmembranprotein, dessen Funktion unbekannt ist. Die der CLN6-Erkrankung zu Grunde liegenden Pathomechanismen sind ungeklärt.

1. In der vorliegenden Arbeit konnte durch *in-situ* Hybridisierung, Realtime-PCR und Northern-Blot-Analyse gezeigt werden, dass *Cln6* ubiquitär in Neuronen, nicht aber in Gliazellen des Maushirns exprimiert wird. Es sind erhöhte Transkriptmengen im Cerebellum, Cerebralen Cortex und der CA1- und Gyrus-Dentate-Region des Hippocampus zu beobachten. Das Expressionsmuster im Hippocampus lässt vermuten, dass die *Cln6*-Expression mit hippocampaler Transkriptregulation während epileptischer Krämpfe korreliert. Die Expression von *Cln6* nimmt während der postnatalen Entwicklung des Maushirns zu. Die *Cln6*-mRNA-Expression in Geweben des *nclf*-Mausmodells der CLN6-Erkrankung ist stark vermindert, was auf eine verminderte Stabilität der mutanten *Cln6*-mRNA hindeutet.
2. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf Untersuchungen zu möglichen Pathomechanismen der Neurodegeneration in der *nclf*-Maus. Autofluoreszentes Speichermaterial und verschiedene, NCL-charakteristische Speicherlysosomen waren in Neuronen von *nclf*-Mäusen detektierbar, begleitet von einer progressiven Aktivierung von Mikrogliazellen. Die erstmals belegten Akkumulationen von Autophagosomen und p62-positiven zytoplasmatischen Proteinaggregaten im Hirn von *nclf*-Mäusen deuten auf Störungen der konstitutiven Autophagie hin, die essentiell für das Überleben von Neuronen ist.

3. Um die Rolle des ER-residenten CLN6-Proteins für funktionelle Lysosomen zu bestimmen, wurden vergleichende Analysen des lysosomalen Proteoms von Wildtyp- und *nclf*-Mäusen mittels subzellulärer Fraktionierung, Affinitätschromatographie, 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie durchgeführt. Neben der Akkumulationen der mitochondrialen VDAC1 und den Untereinheiten β und γ der mitochondrialen ATP-Synthase wurden veränderte Isoform-Muster mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten der lysosomalen Hydrolasen Cathepsin D und Z festgestellt. Die Ursachen und funktionellen Konsequenzen dieser Veränderungen müssen durch weitere Experimente untersucht werden.
4. Um Hinweise auf die mögliche Funktion von CLN6 zu erlangen, sollten Bindungspartner mit Hilfe des „Split-Ubiquitin“-Hefe-2-Hybrid Systems identifiziert werden. Bisher wurden 4 von 15 möglichen Interaktionspartnern näher untersucht. Die Analysen hierzu müssen fortgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aberg L, Autti T, Braulke T, Cooper JD, Van Diggelen O, Jalanko A, Kenrick S, Kitzmüller C, Kohlschütter A, Kyttälä A, Mitchison HM, Mole S, Niezen-de Boer R, Punkari ML, Schulz A, Talling M, Williams RE. 2011. CLN3. The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease). Oxford: Oxford University Press.
- Aiello C, Canelli N, Cooper JD, Haltia M, Herva R, Lahtinen U, Lehesjoki AE, Mole S, Santorelli FM, Siintola E, Simonati A. 2011. CLN8. The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease). Oxford: Oxford University Press. p 189-202.
- Alroy J, Braulke T, Cismondi IA, Cooper JD, Creegan D, Elleder M, Kitzmüller C, Kohan R, Kohlschütter A, Mole SE, Noher der Halac I, Pfannl R, Quitsch A, Schulz A. 2011. CLN6. The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses. 2 ed. Oxford: Oxford University Press. p 159-175.
- Appenzeller-Herzog C, Nyfeler B, Burkhard P, Santamaria I, Lopez-Otin C, Hauri HP. 2005. Carbohydrate- and conformation-dependent cargo capture for ER-exit. *Mol Biol Cell* 16:1258-1267.
- Arsov T, Smith KR, Damiano J, Franceschetti S, Canafoglia L, Bromhead CJ, Andermann E, Vears DF, Cossette P, Rajagopalan S, McDougall A, Sofia V, Farrell M, Aguglia U, Zini A, Meletti S, Morbin M, Mullen S, Andermann F, Mole SE, Bahlo M, Berkovic SF. 2011. Kufs Disease, the Major Adult Form of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Caused by Mutations in CLN6. *Am J Hum Genet* 88:566-573.
- Autti T, Cooper JD, van Diggelen O, Haltia M, Jalanko A, Kitzmüller C, Kopra O, Lönnquist T, Lyly A, Mole S, Rapola J, Vanhanen SL. 2011. CLN1. The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (Batten Disease). Oxford: Oxford University Press. p 55-79.
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* 28:5747-5763.
- 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* 18:3952-3965.
- Beaujouin M, Prebois C, Derocq D, Laurent-Matha V, Masson O, Pattingre S, Coopman P, Bettache N, Grossfield J, Hollingsworth RE, Zhang H, Yao Z, Hyman BT, van der Geer P, Smith GK, Liaudet-Coopman E. 2010. Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth. *J Cell Sci* 123:3336-3346.
- Beck M. 2010. Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 62:33-40.
- Bedford FK, Kittler JT, Müller E, Thomas P, Uren JM, Merlo D, Wisden W, Triller A, Smart TG, Moss SJ. 2001. GABA(A) receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nat Neurosci* 4:908-916.
- 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* 87:2157-2166.
- Bessiere D, Lacroix C, Campagne S, Ecochard V, Guillet V, Mourey L, Lopez F, Czaplicki J, Demange P, Milon A, Girard JP, Gervais V. 2008. Structure-function analysis of the THAP zinc finger of THAP1, a large C2CH DNA-binding module linked to Rb/E2F pathways. *J Biol Chem* 283:4352-4363.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171:603-614.
- Block ML, Zecca L, Hong JS. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Bolivar J, Diaz I, Iglesias C, Valdivia MM. 1999. Molecular cloning of a zinc finger autoantigen transiently associated with interphase nucleolus and mitotic centromeres and midbodies. Orthologous proteins with nine CXXC motifs highly conserved from nematodes to humans. *J Biol Chem* 274:36456-36464.
- Braulke T, Bonifacino JS. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793:605-614.
- Braulke T, Hille A, Huttner WB, Hasilik A, von Figura K. 1987. Sulfated oligosaccharides in human lysosomal enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 143:178-185.
- Braun M, Waheed A, von Figura K. 1989. Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *Embo J* 8:3633-3640.
- Brix K, Linke M, Tepel C, Herzog V. 2001. Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biol Chem* 382:717-725.
- 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* 77:289-297.
- Cao Y, Espinola JA, Fossale E, Massey AC, Cuervo AM, MacDonald ME, Cotman SL. 2006. Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 281:20483-20493.
- Chang M, Cooper JD, Davidson BL, Van Diggelen O, Elleder M, Goebel HH, Golabek AA, Kida E, Kohlschütter A, Lobel P, Mole S, Schulz A, Sleat DE, Warburton M, Wisniewski KE. 2011. CLN2. The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten Disease). Oxford: Oxford University Press. p 80-109.
- Chen R, Fearnley IM, Palmer DN, Walker JE. 2004. Lysine 43 is trimethylated in subunit C from bovine mitochondrial ATP synthase and in storage bodies associated with batten disease. *J Biol Chem* 279:21883-21887.
- Chen R, Jiang X, Sun D, Han G, Wang F, Ye M, Wang L, Zou H. 2009. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J Proteome Res* 8:651-661.
- Cho SK, Gao N, Pearce DA, Lehrman MA, Hofmann SL. 2005. Characterization of lipid-linked oligosaccharide accumulation in mouse models of Batten disease. *Glycobiology* 15:637-648.

- Claussen M, Kubler B, Wendland M, Neifer K, Schmidt B, Zapf J, Bräulke T. 1997. Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D. *Endocrinology* 138:3797-3803.
- Cooper JD. 2003. Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis. *Curr Opin Neurol* 16:121-128.
- Cooper JD, Russell C, Mitchison HM. 2006. Progress towards understanding disease mechanisms in small vertebrate models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:873-889.
- Cotman SL, Vrbanac V, Lebel LA, Lee RL, Johnson KA, Donahue LR, Teed AM, Antonellis K, Bronson RT, Lerner TJ, MacDonald ME. 2002. Cln3(Deltaex7/8) knock-in mice with the common JNCL mutation exhibit progressive neurologic disease that begins before birth. *Hum Mol Genet* 11:2709-2721.
- Cuppoletti J, Aures-Fischer D, Sachs G. 1987. The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 899:276-284.
- Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. 1989. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 264:12115-12118.
- Damme M, Morelle W, Schmidt B, Andersson C, Fogh J, Michalski JC, Lübke T. 2010. Impaired lysosomal trimming of N-linked oligosaccharides leads to hyperglycosylation of native lysosomal proteins in mice with alpha-mannosidosis. *Mol Cell Biol* 30:273-283.
- Damme M, Stroobants S, Walkley SU, Lüllmann-Rauch R, D'Hooge R, Fogh J, Saftig P, Lübke T, Blanz J. 2011. Cerebellar alterations and gait defects as therapeutic outcome measures for enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:83-94.
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60:604-617.
- Della Valle MC, Sleat DE, Zheng H, Moore DF, Jadot M, Lobel P. 2011. Classification of subcellular location by comparative proteomic analysis of native and density-shifted lysosomes. *Mol Cell Proteomics* 10:M110006403.
- Dice JF. 2007. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3:295-299.
- Dierks T, Schlotawa L, Frese MA, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B. 2009. Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793:710-725.
- Dom R, Brucher JM, Ceuterick C, Carton H, Martin JJ. 1979. Adult ceroid-lipofuscinosis (Kufs' disease) in two brothers. Retinal and visceral storage in one; diagnostic muscle biopsy in the other. *Acta Neuropathol* 45:67-72.
- Drayna D, Fielding C, McLean J, Baer B, Castro G, Chen E, Comstock L, Henzel W, Kohr W, Rhee L, et al. 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem* 261:16535-16539.
- Dyken PR. 1989. The neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Child Neurol* 4:165-174.

- Eliason SL, Stein CS, Mao Q, Tecedor L, Ding SL, Gaines DM, Davidson BL. 2007. A knock-in reporter model of Batten disease. *J Neurosci* 27:9826-9834.
- Elleder M, Kousi M, Lehesjoki AE, Mole S, Siintola E, Topcu M. 2011. CLN7. The Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (Batten disease). Oxford: Oxford University Press. p 176-188.
- Ezaki J, Wolfe LS, Higuti T, Ishidoh K, Kominami E. 1995. Specific delay of degradation of mitochondrial ATP synthase subunit c in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *J Neurochem* 64:733-741.
- Fearnley IM, Walker JE, Martinus RD, Jolly RD, Kirkland KB, Shaw GJ, Palmer DN. 1990. The sequence of the major protein stored in ovine ceroid lipofuscinosis is identical with that of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive proteolipid of mitochondrial ATP synthase. *Biochem J* 268:751-758.
- Fujiyoshi M, Ozaki M. 2011. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18:13-22.
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. 2010. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* 20:355-362.
- Gao H, Boustany RM, Espinola JA, Cotman SL, Srinidhi L, Antonellis KA, Gillis T, Qin X, Liu S, Donahue LR, Bronson RT, Faust JR, Stout D, Haines JL, Lerner TJ, MacDonald ME. 2002. Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse. *Am J Hum Genet* 70:324-335.
- Gardiner RM. 2000. The molecular genetic basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurol Sci* 21:S15-19.
- Garg S, Sharma M, Ung C, Tuli A, Barral DC, Hava DL, Veerapen N, Besra GS, Hacohen N, Brenner MB. 2011. Lysosomal Trafficking, Antigen Presentation, and Microbial Killing Are Controlled by the Arf-like GTPase Arl8b. *Immunity*.
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W. 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 12:119-131.
- Gergely F, Draviam VM, Raff JW. 2003. The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. *Genes Dev* 17:336-341.
- Gloerich M, Vliem MJ, Prummel E, Meijer LA, Rensen MG, Rehmann H, Bos JL. 2011. The nucleoporin RanBP2 tethers the cAMP effector Epac1 and inhibits its catalytic activity. *J Cell Biol* 193:1009-1020.
- Godbout M, Erlander MG, Hasel KW, Danielson PE, Wong KK, Battenberg EL, Foye PE, Bloom FE, Sutcliffe JG. 1994. 1G5: a calmodulin-binding, vesicle-associated, protein kinase-like protein enriched in forebrain neurites. *J Neurosci* 14:1-13.
- Gopalakrishnan MM, Grosch HW, Locatelli-Hoops S, Werth N, Smolenova E, Nettersheim M, Sandhoff K, Hasilik A. 2004. Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation. *Biochem J* 383:507-515.

- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8:481-488.
- Graeber MB, Streit WJ. 1990. Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1:2-5.
- Haltia M. 2003. The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1-13.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-889.
- Heine C, Koch B, Storch S, Kohlschütter A, Palmer DN, Bräulke T. 2004. Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A. *J Biol Chem* 279:22347-22352.
- Heine C, Quitsch A, Storch S, Martin Y, Lonka L, Lehesjoki AE, Mole SE, Bräulke T. 2007. Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Mol Membr Biol* 24:74-87.
- Heine C, Tyynelä J, Cooper JD, Palmer DN, Elleder M, Kohlschütter A, Bräulke T. 2003. Enhanced expression of manganese-dependent superoxide dismutase in human and sheep CLN6 tissues. *Biochem J* 376:369-376.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Hicke L, Dunn R. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:141-172.
- Hiesberger T, Huttler S, Rohlmann A, Schneider W, Sandhoff K, Herz J. 1998. Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Embo J* 17:4617-4625.
- Hoflack B, Kornfeld S. 1985. Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol Chem* 260:12008-12014.
- Hofman IL, van der Wal AC, Dingemans KP, Becker AE. 2001. Cardiac pathology in neuronal ceroid lipofuscinoses--a clinicopathologic correlation in three patients. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A:213-217.
- Holmberg V, Jalanko A, Isosomppi J, Fabritius AL, Peltonen L, Kopra O. 2004. The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain. *Neurobiol Dis* 16:29-40.
- Hospital V, Prat A, Joulie C, Cherif D, Day R, Cohen P. 1997. Human and rat testis express two mRNA species encoding variants of NRD convertase, a metalloendopeptidase of the insulinase family. *Biochem J* 327 (Pt 3):773-779.
- Huang H, Jedynak BM, Bader JS. 2007. Where have all the interactions gone? Estimating the coverage of two-hybrid protein interaction maps. *PLoS Comput Biol* 3:e214.
- Ichimura Y, Komatsu M. 2010. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol* 32:431-436.

- Isosomppi J, Heinonen O, Hiltunen JO, Greene ND, Vesa J, Uusitalo A, Mitchison HM, Saarma M, Jalanko A, Peltonen L. 1999. Developmental expression of palmitoyl protein thioesterase in normal mice. *Brain Res Dev Brain Res* 118:1-11.
- Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 19:5360-5372.
- Jabs S, Quitsch A, Käkelä R, Koch B, Tyynelä J, Brade H, Glatzel M, Walkley S, Saftig P, Vanier MT, Braulke T. 2008. Accumulation of bis(monoacylglycero)phosphate and gangliosides in mouse models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurochem* 106:1415-1425.
- Jacobs Y, Selden N, Al-Uzri A, Koch T, Vogel H, Huhn S, Uchida N, Palma-Weiszhaus D, Tsukamoto A, Steiner R. 2011. Long-Term Survival and Migration of Allogeneic Human Central Nervous System Stem cells following intracerebral Transplant in Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. ISSCR Annual Meeting Toronto, ON, Canada.
- Jalanko A, Braulke T. 2009. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793:697-709.
- Jalanko A, Vesa J, Manninen T, von Schantz C, Minye H, Fabritius AL, Salonen T, Rapola J, Gentile M, Kopra O, Peltonen L. 2005. Mice with Ppt1Deltaex4 mutation replicate the INCL phenotype and show an inflammation-associated loss of interneurons. *Neurobiol Dis* 18:226-241.
- Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A. 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell* 137:721-735.
- Johnsson N, Varshavsky A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10340-10344.
- Jolly RD, Palmer DN, Dalefield RR. 2002. The analytical approach to the nature of lipofuscin (age pigment). *Arch Gerontol Geriatr* 34:205-217.
- 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* 15:371-383.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-5728.
- Kay GW, Palmer DN, Rezaie P, Cooper JD. 2006. Activation of non-neuronal cells within the prenatal developing brain of sheep with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain Pathol* 16:110-116.
- Kielar C, Maddox L, Bible E, Pontikis CC, Macauley SL, Griffey MA, Wong M, Sands MS, Cooper JD. 2007. Successive neuron loss in the thalamus and cortex in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 25:150-162.
- Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K, Uchiyama Y. 2000.

- Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 20:6898-6906.
- Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y. 2005. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441:880-884.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. 2007. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131:1149-1163.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169:425-434.
- Kopra O, Vesa J, von Schantz C, Manninen T, Minye H, Fabritius AL, Rapola J, van Diggelen OP, Saarela J, Jalanko A, Peltonen L. 2004. A mouse model for Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, CLN5, reveals neuropathology associated with early aging. *Hum Mol Genet* 13:2893-2906.
- Kornfeld S, Mellman I. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 5:483-525.
- Kurze AK, Galliciotti G, Heine C, Mole SE, Quitsch A, Bräulke T. 2010. Pathogenic mutations cause rapid degradation of lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Hum Mutat* 31:E1163-1174.
- Lazzarino DA, Gabel CA. 1988. Biosynthesis of the mannose 6-phosphate recognition marker in transport-impaired mouse lymphoma cells. Demonstration of a two-step phosphorylation. *J Biol Chem* 263:10118-10126.
- Lefrançois S, May T, Knight C, Bourbeau D, Morales CR. 2002. The lysosomal transport of prosaposin requires the conditional interaction of its highly conserved d domain with sphingomyelin. *J Biol Chem* 277:17188-17199.
- Leighton F, Poole B, Beaufay H, Baudhuin P, Coffey JW, Fowler S, De Duve C. 1968. The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J Cell Biol* 37:482-513.
- Levine B, Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42.
- Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 88:887-918.

- Liou W, Geuze HJ, Geelen MJ, Slot JW. 1997. The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J Cell Biol* 136:61-70.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lonka L, Aalto A, Kopra O, Kuronen M, Kokaia Z, Saarma M, Lehesjoki AE. 2005. The neuronal ceroid lipofuscinosis Cln8 gene expression is developmentally regulated in mouse brain and up-regulated in the hippocampal kindling model of epilepsy. *BMC Neurosci* 6:27.
- Lübke T, Lobel P, Sleat DE. 2009. Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta* 1793:625-635.
- Lyly A, Marjavaara SK, Kyttälä A, Uusi-Rauva K, Luro K, Kopra O, Martinez LO, Tanhuanpaa K, Kalkkinen N, Suomalainen A, Jauhiainen M, Jalanko A. 2008. Deficiency of the INCL protein Ppt1 results in changes in ectopic F1-ATP synthase and altered cholesterol metabolism. *Hum Mol Genet* 17:1406-1417.
- Lyly A, von Schantz C, Heine C, Schmiedt ML, Sipila T, Jalanko A, Kyttälä A. 2009. Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biol* 10:83.
- Maccauley SL, Wozniak DF, Kielar C, Tan Y, Cooper JD, Sands MS. 2009. Cerebellar pathology and motor deficits in the palmitoyl protein thioesterase 1-deficient mouse. *Exp Neurol* 217:124-135.
- Minarowska A, Gacko M, Karwowska A, Minarowski L. 2008. Human cathepsin D. *Folia Histochem Cytobiol* 46:23-38.
- Mitchison HM, Bernard DJ, Greene ND, Cooper JD, Junaid MA, Pullarkat RK, de Vos N, Breuning MH, Owens JW, Mobley WC, Gardiner RM, Lake BD, Taschner PE, Nussbaum RL. 1999. Targeted disruption of the Cln3 gene provides a mouse model for Batten disease. The Batten Mouse Model Consortium [corrected]. *Neurobiol Dis* 6:321-334.
- 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.
- Mole SE, Williams RE, Goebel HH. 2005. Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics* 6:107-126.
- Müller-Loennies S, Galliciotti G, Kollmann K, Glatzel M, Bräulke T. 2010. A novel single-chain antibody fragment for detection of mannose 6-phosphate-containing proteins: application in mucopolipidosis type II patients and mice. *Am J Pathol* 177:240-247.
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. 2007. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 13:619-624.
- Ni X, Morales CR. 2006. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 7:889-902.

- Nijssen PC, Brusse E, Leyten AC, Martin JJ, Teepe JL, Roos RA. 2002. Autosomal dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis: parkinsonism due to both striatal and nigral dysfunction. *Mov Disord* 17:482-487.
- Noskova L, Stranecky V, Hartmannova H, Pristoupilova A, Baresova V, Ivanek R, Hulkova H, Jahnova H, van der Zee J, Staropoli JF, Sims KB, Tyynelä J, Van Broeckhoven C, Nijssen PC, Mole SE, Elleder M, Knoch S. 2011. Mutations in DNAJC5, Encoding Cysteine-String Protein Alpha, Cause Autosomal-Dominant Adult-Onset Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Am J Hum Genet* 89:241-252.
- Nyfelner B, Hauri HP. 2007. Visualization of protein interactions inside the secretory pathway. *Biochem Soc Trans* 35:970-973.
- Ostergaard JR, Rasmussen TB, Molgaard H. 2011. Cardiac involvement in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *Neurology* 76:1245-1251.
- 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.
- Pacheco CD, Lieberman AP. 2007. Lipid trafficking defects increase Beclin-1 and activate autophagy in Niemann-Pick type C disease. *Autophagy* 3:487-489.
- Palmer DN, Barns G, Husbands DR, Jolly RD. 1986. Ceroid lipofuscinosis in sheep. II. The major component of the lipopigment in liver, kidney, pancreas, and brain is low molecular weight protein. *J Biol Chem* 261:1773-1777.
- Palmer DN, Fearnley IM, Medd SM, Walker JE, Martinus RD, Bayliss SL, Hall NA, Lake BD, Wolfe LS, Jolly RD. 1989a. Lysosomal storage of the DCCD reactive proteolipid subunit of mitochondrial ATP synthase in human and ovine ceroid lipofuscinoses. *Adv Exp Med Biol* 266:211-222; discussion 223.
- Palmer DN, Martinus RD, Cooper SM, Midwinter GG, Reid JC, Jolly RD. 1989b. Ovine ceroid lipofuscinosis. The major lipopigment protein and the lipid-binding subunit of mitochondrial ATP synthase have the same NH₂-terminal sequence. *J Biol Chem* 264:5736-5740.
- Palmer DN, Oswald MJ, Westlake VJ, Kay GW. 2002. The origin of fluorescence in the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease) and neuron cultures from affected sheep for studies of neurodegeneration. *Arch Gerontol Geriatr* 34:343-357.
- 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* 85:3494-3504.
- Peitsch MC, Boguski MS. 1990. Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol* 2:197-206.

- Pohl S, Mitchison HM, Kohlschütter A, van Diggelen O, Braulke T, Storch S. 2007. Increased expression of lysosomal acid phosphatase in CLN3-defective cells and mouse brain tissue. *J Neurochem* 103:2177-2188.
- Pontikis CC, Cotman SL, MacDonald ME, Cooper JD. 2005. Thalamocortical neuron loss and localized astrocytosis in the Cln3Deltaex7/8 knock-in mouse model of Batten disease. *Neurobiol Dis* 20:823-836.
- Ranta S, Zhang Y, Ross B, Lonka L, Takkunen E, Messer A, Sharp J, Wheeler R, Kusumi K, Mole S, Liu W, Soares MB, Bonaldo MF, Hirvasniemi A, de la Chapelle A, Gilliam TC, Lehesjoki AE. 1999. The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and mnd mutant mice are associated with mutations in CLN8. *Nat Genet* 23:233-236.
- Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131:770-783.
- Reitman ML, Kornfeld S. 1981. Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J Biol Chem* 256:11977-11980.
- Rideout HJ, Lang-Rollin I, Stefanis L. 2004. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2551-2562.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3:1154-1169.
- Rubinsztein DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443:780-786.
- Ruivo R, Anne C, Sagne C, Gasnier B. 2009. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1793:636-649.
- Sakajiri K, Matsubara N, Nakajima T, Fukuhara N, Makifuchi T, Wakabayashi M, Oyanagi S, Kominami E. 1995. A family with adult type ceroid lipofuscinosis (Kufs' disease) and heart muscle disease: report of two autopsy cases. *Intern Med* 34:1158-1163.
- Santavuori P. 1988. Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood. *Brain Dev* 10:80-83.
- Sanz L, Diaz-Meco MT, Nakano H, Moscat J. 2000. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *Embo J* 19:1576-1586.
- Schröder B, Elsasser HP, Schmidt B, Hasilik A. 2007a. Characterisation of lipofuscin-like lysosomal inclusion bodies from human placenta. *FEBS Lett* 581:102-108.
- Schröder B, Wrocklage C, Pan C, Jager R, Kusters B, Schafer H, Elsasser HP, Mann M, Hasilik A. 2007b. Integral and associated lysosomal membrane proteins. *Traffic* 8:1676-1686.

- Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P. 2010. The proteome of lysosomes. *Proteomics* 10:4053-4076.
- Serebriiskii I, Estojak J, Berman M, Golemis EA. 2000. Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques* 28:328-330, 332-326.
- Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. 2008. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17:119-129.
- Shacka JJ, Roth KA. 2007. Cathepsin D deficiency and NCL/Batten disease: there's more to death than apoptosis. *Autophagy* 3:474-476.
- Sharp JD, Wheeler RB, Parker KA, Gardiner RM, Williams RE, Mole SE. 2003. Spectrum of CLN6 mutations in variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mutat* 22:35-42.
- Shefer S, Salen G, Honda A, Batta AK, Nguyen LB, Tint GS, Ioannou YA, Desnick R. 1998. Regulation of rat hepatic 3beta-hydroxysterol delta7-reductase: substrate specificity, competitive and non-competitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation. *J Lipid Res* 39:2471-2476.
- Shin J. 1998. P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. *Arch Pharm Res* 21:629-633.
- Singh G, Charlet BN, Han J, Cooper TA. 2004. ETR-3 and CELF4 protein domains required for RNA binding and splicing activity in vivo. *Nucleic Acids Res* 32:1232-1241.
- Siomi MC, Eder PS, Kataoka N, Wan L, Liu Q, Dreyfuss G. 1997. Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol* 138:1181-1192.
- Sleat DE, Della Valle MC, Zheng H, Moore DF, Lobel P. 2008. The mannose 6-phosphate glycoprotein proteome. *J Proteome Res* 7:3010-3021.
- Sleat DE, Lackland H, Wang Y, Sohar I, Xiao G, Li H, Lobel P. 2005. The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. *Proteomics* 5:1520-1532.
- Sleat DE, Sohar I, Lackland H, Majercak J, Lobel P. 1996. Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem* 271:19191-19198.
- Sleat DE, Sohar I, Pullarkat PS, Lobel P, Pullarkat RK. 1998. Specific alterations in levels of mannose 6-phosphorylated glycoproteins in different neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochem J* 334 (Pt 3):547-551.
- Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Kim KH, Mao Q, Price S, Macauley SL, Sidman RL, Shen MM, Zhao Q, Passini MA, Davidson BL, Stewart GR, Lobel P. 2004. A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration. *J Neurosci* 24:9117-9126.
- Sleat DE, Zheng H, Qian M, Lobel P. 2006. Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics* 5:686-701.

- Snyder M, Huang XY, Zhang JJ. 2008. Identification of novel direct Stat3 target genes for control of growth and differentiation. *J Biol Chem* 283:3791-3798.
- Stenbeck G. 2002. Formation and function of the ruffled border in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 13:285-292.
- Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T. 1994. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 23:408-419.
- Sun P, Sleat DE, Lecocq M, Hayman AR, Jadot M, Lobel P. 2008. Acid phosphatase 5 is responsible for removing the mannose 6-phosphate recognition marker from lysosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16590-16595.
- Tai HC, Schuman EM. 2008. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 9:826-838.
- Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. 2008. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367:616-622.
- Tammen I, Houweling PJ, Frugier T, Mitchell NL, Kay GW, Cavanagh JA, Cook RW, Raadsma HW, Palmer DN. 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.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. 2005. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1:84-91.
- Teixeira CA, Lin S, Mangas M, Quinta R, Bessa CJ, Ferreira C, Sa Miranda MC, Boustany RM, Ribeiro MG. 2006. Gene expression profiling in vLINCL CLN6-deficient fibroblasts: Insights into pathobiology. *Biochim Biophys Acta* 1762:637-646.
- Tiede S, Storch S, Lübke T, Henrissat B, Bargal R, Raas-Rothschild A, Bräulke T. 2005. Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med* 11:1109-1112.
- Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B, Kern H. 1990. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol* 111:329-345.
- 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.
- Tyynelä J, Sohar I, Sleat DE, Gin RM, Donnelly RJ, Baumann M, Haltia M, Lobel P. 2000. A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration. *Embo J* 19:2786-2792.
- Varki AP, Reitman ML, Kornfeld S. 1981. Identification of a variant of mucopolipidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-

- acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7773-7777.
- Vellodi A. 2005. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128:413-431.
- Vissers JP, Langridge JI, Aerts JM. 2007. Analysis and quantification of diagnostic serum markers and protein signatures for Gaucher disease. *Mol Cell Proteomics* 6:755-766.
- vom Dahl S, Mengel E. 2010. Lysosomal storage diseases as differential diagnosis of hepatosplenomegaly. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24:619-628.
- Vuilleminot BR, Katz ML, Coates JR, Kennedy D, Tiger P, Kanazono S, Lobel P, Sohar I, Xu S, Cahayag R, Keve S, Koren E, Bunting S, Tsuruda LS, O'Neill CA. 2011. Intrathecal tripeptidyl-peptidase 1 reduces lysosomal storage in a canine model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Genet Metab*.
- Wada R, Tiffit CJ, Proia RL. 2000. Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10954-10959.
- Waheed A, Pohlmann R, Hasilik A, von Figura K, van Elsen A, Leroy JG. 1982. Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cell patients. *Biochem Biophys Res Commun* 105:1052-1058.
- Walter P, Johnson AE. 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10:87-119.
- Wattiaux R, Wibo M, Baudhuin P. 1963. [Effect of the injection of Triton WR 1339 on the hepatic lysosomes of the rat]. *Arch Int Physiol Biochim* 71:140-142.
- Weimer JM, Benedict JW, Getty AL, Pontikis CC, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA. 2009. Cerebellar defects in a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain Res* 1266:93-107.
- 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* 70:537-542.
- Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, Dyke JP, Ballon D, Heier L, Greenwald BM, Christos P, Mazumdar M, Souweidane MM, Kaplitt MG, Crystal RG. 2008. Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther* 19:463-474.
- Yang Z, Klionsky DJ. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12:814-822.
- Youle RJ, Narendra DP. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:9-14.
- Young JC. 2010. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol* 88:291-300.
- Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H. 2008. Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun* 376:5-9.

Zeng J, Racicott J, Morales CR. 2009. The inactivation of the sortilin gene leads to a partial disruption of prosaposin trafficking to the lysosomes. *Exp Cell Res* 315:3112-3124.

8 Anhang

8.1 Primer

8.1.1 Primer zur Genotypisierung der *nclf* Mäuse

Name	Sequenz 5'-3'
Forward Intron 4	GAACTCACAACTTCCAGAGGGAG
Reverse Exon 4	AGTCTCCGGCTTAGAGTTCTTG

8.1.2 Primer zur Klonierung von Konstrukten im Hefe-2-Hybrid System

Name	Sequenz 5'-3'
CLN6-pBT3N-FOR	TATTAACGGCCATTACGGCCGAGGCGACGCGGGAG
CLN6-pBT3N-REV	TTATATTGGCCGAGGCGGCCCTCAGTGCCGACTGCTGA
DHCR7-pBT3-C-FOR	TAGCCAGGCCATTACGGCCATGGCTGCAAATCGCAA
DHCR7-pBT3-C-REV	CGATCGGGCCGAGGCGGCCCTGAAGATTCCAGGCAGCAGCAG
DHCR7-pPR3-C-FOR	TAGCCAGGCCATTACGGCCGATGGCTGCAAATCGCAA
DHCR7-pPR3-C-REV	CGATCGGGCCGAGGCGGCCGAGAAGATTCCAGGCAGCAG
APOD-pPR3-N-FOR	TAGCCAGGCCATTACGGCCCTTAATGGTGATGCTGCTGCTG
APOD-pPR3-N-REV	CGATCGGGCCGAGGCGGCCGTTACGAGAGCTTGGGGCA
APOD-pPR3-C-FOR	TAGCCAGGCCATTACGGCCGATGGTGATGCTGCTGCTG
APOD-pPR3-C-REV	CGATCGGGCCGAGGCGGCCGACGAGAGCTTGGGGCAGTT
HSP70-pPR3-N-FOR	GCATCGGGCCATTAGGGGCATGTCTGCCCGTGGCCCG
HSP70-pPR3-N-REV	CATGCGGGCCGAGGCGGCCGTTACGCTGACTTGAGTGCAAG
HSP70-pPR3-C-FOR	GCATCGGGCCATTAGGGGCCGATGTCTGCCCGTGGCCCG
HSP70-pPR3-C-REV	CATGCGGGCCGAGGCGGCCGACGCTGACTTGAGTGCAAG
GABRA-pBT3-C-FOR	CGCCGAGGCCATTACGGCCATGGACAATGGAATG
GABRA-pBT3-C-REV	CGCCGAGGCCGAGGCGGCCCTGCCTCTCTTGGTAAA
CLN6-pPR3N-FOR	GCGTTAGGCCATTACGGCCCGATGGAGGCGACGCGGAGG
CLN6-pPR3N-REV	GCGTTAAGGCCGAGGCGGCCGTCAGTGCCGACTGCTGACGTG

8.1.3 Primer zur Klonierung von Konstrukten für den PC-Assay

Name	Sequenz 5'-3'
mCln6_YFP2_for	GC CTC GAG ATC GAT GGT GGC GGT GGC
mCln6_YFP2_rev	GC TCT AGA TTA CTT GTA CAG CTC GTC
mGabra-YFP1-for	CGG ATA TCT ATC GAT GGT GGC GGT GGC
mGabra-YFP1-rev	CTC TCGAGT TTA CTG CTT GTC GGC CAT

8.1.4 Real Time PCR Assays

Name	Sequenz 5'-3'
Cln6	Mm01179411_m1
β -Actin	Mm00607939_s1

Nukleotidsequenzen der Assays sind nicht erhältlich.

8.1.5 Primer zur Vervielfältigung der *Cln6* Northern Blot Sonde

Name	Sequenz 5'-3'
mCln6_for	ATGGAGGCGGCGACGCG
mCln6_rev	TCACTGTTGACTGCTAACGTG
Gapdh_F2	GCCTCTCTTGCTCAGTGTCC
Gapdh_R2	CGCATCTTCTTGTGCAGTGC-

8.1.6 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse (siehe 4.3)

Tabelle 8.1.1. Massenspektrometrische Analyse M6P-haltiger Proteine aus angereicherten Lysosomenfraktionen aus Wildtyp- (wt) oder *nclf*-Hirn

Proteinname	UniProtNr.	Score Wt	Score <i>nclf</i>
		Präparation 1/2	Präparation 1/2
Acid ceramidase	Q9WV54	157/129	129/109
Acid lipase	Q9Z0M5	19/-	-/-
Arylsulfatase A	P50428	31/44	-/31
Arylsulfatase B	P50429	54/50	52/49
Cathepsin B	P10605	133/103	134/104
Cathepsin D	P18242	-/-	43/28
Cathepsin L1	P06797	63/52	53/53
Cathepsin Z	Q9WUU7	80/80	133/64
CREG 1-Protein	O88668	39/-	63/-
Dipeptidylpeptidase	Q9ET22	56/47	56
Epididymis-specific α -mannosidase	O54782	-/-	-/35
Iduronate 2-sulfatase	Q08890	-/-	41/-
Legumain	O89017	53/-	-/-

Proteinname	UniProtNr.	Score Wt	Score <i>nclf</i>
		Präparation 1/2	Präparation 1/2
Lysosomal protective protein	P16675	41/-	53
Mammalian ependymin-related protein 1	Q99M71	179/177	229/204
N-Acetylglucosamine-6-sulfatase	Q8BFR4	67/58	72/77
N-Acylethanolamine-hydrolyzing amidase	acid Q9D7V9	56/98	133/120
Niemann-Pick C1 Protein	O35604	55/-	-/-
Palmitoyl-protein thioesterase 1	O88531	110/174	158/103
Phospholipase A 2 Group XV	Q8VEB4	51/102	77/72
Plasma-Glutamat carboxypeptidase	Q9WVJ3	93/70	159/64
Putative phospholipase B-like 2	Q9DBG4	333/168	338/204
Sialate O-Acetylerase	Q922L0	-/-	-/35
Sphingomyelin phosphodiesterase	Q04519	-/46	-/-
Tripeptidylpeptidase 1	O89023	89/84	101/126
α -Glucosidase	P70699	320/357	338/278
α -Mannosidase	O09159	162/111	111/88
α -N-Acetylgalactosaminidase	Q9QWR8	145/58	146/115
β -Galactosidase	P23780	197/156	313/157
β -Hexosaminidase α -subunit	P29416	93/93	111/90
β -Hexosaminidase β -subunit	P20060	100/56	29/56

Tabelle 8.1.2 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von angereicherten Tritosomenfraktionen aus Wildtyp-(wt) oder *nclf*-Mausleber

Proteinname	UniProtNr	Score Wt	Score <i>nclf</i>
		Präparation 1/2	Präparation 1/2
Acid ceramidase	Q9WV54	46/81	20/-
Acid lipase	Q9Z0M5	166/221	159/204
Acid phosphatase (Acp2)	P24638	61/66	79/54

Proteinname	UniProtNr	Score Wt	Score <i>ncif</i>
		Präparation 1/2	Präparation 1/2
Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	P70158	75/76	72/70
ADP-ribosylation factor-like protein 8B*	Q9CQW2	53/-	37/-
Apolipoprotein E	P08226	71/61	80/60
Cathepsin B	P10605	798/1243	399/494
Cathepsin D	P18242	177/211	135/151
Cathepsin H	P49935	137/87	117/135
Cathepsin L1	P06797	53/63	50/-
Cathepsin O	Q8BM88	76/-	-/-
Cathepsin S	O70370	47/65	40/55
Cathepsin Z	Q9WUU7	52/74	61/75
CREG 1-Protein	O88668	155/154	83/160
Deoxyribonuklease-2- α	P56542	70/69	49/-
Dipeptidylpeptidase 1	P97821	115/120	117/114
Dipeptidylpeptidase 2*	Q9ET22	127/104	152/162
Dipeptidylpeptidase 4*	P28843	64/41	79/-
Epididymis-specific alpha-mannosidase	O54782	64/37	55/37
Gangliosid GM2 activatorprotein	Q60648	126/49	52/92
Glucosylceramidase	P17439	29/109	51/-
Glutamyl aminopeptidase	P16406	-/87	88/-
Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	Q3UDW8	63/-	27/-
Legumain	O89017	159/131	133/98
Lysosomal membrane protein 2	O35114	279/285	195/214
Lysosomal protective protein (Cathepsin A)	P16675	33/31	41/62
Lysosomal protein NCU-G	Q9JHJ3	-/-	40/-
Lysosome-associated membran glycoprotein 1	P11438	66/54	157/-

Proteinname	UniProtNr	Score Wt	Score <i>ncif</i>
		Präparation 1/2	Präparation 1/2
Lysosome-associated membran glycoprotein 2	P17047	91/115	88/115
N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase	Q64191	-/-	-/95
N-Acetylgalactosamine-6-Sulfatase	Q571E4	89/96	93/100
N-Acetylglucosamine-6-sulfatase	Q8BFR4	105/137	92/97
Nicastrin	P57716	33/195	70/100
Niemann-Pick C1 protein	O35604	104/114	87/104
Palmitoyl-protein thioesterase 1	O88531	227/267	116/124
Phospholipase A 2 group XV	Q8VEB4	78/78	-/78
Phospholipase B-like 1	Q8VCI0	73/103	63/-
Plasma glutamat carboxypeptidase	Q9WVJ3	244/370	296/280
Probable lysosomal cobalamin transporter	Q8K0B2	75/76	86/74
Pro-X Carboxypeptidase	Q7TMR0	43/63	18/46
Putative phospholipase B-like 2	Q9DBG4	-/163	41/77
Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	Q920A5	173/123	181/140
Ribonuclease T2	Q9CQ01	78/86	138/77
Sialate O-Acetylerase	Q922L0	76/73	76/-
Sialidase 1	O35657	-/-	45/-
Sulfated glycoprotein 1	Q61207	106/92	103/138
Tartrat-resistant acid phosphatase 5 (Acp5)	Q05117	143/176	183/126
Tripeptidylpeptidase 1	O89023	170/223	138/185
α -Glucosidase, lysosomal	P70699	252/159	178/242
α -Mannosidase 2	P27046	-/-	59/98
α -Mannosidase	O09159	138/196	168/145
α -N-Acetylgalactosaminidase	Q9QWR8	160/167	224/130
β -Galactosidase	P23780	118/110	120/66

Proteinname	UniProtNr	Score Wt	Score <i>ncf</i>
		Präparation	Präparation
		1/2	1/2
β -Glucuronidase	P12265	91/88	35/-
β -Hexosaminidase α -subunit	P29416	43/58	101/102
β -Hexosaminidase β -subunit	P20060	28/82	-/-

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

M.Thelen, S. Fehr, M.Schweizer, T.Braulke und G. Galliciotti. „High expression of Disease-related *Cln6* in the Cerebral Cortex, Purkinje Cells, Dentate Gyrus, and Hippocampal CA1 Neurons“ J. Neurosci. Res., in Druck

M. Thelen*, M.Damme*, C.Hagel, A.M.S. Wong, M.Glatzel, J.D. Cooper, T.Braulke und G.Galliciotti. “Autophagy, Proteasomal Degradation of mutant *Cln6* and Glial Cell Activation are involved in the Neuropathology of *nclf* mice”. Manuskript in Vorbereitung

Vorträge

“CLN6: An Endoplasmatic Reticulum Protein causing Lysosomal Dysfunction”
Lysosomen-Meeting der Universitäten Hamburg und Kiel in Westerland (2010)

Posterpräsentationen

M. Thelen, M.Damme, A.M.S. Wong, J.D. Cooper, K.Kollmann, T.Braulke
„Progressive loss of constitutive autophagy in *Cln6*-deficient brain“.Meeting der
European Molecular Biology Organization, Wien, Österreich (2011)

M. Thelen, M.Damme, A.M.S. Wong, J.D. Cooper, K.Kollmann, T.Braulke
„Progressive loss of constitutive autophagy in *Cln6*-deficient brain“.Meeting der
European Society of Lysosomal Storage Disorders, Helsinki, Finnland (2011)

M.Thelen, M. Damme, K.Kollmann, M.Trusch, H. Schlüter, T. Braulke. “Analysis of the lysosomal proteome in *nclf* mice defective in disease-related CLN6 protein”. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Bonn (2011)

M.Thelen, A.-K.Kurze, S. Fehr, T. Braulke, G. Galliciotti. "Expression and Localization of *CLN6* defective in Neuronal Ceroid Lipofuszinosis".

UKE-Forschertag in Hamburg (2009)

M.Thelen, A.-K.Kurze, S. Fehr, T. Braulke, G. Galliciotti. "Expression and Localization of *CLN6* defective in Neuronal Ceroid Lipofuszinosis". Meeting der European Society of Lysosomal Storage Disorders, Bad Honnef (2009)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst Prof. Dr. Thomas Braulke für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, sowie für die gute Betreuung danken.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. René Lorbiecke, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, diese Arbeit zu begutachten.

Ich möchte Dr. Markus Damme nicht nur für die Durchführung der Immunhistochemie und der Tritosomenanalyse, sondern auch für eine motivierende Zusammenarbeit danken.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Susanne Fehr, Dr. Michaela Schweizer und Dr. Maria Trusch für die In-situ-Hybridisierung, Elektronenmikroskopie bzw. massenspektrometrische Analyse.

Ohne die fortwährende praktische und moralische Unterstützung von Kathrin Kollmann und Sandra Pohl wäre aus dieser Arbeit wohl nix geworden – Danke ! Für einen lustigen Laboralltag möchte ich mich recht herzlich bei allen Arbeitsgruppenmitgliedern, insbesondere Jessica, Annika, Inke, Sandra und Johannes bedanken.

Danke Georgia, für deine Ansichten und Meinungen und Diskussionen – der Diebstahl diverser Laborgegenstände sei dir verziehen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und bei Vladimir bedanken, die mich immer bei allen meinen Entscheidungen unterstützt haben und immer für mich da waren.