

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktorin: Prof. Dr. Ania C. Muntau

**Untersuchungen zu molekularen Grundlagen lysosomaler
Dysfunktion an Zellmodellen der neurodegenerativen
CLN7-Erkrankung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Khandsuren Ariunbat

aus Baganuur

Hamburg 2020

Für meine Großmutter Purevjav

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **01.03.2021**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **PD Dr. Sandra Pohl**

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: **PD Dr. Stephan Storch**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	11
1.1 Biogenese und Funktionen von Lysosomen	11
1.1.1 Struktur lysosomaler Membranen und intrazellulärer Transport lysosomaler Membranproteine	12
1.1.2 Funktionen lysosomaler Membranproteine	13
1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten	15
1.2.1 Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen.....	18
1.2.2 CLN7	21
1.2.3 Cln7-Tiermodelle	23
1.2.4 Die CLN7-Erkrankung	24
2 Zielsetzung	27
3 Material und Methoden.....	28
3.1 Material.....	28
3.1.1 Geräte	28
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.3 Chemikalien, Assays und Kits.....	30
3.1.4 Vektoren	32
3.1.5 Bakterienstamm und Kulturmedien.....	33
3.1.6 Zellen, Reagenzien und Zellkulturmedien	33
3.1.7 Antikörper	34
3.1.8 Sequenzen der verwendeten Primer	35
3.1.9 Assays für quantitative <i>real-time</i> PCR.....	35
3.1.10 Software	37
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.2.1 Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> –Zellen.....	37
3.2.4 Ortsspezifische Mutagenese	38
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese	39

3.2.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	40
3.2.7	Sequenzierung von DNA.....	40
3.2.8	Extraktion von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen und Zellpellets	40
3.2.9	Genotypisierung von Mäusen.....	40
3.2.10	Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen und cDNA-Synthese.....	41
3.2.11	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	42
3.3	Zellbiologische Methoden.....	43
3.3.1	Steriles Arbeiten.....	43
3.3.2	Kultivierung von adhärennten Zelllinien.....	44
3.3.3	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zelllinien.....	44
3.3.4	Konditionierung von Medium	44
3.3.5	Isolierung und Kultivierung von Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen	45
3.3.6	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsvektoren.....	45
3.3.7	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse.....	46
3.4	Biochemische Methoden	46
3.4.1	Ernte und Herstellung von Lysaten aus Zellen.....	46
3.4.2	Herstellung von Membranlysaten aus Zellen	47
3.4.3	Herstellung von TX-100-unlöslichen Lysaten aus Makrophagen	47
3.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	48
3.4.5	Aufbereitung von Medium	48
3.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.4.7	Western-Blot-Analyse	49
3.4.8	Silberfärbung nach Blum von Polyacrylamidgelen.....	51
3.4.9	Kolloidale Coomassie- Färbung von Polyacrylamidgelen	52
3.5	Statistische Auswertung von Messdaten	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Das lysosomale Proteom in <i>Cln7 ko</i> MEF	54
4.1.1	Vergleichende quantitative Proteom-Analyse lysosomaler Proteine in <i>Cln7 ko</i> und Wild-Typ MEFs	55
4.1.2	Validierung der lysosomalen Proteom-Analyse	57
4.1.3	Quantifizierung der mRNA-Expression dysregulierter lysosomaler Proteine in <i>Cln7 ko</i> MEFs	58

4.1.4	Depletion der D- und G-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ H ⁺ ATPase- Komplexes in <i>Cln7 ko</i> Lysosomen.....	59
4.1.5	Depletion von Cln5 in verschiedenen <i>Cln7 ko</i> Zellen und Gehirngewebe.....	60
4.1.6	Unveränderter intrazellulärer Transport von Cln5 in <i>Cln7 ko</i> MEF	61
4.1.7	Depletion von Cln5 durch Cysteinprotease-vermittelten Abbau in <i>Cln7 ko</i> Lysosomen.....	63
4.2	Analyse lysosomaler Kompartimente in primären <i>Cln7 ko</i> Makrophagen	65
4.2.1	Expressionsanalysen lysosomaler Cathepsine und von Cathepsin S-Substraten in <i>Cln7 ko</i> Makrophagen.....	66
4.2.2	Speicherung der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase in <i>Cln7 ko</i> Makrophagen.....	69
4.3	Identifizierung von potenziellen Interaktionspartnern des CLN7-Proteins.....	71
4.3.1	Immunpräzipitation von GFP-CLN7 und massenspektrometrische Analyse der interagierenden Proteine.....	71
4.3.2	Interaktion von Rab7 mit CLN7.....	75
4.3.3	CLN7 bildet keine über kovalente Disulfidbrücken-verbundene Dimere oder Oligomere.....	77
5	Diskussion	80
5.1	Lysosomale Proteinzusammensetzung in <i>Cln7 ko</i> Fibroblasten	80
5.1.1	Depletion von Cln5 in <i>Cln7 ko</i> Lysosomen	83
5.1.2	Phänotypische Gemeinsamkeiten der CLN7-Erkrankung mit anderen NCL-Erkrankungen....	85
5.2	Analyse primärer <i>Cln7 ko</i> Makrophagen	86
5.2.1	Bedeutung von Cathepsinen bei neuroinflammatorischen Prozessen bei der CLN7-Erkrankung.....	90
5.3	Identifizierung unbekannter interagierender Proteine des CLN7	92
5.3.1	Intermolekulare Wechselwirkung von CLN7	94
6	Zusammenfassung.....	96
7	Summary	98
8	Massenspektrometrisch identifizierte lysosomale Proteine.....	99
9	Literaturverzeichnis.....	102
10	Abbildungsverzeichnis.....	117

11	Tabellenverzeichnis.....	118
12	Anhang.....	119
12.1	Lebenslauf.....	119
12.2	Publikationen und Kongressbeitrag.....	120
13	Danksagung	121
14	Eidesstattliche Versicherung.....	122

Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
ANCL	<i>adult neuronal ceroid lipofuscinosis</i>
AP-MS	<i>affinity purification mass spectrometry</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMM	<i>bone marrow microenvironment</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ClC7	Chloridkanal 7
CLIP	<i>Class II Invariant chain Peptid</i>
CSP α	<i>cystein string protein α</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAJC5	<i>DnaJ homolog subfamily C member 5</i>
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E64	<i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino) butan
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Reticulum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HAP1	<i>human haploid cell line</i>
HEK293T	<i>human embryonic kidney cell line</i>
HGSNAT	<i>heparan-alpha-glucosaminide-N-acetyltransferase</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
INCL	<i>infantile neuronal ceroid lipofuscinosis</i>
JAM-B	Junktionales Adhäsionsmolekül B
JNCL	<i>juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis</i>

KCTD7	<i>Potassium channel tetramerization domain-containing protein 7</i>
LAMP	Lysosomen-assoziierte Membranproteine
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Leu	Leupeptin
LIMP	Lysosomales integrales Membranprotein
LMBRD1	<i>limb development membrane protein domain containing 1</i>
LMP	Lysosomales Membranprotein
LSD	<i>lysosomal storage disease</i>
M6P	Mannose 6-Phosphat
M6PR	Mannose 6-Phosphat Rezeptor
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
MFS	<i>major facilitator superfamily</i>
MFSD8	major facilitator superfamily domain containing 8
NCL	Neuronale Ceroid-Lipofuszinose
NP40	Nonidet P40
NPC1	Niemann-Pick Typ- C1 Protein
NPC2	Niemann-Pick Typ- C2 Protein
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OSTM1	Osteopetrose-assoziiertes Membranprotein 1
PAR2	Protease-aktivierter-Rezeptor-2
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pep A	Pepstatin A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SCMAS	Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde
SILAC	Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture
Slpi	<i>Secretory leukocyte protease inhibitor</i>
TEMED	NNN'N'-Tetramethylethylendiamin
TFEB	Transkriptionsfaktor EB

TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TMEM175	Transmembranprotein 175
TRPML1	<i>transient receptor potential cation channel, mucolipin subfamily, member 1</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
vLINCL	<i>variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis</i>
V-Typ H ⁺ ATPase	vakuoläre Protonen-Adenosin-Triphosphatase
w/v	<i>weight per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Biogenese und Funktionen von Lysosomen

Lysosomen wurden erstmalig von Christian de Duve beschrieben (De Duve 1957). Sie sind membranumschlossene Organellen, die ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommen und am Abbau und dem Recycling von intra- und extrazellulären Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren beteiligt sind (de Duve 1983; Kornfeld und Mellman 1989). Die Makromoleküle gelangen durch Makro-Autophagie, Phagozytose oder Endozytose zu den Lysosomen und werden durch mehr als 60 verschiedene lösliche lysosomale Enzyme, u.a. Nukleasen, Proteinasen, Sulfatasen, Lipasen, Peptidasen, Phosphatasen und Glycosidasen abgebaut. Der intralysosomale pH-Wert von 4,5 bis 5,0 wird von einer membranständigen vakuolären H⁺ATPase generiert, die ATP-abhängig Protonen vom Zytosol in die Lysosomen transportiert (Nishi und Forgac 2002). Neben den Lysosomen existieren zelltypspezifisch verschiedene Lysosomen-ähnliche Organellen, wie Melanosomen, MHC-Klasse II-Kompartimente, lytische Granula und Synapsen-ähnliche Mikrovesikel (Dell'Angelica et al. 2000). Darüber hinaus sind Lysosomen und Lysosomen-ähnliche Organellen wichtig für verschiedene physiologische Prozesse wie die Metabolit-Erkennung (Lim und Zoncu 2016), die Genregulation, die Cholesterin-Homöostase (Bi und Liao 2010), den Umbau von Knochengewebe (Zhao 2012), die Speicherung und Signalwirkung von Calcium (Morgan et al. 2011), Antigenpräsentation und Pathogenabwehr (Unanue 1984), Apoptose-Vorgänge (Bursch 2001) und die Regulation des Stoffwechsel- und Energiehaushalts (Settembre et al. 2013).

Die Biogenese von Lysosomen setzt eine kontinuierliche Substitution neusynthetisierter löslicher lysosomaler Enzyme und integraler Membranproteine voraus (Braulke und Bonifacino 2009). Die neusynthetisierten löslichen lysosomalen Proteine werden nach Transport vom endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Golgi-Apparat an OH-Gruppen in Position C6 von ausgewählten terminalen Mannose-Resten mit *N*-Acetylglucosamin-1-Phosphat durch den GlcNAc-Phosphotransferase-Komplex modifiziert (Tiede et al. 2005). Durch Abspaltung der *N*-Acetylglucosamin-Reste durch das *uncovering enzyme* (UCE) im *trans*-Golgi Netzwerk (*TGN*) wird der Mannose 6-Phosphat (M6P) Erkennungsmarker freigelegt. Die M6P-modifizierten lysosomalen Hydrolasen werden von spezifischen Cargo-Rezeptoren, den Mannose 6-Phosphat Rezeptoren (M6PR), im TGN gebunden und vom sekretorischen Pfad abgezwigt. Nach vesikulärem Transport der lysosomalen Hydrolase-M6PR-Komplexe zu endosomalen Kompartimenten erfolgt eine Dissoziation der Komplexe. Während die neusynthetisierten lysosomalen Proteine zu den Lysosomen transportiert werden, gelangen die M6PR durch retrograden vesikulären Transport zum TGN, um weitere Transportrunden zu vermitteln (Braulke und Bonifacino 2009). Für

bestimmte neusynthetisierte lysosomale Proteine existieren alternative Cargo-Rezeptoren, wie das lysosomale integrale Membranprotein 2 (LIMP2) und Sortilin, die M6P-unabhängig sind (Coutinho et al. 2012). Der M6P-unabhängige Transport der β -Glucocerebrosidase zu den Lysosomen wird vermittelt durch LIMP2, während der Cargo-Rezeptor Sortilin wichtig für den lysosomalen Transport der sauren Sphingomyelinase, Prosaposin, Cathepsin D und H ist (Canuel et al. 2008; Lefrancois et al. 2003; Ni und Morales 2006; Reczek et al. 2007). Der Transport von nicht M6P-modifiziertem Cathepsin D und Cathepsin B zu Lysosomen erfolgt nach Sezernierung und Internalisierung via dem Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptor und dem LDL-Rezeptor-ähnlichem Protein 1 (Lrp1, Markmann et al. 2015).

1.1.1 Struktur lysosomaler Membranen und intrazellulärer Transport lysosomaler Membranproteine

Die lysosomale Membran stellt eine strukturelle Barriere zwischen dem sauren intralysosomalen Milieu und dem Zytosol dar (Schwake et al. 2013). Makromoleküle, die für den Abbau bestimmt sind, sowie Metabolite und Ionen, die aus der katabolen Funktion von Lysosomen stammen, müssen durch die ca. 7-10 nm dicke, lysosomale Phospholipid-Membran importiert bzw. exportiert werden. Die lysosomale Membran muss daher viele hochspezialisierte Proteine besitzen, die die verschiedenen Substrate entlang des Protonengradienten transportieren (Schwake et al. 2013). Die Identifizierung der LMPs war aufgrund ihrer geringen Abundanz, der großen Hydrophobizität und der technisch schwierigen Aufreinigung anspruchsvoll. Durch Proteom-Analysen mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung gelang es, zahlreiche neue LMPs zu identifizieren (Chapel et al. 2013; Reczek et al. 2007). Für die Mehrzahl der LMPs ist die Funktion unbekannt, jedoch war es durch Identifizierung von Patienten mit Gendefekten oder durch Analyse von Knockout-Mausmodellen für wenige LMPs möglich, die Funktion (-en) aufzuklären (Tabelle 1, Schröder et al. 2010).

Die Lysosomen-assoziierten Membranproteine (LAMP1 und LAMP2) und die lysosomalen integralen Membranproteine (LIMP1 und LIMP2) stellen schätzungsweise 50% aller Proteine der lysosomalen Membran dar (Eskelinen et al. 2003). Die LAMP-Proteine besitzen in ihren luminalen Domänen mehr als 10 benutzte *N*-Glykosylierungsstellen (Schwake et al. 2013). Die hoch glykosylierten luminalen Domänen der LMPs bilden wahrscheinlich eine 5 bis 12 nm dicke Glykokalix auf der luminalen Seite der lysosomalen Membran (Schwake et al. 2013; Wilke et al. 2012). Die Glykokalix ist vermutlich wichtig für die Stabilität und Integrität der Lysosomen, unter anderem durch den Schutz vor proteolytischem Abbau durch saure Hydrolasen (Fukuda 1991).

Neben den hoch abundanten LAMP- und LIMP-Proteinen kennt man weitere LMPs, wie z. B. den vakuolären H⁺ATPase-Komplex, Ionenkanäle, Ionen-, Lipid-, Cholesterin-, Nucleosid-, Aminosäure- und Zuckertransporter sowie eine große Anzahl von Proteinen mit unbekannter Funktion (Ballabio und Bonifacino 2020). Der intrazelluläre Transport neusynthetisierter LMPs zu Lysosomen erfolgt auf direktem oder indirektem Wege über die Plasmamembran (Braulke und Bonifacino 2009). Nach Biosynthese und *N*-Glykosylierung im ER werden LMPs zum *TGN* transportiert, wo sie anschließend durch vesikulären Transport zur Plasmamembran sortiert werden. An der Plasmamembran werden die LMPs über Clathrin-vermittelte Endozytose in Vesikel verpackt, die mit frühen endosomalen Kompartimenten fusionieren. Der weitere Transport der LMPs von frühen Endosomen zu Lysosomen ist bislang wenig verstanden. Alternativ können LMP auch direkt vom *TGN* über Endosomen ins lysosomale Kompartiment transportiert werden (Hunziker und Geuze 1996). Der zielgerichtete vesikuläre Transport zu Lysosomen wird durch Sortierungssignale in den zytoplasmatischen Domänen der LMPs vermittelt. Man unterscheidet Tyrosin- und Dileucin- basierte Sortierungssignale mit den Konsensus-Sequenzen (YXXØ, bzw. [DE]XXXL([LI], X = beliebige Aminosäure, Ø = Aminosäuren mit hydrophoben Resten) (Bonifacino und Traub 2003).

1.1.2 Funktionen lysosomaler Membranproteine

Lysosomale Membranproteine besitzen wichtige physiologische Funktionen, wie die Azidifizierung des lysosomalen Lumens, die Stabilisierung der lysosomalen Membran, den Transport von Metaboliten (z.B. Aminosäuren, Monosaccharide, Nucleoside, Cholesterin) und Ionen (z. B. Ca²⁺, Cl⁻, K⁺, Fe²⁺, Zn²⁺), den intrazellulären Transport neusynthetisierter löslicher lysosomaler Proteine und die Regulation von Fusionsprozessen zwischen Membranen (Schwake et al. 2013). Neben den hoch exprimierten LAMP- und LIMP-Proteinen existieren mehr als 120 weitere lysosomale Membranproteine und Membranproteinkomplexe (Schröder et al. 2010). Defekte von LMPs führen zu schweren Systemerkrankungen, was deren essenzielle Bedeutung für wichtige physiologische Funktionen unterstreicht. Die ersten, durch Defekte in LMPs mit Transporter-Funktion beschriebenen lysosomalen Speichererkrankungen waren die Salla-Erkrankung (Sialin-Defizienz) und die Zystinose (Cystinosin-Defizienz, Tabelle 1, Ruivo et al. 2009).

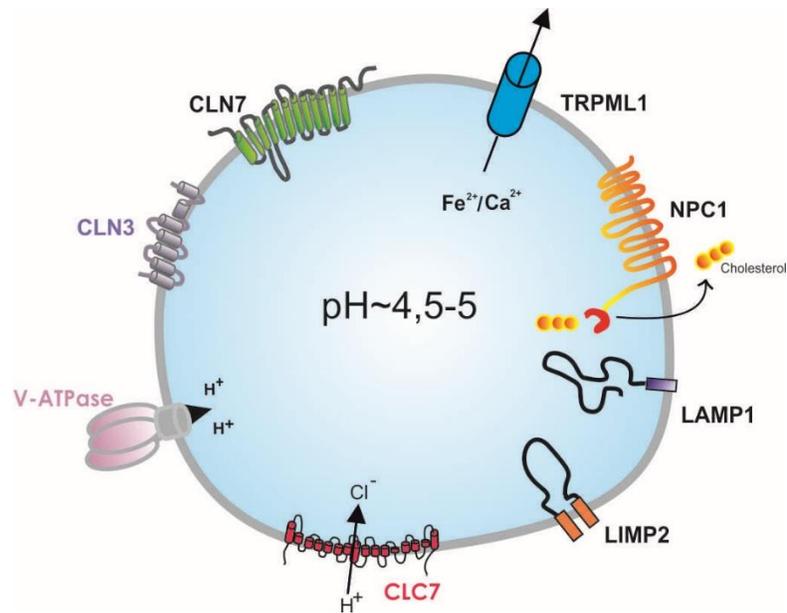


Abbildung 1: Schematische Darstellung ausgewählter lysosomaler Membranproteine.

Darstellung ausgewählter integraler Membranproteine, die für die Struktur, Biogenese und Funktion von Lysosomen wichtig sind. Die Membran-Topologien, Substrate und Transportrichtung des Transient Receptor Potential Cation Kanals 1 (TRPML1), des Chloridkanals 7 (CLC7) und des Niemann-Pick Typ C1-Proteins (NPC1) sind eingezeichnet.

Neben ihrer Bedeutung für die Integrität der lysosomalen Membran haben LAMP- und LIMP-Proteine zahlreiche weitere Funktionen (Abb. 1). Nach kombinierter Ausschaltung von LAMP1 und LAMP2 in Mäusen wurde eine pathologische Akkumulation von nicht verestertem Cholesterin in Lysosomen gefunden, was eine wichtige Funktion der LAMP-Proteine für die Cholesterin-Homöostase vermuten lässt (Eskelinen et al. 2004). LAMP2 ist wichtig für die Reifung von Autophagosomen (Tanaka et al. 2000), Phagosomen (Huynh et al. 2007) und den intrazellulären Cholesterintransport (Schneede et al. 2011). LIMP2 besitzt multiple Funktionen, unter anderem als Cargo-Rezeptor für den biosynthetischen Transport von β -Glucocerebrosidase vom ER zu Lysosomen (Reczek et al. 2007) und als Transporter-Protein für den lysosomalen Export von Cholesterin (Abb. 1, Heybrock et al. 2019). Das Niemann-Pick Typ C1-Protein (NPC1) ist in Kombination mit dem NPC2-Protein für den Transport von Cholesterin vom lysosomalen Lumen durch die Glykokalix zur lysosomalen Membran und dem anschließenden Export von Cholesterin ins Zytosol wichtig (Meng et al. 2020). So führen Mutationen im *NPC1*-Gen zur Akkumulation von Cholesterin und Fettsäuren im lysosomalen System (Brauer et al. 2019).

Eine wichtige Funktion für die Homöostase der lysosomalen Ionenkonzentrationen und Membranpotentiale besitzen die Ionenkanäle TRPML1 (*transient receptor potential cation channel*,

mucolipin subfamily, member 1) für Ca^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} -Ionen, das Transmembranprotein 175 (TMEM175) für K^{+} -Ionen und der CIC-7 Chloridkanal (CIC7) für Cl^{-} Ionen (Xu und Ren 2015).

LMP besitzen eine kritische Bedeutung bei viralen Infektionen. LIMP2 und NPC1 fungieren als Rezeptoren für Filoviren, wie das Ebolavirus, oder für das Enterovirus 71 (Carette et al. 2011; Yamayoshi et al. 2009).

Bisher wurden Defekte in mehr als 10 Genen, die für lysosomale Membranproteine kodieren, bei Patienten identifiziert (Tabelle 1, Ruivo et al. 2009; Schwake et al. 2013). Für die Mehrzahl der LMP sind die Funktionen unbekannt; die Identifizierung neuer Gendefekte bei Patienten und die Analyse von Tiermodellen nach Genausschaltung wird in der Zukunft möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Bedeutung der LMP für lysosomale Biogenese und Funktion führen.

1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten

Henry G. Hers beschrieb im Jahre 1963, dass Morbus Pompe, eine Glykogen-Speichererkrankung, auf einen genetischen Defekt des lysosomalen Enzyms α -Glucosidase zurückzuführen ist, die am Abbau von Glykogen beteiligt ist (Hers 1963).

Damit wurde erstmals beschrieben, dass Gendefekte, die zu einer verminderten Aktivität oder dem vollständigen Funktionsverlust eines lysosomalen Enzyms führen, Ursache für das Auftreten sog. „Speichererkrankungen“ sind.

Lysosomale Speichererkrankungen (im nachfolgenden als *LSDs* = *Lysosomal Storage Diseases* bezeichnet) resultieren aus Mutationen in Genen, die für die Biogenese und Funktion von Lysosomen essenziell sind. Die Mehrzahl der Gene kodiert für lösliche lysosomale Enzyme oder lysosomale Membranproteine. Man kennt ca. 60 verschiedene lösliche lysosomale Proteine und mindestens 125 verschiedene lysosomale Membranproteine (Lübke et al. 2009; Schwake et al. 2013). Es wurden aber auch Patienten mit Defekten in Genen identifiziert, deren extralysosomal lokalisierten Genprodukte für posttranslationale Modifikationen und Sortierung neusynthetisierter lysosomaler Proteine wichtig sind (Schultz et al. 2011). Durch den partiellen oder vollständigen Funktionsverlust der mutanten lysosomalen Proteine akkumulieren nicht abgebaute Makromoleküle oder niedermolekulare Metabolite/Ionen in Lysosomen bei Transporterdefekten und das akkumulierende Speichermaterial kann zum Untergang der Zelle führen. *LSDs* wurden aufgrund der chemischen Zusammensetzung des Speichermaterials unterteilt in Lipidosen, Mukopolysaccharidosen, Glykogenosen, Gangliosidosen, Mucopolidosen und neuronale Lipofuszinosen (Mehta und Winchester 2013). Die Inzidenz aller *LSDs* wird weltweit auf 1:5000 geschätzt (Fuller et al. 2006). Die tatsächliche Inzidenz dürfte aufgrund falscher

Diagnosen oder nicht diagnostizierter Patienten jedoch weitaus höher liegen. Die Mehrzahl der identifizierten *LSDs* werden autosomal-rezessiv vererbt (Fuller et al. 2006). Ausnahmen bilden die *LSDs* Morbus Fabry (α -Galaktosidase A-Defizienz, MIM#: 301500) und Morbus Hunter/Mukopolysaccharidose Typ II (Iduronat-2-Sulfatase-Defizienz, MIM#: 309900), die X-chromosomal-rezessiv vererbt werden sowie die Danon-Krankheit (LAMP2-Defizienz, MIM#: 300257) und die CLN4-Erkrankung (CSP α -Defizienz, MIM#: 162350), die X-chromosomal-dominant bzw. autosomal-dominant vererbt werden (Adam et al. 2006; Nishino et al. 2000; Noskova et al. 2011; Tylki-Szymanska 2014).

Tabelle 1: Durch LMP-Defekte verursachte LSDs (modifiziert nach Schwake et al. 2013). MIM: Mendelian Inheritance in Man

LMP	(mögliche) Funktion	Assoziierte Krankheit	Referenz
CLN3	Regulation der lysosomalen Größe, Regulation des lysosomalen pH-Wertes, Transport von Arginin, lysosomale Ca ²⁺ -Homöostase	CLN3-Erkrankung, juveniler Phänotyp MIM# 204200	(Lerner 1995)
CLN7	Metabolit-Transport (?)	CLN7-Erkrankung, spät-infantiler Phänotyp MIM# 610951	(Siintola et al. 2007)
CIC-7/OSTM1 (Osteopetrose-assoziiertes Membranprotein 1)	Protonen- und Anionen (Cl ⁻)-Transport	Infantile maligne Osteoporose MIM# 611490	(Kornak et al. 2001)
Cystinosin	H ⁺ - und L-Cystein-Symport	Cystinose MIM# 219800	(Town et al. 1998)
HGSNAT (<i>heparan-alpha-glucosaminide-N-acetyltransferase</i>)	Transfer von Acetylresten auf terminale N-Glucosaminreste von Heparin oder Heparansulfat	Mukopolysaccharidose Typ IIIC MIM# 252930	(Fan et al. 2006; Hrebicek et al. 2006)
LAMP2	Autophagie, lysosomale Fusion und Transport	Danon-Erkrankung MIM# 300257	(Nishino et al. 2000)
LIMP2/SCARB2	Chaperon und Transport von β -Glucocerebrosidase, Export von Cholesterin	<i>Action-myoclonus-renal-failure</i> Syndrom MIM# 254900	(Berkovic et al. 2008; Heybrock et al. 2019)
LMBRD1 (<i>limb development membrane protein domain containing 1</i>)	Export von Cobalamin	Cobalamin F-Typ Erkrankung MIM# 277380	(Rutsch et al. 2009)
NPC1	Lipid-, Cholesterin- und Ca ²⁺ -Transport	Niemann-Pick Typ C MIM# 257220	(Carstea et al. 1997)
Mucolipin 1	Kationenkanal	Mukolipidose Typ IV MIM# 252650	(Bargal et al. 2000; Sun et al. 2000)
Sialin	Export von Sialinsäure und sauren Hexosen, Import von Asparagin und Glutamin	Salla-Erkrankung MIM# 604369	(Verheijen et al. 1999)

1.2.1 Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen

Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL), umgangssprachlich auch Kinderdemenz genannt, bilden eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen lysosomalen Speichererkrankungen (Schulz et al. 2013). Die NCL sind die häufigste Ursache für Neurodegeneration im Kindesalter. Die Erkrankungen werden durch Defekte in 13 unterschiedlichen NCL-Genen verursacht und werden bis auf die autosomal-dominant vererbte CLN4-Erkrankung mit adultem Phänotyp autosomal-rezessiv vererbt (Tabelle 2, Mukherjee et al. 2019). Die NCL-Gene kodieren für lösliche lysosomale Enzyme, Membranproteine des ER und des Lysosoms, ER-Cargo Rezeptoren sowie zytosolische und sekretorische Proteine, die für lysosomale Biogenese und Funktion wichtig sind (Mole und Cotman 2015). Die CLN6- und CLN8-Membranproteine bilden im ER einen Komplex, der für die Rekrutierung und den anschließenden CLN8-vermittelten Transport neusynthetisierter löslicher lysosomaler Proteine zum Golgi-Apparat wichtig ist (Bajaj et al. 2020; di Ronza et al. 2018). Die Krankheitsbezeichnung leitet sich von der charakteristischen Speicherung eines autofluoreszierenden, wachsartigen Ceroid-Lipofuszinmaterials in Neuronen und in anderen Zelltypen ab, die bei allen NCL-Formen zu finden ist (Kollmann et al. 2013). Gemeinsame klinische Merkmale der NCL sind Retinopathie mit finaler Erblindung, Epilepsie, progredienter geistiger sowie körperlicher Abbau und eine vom Gendefekt-abhängige verkürzte Lebenserwartung (Schulz et al. 2013). Die Mehrheit der NCL-Patienten mit Ausnahme der kongenitalen und infantilen Formen ist bei der Geburt unauffällig und die frühkindliche Entwicklung ist altersentsprechend (Santavuori et al. 2001).

Die Klassifizierung der NCL erfolgte früher klinisch aufgrund phänotypischer Unterschiede und dem Alter bei Manifestation der ersten Symptome. Man unterschied kongenitale, infantile, spät-infantile, juvenile und adulte Verlaufsformen (Tabelle 2). Die Klassifizierung erfolgt heute auf genetischer Grundlage. Hierbei wird die NCL-Erkrankung durch Angabe des mutierten Gens in Kombination mit dem klinischen Phänotyp kategorisiert (Tabelle 2, Williams und Mole 2012). Die Inzidenz der NCL wird in Deutschland auf 1:30000 Lebendgeborenen geschätzt (http://ncl-netz.de/patienten_info.htm). Die CLN3-Erkrankung mit juvenilem Phänotyp ist die häufigste NCL-Form in Deutschland. 85% der CLN3-Patienten mit juvenilem Phänotyp besitzen eine Deletion der Exone 7 und 8 im CLN3-Gen, die auf Proteinebene zu einer Leserahmenverschiebung und einer Verkürzung des CLN3-Proteins mit Retention im ER führt (Cotman und Staropoli 2012; Järvelä et al. 1999).

Tabelle 2: Übersicht über die NCL-Erkrankungen (modifiziert nach Mukherjee et al. 2019)

<i>NCL-Gen</i>	<i>Protein</i>	<i>Subzelluläre Lokalisation</i>	<i>Funktion</i>	<i>Phänotypen</i>
<i>CLN1</i>	Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1)	lysosomales Lumen	Palmitoyl-Protein-Thioesterase	INCL, LINCL, JNCL, ANCL
<i>CLN2</i>	Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1)	lysosomales Lumen	Serin-Protease	LINCL, JNCL
<i>CLN3</i>	CLN3	lysosomale Membran, präsynaptische Vesikel	unbekannt	JNCL
<i>CLN4</i>	CSP α , (<i>Cystein string protein α</i>), DNAJC5	Zytosol, assoziiert mit vesikulären Membranen	beteiligt an Exozytose und Endozytose als HSC70 Ko-Chaperon	ANCL
<i>CLN5</i>	CLN5	lysosomales Lumen	unbekannt	LINCL, JNCL, ANCL
<i>CLN6</i>	CLN6	ER-Membran	Rekrutierung lysosomaler Enzyme im ER im Komplex mit CLN8	LINCL, ANCL
<i>CLN7/ MFSD8</i>	CLN7	lysosomale Membran	unbekannt	LINCL, JNCL
<i>CLN8</i>	CLN8	ER/ <i>cis</i> Golgi-Membranen	Cargo-Rezeptor für lösliche lysosomale Proteine	LINCL, JNCL
<i>CLN10</i>	Cathepsin D (CTSD)	lysosomales Lumen, extrazellulär	Aspartyl-Protease	Kongenitale NCL, LINCL, JNCL, ANCL
<i>CLN11</i>	Progranulin	extrazellulär	unbekannt	ANCL
<i>CLN12</i>	ATPase 13A2	lysosomale Membran	unbekannt	JNCL
<i>CLN13</i>	Cathepsin F (CTSF)	lysosomales Lumen	Thiol Protease	ANCL
<i>CLN14</i>	KCTD7 (<i>Potassium channel tetramerization domain-containing protein 7</i>)	Zytosol; partiell an Membranen assoziiert.	unbekannt	INCL, LINCL

INCL: infantile NCL, LINCL: spät-infantile NCL, JNCL: juvenile NCL; ANCL: adulte NCL

Die Krankheitspathologie ist durch einen fortschreitenden neuronalen Verlust gekennzeichnet, der zu einer Atrophie des Zentralnervensystems führt, die in der Retina, im Cerebrum und Cerebellum sehr

ausgeprägt ist. Bei den NCL akkumulieren ubiquitär autofluoreszierende Ceroid-Lipofuszin-haltige Lipopigmente, (Kohlschütter und Goebel 1997). Im Gegensatz zu anderen lysosomalen Speichererkrankungen, bei denen die biochemische Zusammensetzung des Speichermaterials spezifisch für den Gendefekt ist, sind die NCL nicht durch die Beschaffenheit und Ultrastruktur des Speichermaterials unterscheidbar (Palmer 2015). Somit sind Rückschlüsse von der biochemischen Zusammensetzung und der Ultrastruktur des Speichermaterials auf die Funktion des defekten Proteins nicht möglich. Isoliertes Speichermaterial, das gesunden Zellen zugeführt wurde, konnte auch nicht von diesen abgebaut werden, was darauf hindeutete, dass es sich um ein sekundäres Speichermaterial handelt (Elleder et al. 1995). Aufgrund der Ultrastruktur in elektronenmikroskopischen Analysen wird das Speichermaterial morphologisch in sogenannte granuläre Einschlüsse (granular osmiophilic deposits (GRODs)) und Einschlüsse mit heterogenen Strukturen (kurvilineare, geradlinige oder Fingerabdruck-Profile) unterschieden. GRODs werden in Biopsien von CLN1-, CLN4- und CLN10-Patienten detektiert, während Einschlüsse mit heterogenen Strukturen in CLN2-, CLN3-, CLN5-, CLN6-, CLN7-, CLN8-, CLN10- und CLN14-Patienten gefunden wurden (Radke et al. 2015). Biochemische Untersuchungen zeigten, dass die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase (SCMAS) die Hauptproteinkomponente des granulären Speichermaterials darstellt, während die Sphingolipid-Aktivatorproteine A und D (Saposine) in Einschlüssen mit heterogenen Strukturen gefunden wurden (Palmer 2015; Radke et al. 2015).

Bisher wurden mehr als 490 verschiedene Patientenmutationen in den 13 bekannten NCL-Genen identifiziert und kategorisiert (<https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/mutation-and-patient-database>). Die Mehrzahl der NCL-Erkrankungen ist bislang nicht kausal heilbar. Die therapeutische Effizienz experimenteller Therapien, wie Stammzell-, Enzymersatz-, Gen- und small molecule Therapien wurde an etablierten NCL-Tiermodellen mit einigen vielversprechenden Ergebnissen gezeigt (Johnson et al. 2019; Kohlschütter et al. 2019; Mole et al. 2019). So wurde 2017 erstmalig Cerliponase-Alfa, ein rekombinantes Proenzym der humanen Tripeptidyl-Peptidase 1 zur Behandlung von CLN2-Patienten weltweit zur intraventrikulären Enzymersatztherapie (EET) zugelassen (Markham 2017). Phase I/II Studien (NCT01907087) zeigten, dass die intrathekale Injektion von Cerliponase-Alfa zu einer signifikant geringeren Progression der motorischen und sprachlichen Verschlechterung bei CLN2-Patienten im Vergleich zu historischen, nicht-behandelten Kontrollpatienten führte (Schulz et al. 2018). Die Enzymersatztherapie ist jedoch nur bei Patienten mit Defekten in Genen, die für lösliche lysosomale Proteine (CLN1, CLN2, CLN5, CLN10, CLN11 und CLN13) kodieren, als therapeutische Option möglich. Die therapeutische Effizienz von *small molecule* oder Gentherapien wird zurzeit für NCLs mit

Defekten in Transmembranproteinen (CLN3, CLN6, CLN7, CLN8 und CLN12) getestet (Kohlschütter et al. 2019; Mole et al. 2019).

1.2.2 CLN7

Da im Mittelpunkt dieser Dissertationsschrift die Analyse eines Zellmodells der CLN7-Erkrankung und die biochemische Charakterisierung des CLN7-Proteins standen, werden im Nachfolgenden auf die molekularen Grundlagen sowie klinische und neuropathologische Merkmale der CLN7-Erkrankung eingegangen.

CLN7/MFSD8-Gen

Der humane *CLN7/MFSD8*-Genlocus liegt auf dem Chromosomen 4q28.1-q28.2. Die Lage des Genlocus wurde mit Hilfe von SNP-Scan (Single Nucleotide Polymorphism) und Homozygotie-Mapping von 10 betroffenen Familien mit überwiegend türkischem Ursprung identifiziert (Siintola et al. 2007). Die genomische DNA des *CLN7/MFSD8*-Gens ist 48.24 kb groß und enthält 13 Exons (<https://www.omim.org/entry/611124>). Die genomische *CLN7/MFSD8*-Sequenz ist in Vertebraten hochkonserviert (Siintola et al. 2007). Northern-Blot-Analysen zeigten, dass die *CLN7/MFSD8*-mRNA, deren Haupt-Transkript ungefähr 5 kb groß ist, beim Menschen ubiquitär exprimiert wird, mit höchsten Konzentrationen im Herzen, in der Leber, in der Skelettmuskulatur und im Pankreas (Siintola et al. 2007). *Real-time* PCR-Analysen kultivierter primärer Neurone, Mikrogliazellen und Astrozyten aus der Ratte zeigten, dass die *Cln7* mRNA-Expression in Neuronen 12- bzw. 6- fach höher war als in Mikrogliazellen bzw. Astrozyten (Sharifi et al. 2010).

Das *CLN7/MFSD8*-Gen enthält eine Sequenz für *MFS* (*major facilitator superfamily*) (Siintola et al. 2007). Bislang wurden über 100 humane *MFS*-Transporter-Gene identifiziert. Sie kodieren für sekundär aktive Transporter, die eine Vielzahl von Substraten wie Nährstoffe, Metabolite und Signalmoleküle durch die Membran bewegen (Pao et al. 1998). *MFS*-Transporter sind mit zahlreichen Krebs- und Stoffwechselerkrankungen assoziiert und werden daher als potenzielle Targets für Therapien angesehen (Quistgaard et al. 2016). Darüber hinaus enthält der Promoter des *CLN7/MFSD8*-Gens ein *CLEAR* (*C*oordinated *L*ysosomal *E*xpression *A*nd *R*egulation) -Element mit der Sequenz GTCAGGTGCG, welches eine Bindungsstellen für TFEB (Transkriptionsfaktor EB) darstellt. Die Mehrzahl der Gene, die für lysosomale Biogenese und Funktion sowie Autophagie wichtig sind, wird durch TFEB reguliert (Sardiello et al. 2009).

CLN7-Protein

CLN7 ist ein polytopes, lysosomales Membranprotein mit 12 Transmembran-Domänen bestehend aus 518 Aminosäuren und zytosolisch gelegenen C- und N-terminalen Enden. Das geschätzte Molekulargewicht der nicht-glykosilierten Form beträgt 58 kDa (Siintola et al. 2007).

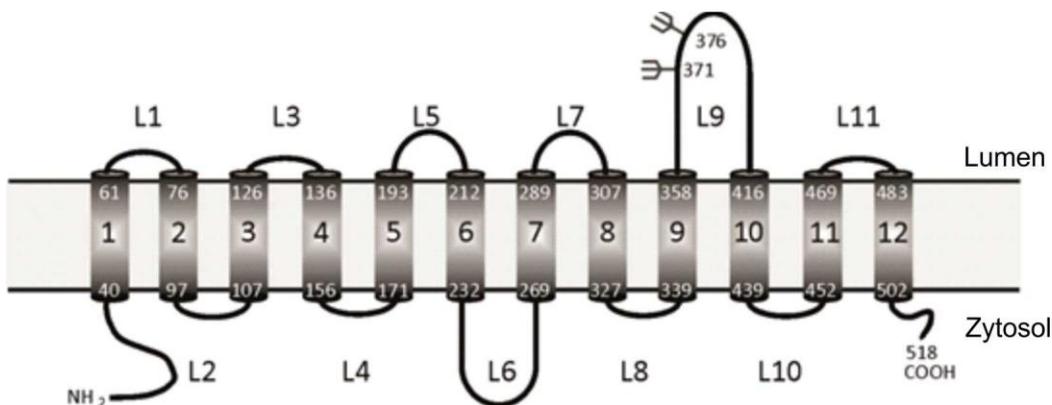


Abbildung 2: Schematische Darstellung des CLN7-Proteins. Die 12 Transmembrandomänen sowie 11 Schleifen (L1-L11) mit den N-Glykosylierungsstellen N371 und N376 in L9 sind eingezeichnet.

Die große Luminal-Schleife L9 von CLN7 enthält 2 benutzte N-Glykosylierungsstellen in den Positionen N371 und N376, die für den intrazellulären Transport von CLN7 zu Lysosomen nicht wichtig sind (Steenhuis et al. 2010). Ein N-terminales lysosomales Sortierungssignal, das ein Dileucin-Motiv enthält, wurde 2010 von 2 Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert (Sharifi et al. 2010; Steenhuis et al. 2010). Pull-Down-Experimente zeigten, dass das N-terminale Dileucin-Motiv von CLN7 mit dem tetrameren Adaptorprotein 1 (AP1) *in vitro* interagiert (Sharifi et al. 2010). CLN7 wird sowohl direkt vom Golgi-Apparat zum endo-lysosomalen Kompartiment als auch indirekt über die Plasmamembran mit anschließender Clathrin-vermittelter Endozytose zu Lysosomen sortiert (Sharifi et al. 2010; Steenhuis et al. 2010). In den Lysosomen wird CLN7 durch die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin L in Schleife L9 zu einem 36 kDa großen Fragment gespalten (Steenhuis et al. 2012).

Die Funktion von CLN7 ist unbekannt. Sequenzhomologien zur Medikament/H⁺-Antiporter Gruppe DHA1 der MFS (*Major Facilitator Super Family*)-Transporter lassen vermuten, dass CLN7 ein lysosomaler Transporter sein könnte (Pao et al. 1998). MFS-Transporter sind sekundär aktive Transporter von Zuckern, Aminosäuren, Medikamenten, Nucleosiden, sowie organischen und anorganischen Kationen und Anionen (Reddy et al. 2012). CLN7 gehört dabei zu einer Gruppe von MFS-Transportern, die entweder an der Plasmamembran und/oder in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Perland et al. 2017). Eine mögliche Erklärung für lysosomale Speicherung bei CLN7-Defekten wäre die Akkumulation einer oder mehrerer monomerer CLN7-Substrate, die nicht aus den

Lysosomen in das Zytosol exportiert werden können. Alternativ könnte CLN7 auch für den Import von Substraten in die Lysosomen wichtig sein.

1.2.3 Cln7-Tiermodelle

Um die Krankheitsmechanismen bei der CLN7-Erkrankung besser zu verstehen, wurden Phänotypen von durch *gene targeting* erzeugten Fliegen- und Maus-Modellen (Brandenstein et al. 2016; Connolly et al. 2019; Damme et al. 2014) als auch von natürlich vorkommenden Hunde-, Katzen- und Affenmodellen untersucht (Ashwini et al. 2016; Faller et al. 2016; Guevar et al. 2020; Guo et al. 2015; McBride et al. 2018). 2016 wurde durch Deletion von Exon 2 des orthologen *Mfsd8/Cln7*-Gens der Maus ein Modell für die CLN7-Erkrankung generiert, das die wichtigsten pathologischen Merkmale der Erkrankung zeigte (Brandenstein et al. 2016). Die *Cln7 ko* Mäuse sind lebensfähig und fertil. Ab einem Alter von 8 Monaten wurden neurologische Ausfälle wie Myoklonien und Hinterbein-Paresen gefunden. Ferner war die Mortalität der *Cln7 ko* Mäuse im Vergleich zu altersgleichen WT-Mäusen erhöht (Brandenstein et al. 2016). Die altersabhängige Akkumulation von autofluoreszierendem Einschlüssen, die Speicherung von SCMAS und Saposin D sowie die erhöhte Expression lysosomaler Cathepsine B, D und Z im Gehirn der *Cln7 ko* Mäuse ließen die Schlussfolgerung zu, dass eine CLN7-Defizienz zu lysosomaler Dysfunktion führt (Brandenstein et al. 2016). Ferner waren in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten aus *Cln7 ko* Cerebella auch typische Zelleinschlüsse mit sog. *Fingerabdruck-, rectilinearen-* und *kurvilinearen-* Profilen in Purkinje-Zellen zu finden (Brandenstein et al. 2016). Durch MRI-Analysen wurde Neurodegeneration im Cerebrum und Cerebellum im fortgeschrittenen Alter der *Cln7 ko* Mäuse gezeigt. In der Retina der *Cln7 ko* Mäuse wurde eine fortschreitende Degeneration von Photorezeptor-Zellen, die von einer reaktiven Astroglie und Mikroglie und einer Akkumulation von Speichermaterial begleitet wurden, detektiert (Jankowiak et al. 2016). Aufgrund der Speicherung von neuronalen p62- und Ubiquitin-positiven Protein-Aggregaten im ZNS ist es möglich, dass auch die Makroautophagie in der Retina in Abwesenheit von CLN7 gestört ist. Es ist wahrscheinlich, dass die lysosomale Dysfunktion und die resultierende Störung der Makroautophagie zur Neurodegeneration im Cerebellum, Cerebrum und der Retina beitragen (Brandenstein et al. 2016).

Ebenso ließen sich die typischen neurologischen Symptome wie zunehmende Sehschwäche, Tremor, Ataxie und die Neurodegeneration auch bei den natürlich vorkommenden CLN7-Tiermodellen wie bei den japanischen Makake-Affen, chinesischen Schopfhunden, Chihuahuas und Katzen beobachten (Abb.2, Ashwini et al. 2016; Faller et al. 2016; Guevar et al. 2020; Guo et al. 2015; Abb. 2, McBride et al. 2018).

Tiermodelle stellen eine wichtige Säule zum besseren Verständnis der Pathomechanismen der NCLs und der präklinischen Entwicklung und Testung wirksamer Therapien für die CLN7- und andere CLN-

Erkrankungen dar (Faller et al. 2015). Der Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit der intracerebrospinalen Injektion rekombinant hergestellter TPP1 an einem Hundemodell der CLN2-Erkrankung stellte die Grundlage für klinische Studien an CLN2-Patienten dar (Schulz et al. 2018; Vuilleminot et al. 2015). Nach Auswertung der klinischen Studien wurde Cerliponase Alfa 2017 als Medikament zur Behandlung der CLN2-Erkrankung in den USA und der EU zugelassen (Markham 2017; Schulz et al. 2018).

1.2.4 Die CLN7-Erkrankung

Die CLN7-Erkrankung gehört zur Gruppe der spät-infantilen NCLs (LINCLs) und wird autosomal rezessiv vererbt. Aufgrund der Erstbeschreibung von Patienten mit *CLN7/MFSD8*-Gendefekten in der Türkei wurde die CLN7-Erkrankung als türkische Variante der LINCLs bezeichnet, mittlerweile wurden jedoch weitere CLN7-Patienten im Iran, Israel, Saudi-Arabien, Ägypten, Rumänien, Bulgarien, Albanien, Tschechische Republik, Italien, Spanien, Niederlande, Grossbritannien, Kanada, USA, Argentinien, China und Indien identifiziert (<https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/mutation-and-patient-database>, Aiello et al. 2009; Aldahmesh et al. 2009; Bauwens et al. 2020; Craiu et al. 2015; Hosseini Bereshneh und Garshasbi 2018; Kousi et al. 2012; Kousi et al. 2009; Kozina et al. 2018; Mandel et al. 2014; Patino et al. 2014; Ren et al. 2019; Roosing et al. 2015; Siintola et al. 2007; Stogmann et al. 2009; Zare-Abdollahi et al. 2019). Die CLN7-Erkrankung mit spät-infantilem Phänotyp (MIM#610951) manifestiert sich erstmalig im Alter von 1,5 bis 5 Jahren mit Entwicklungsregression und epileptischen Anfällen (Kousi et al. 2009). Zu den weiteren Symptomen zählen Sprachverlust, motorische und mentale Retardierung, Myoklonien und zerebellare Ataxie. Die mittlere Lebenserwartung der CLN7-Patienten ist mit 11,5 Jahren stark verkürzt (Kousi et al. 2009). Magnetresonanztomographische Aufnahmen des Gehirns von CLN7-Patienten zeigten eine Atrophie des Groß- und Kleinhirns, sowie ein periventrikuläre Abnahme der weißen Gehirnmasse (Kousi et al. 2009). Bis 2017 wurden 39 verschiedene Mutationen im humanen *CLN7/MFSD8*-Gen identifiziert; am häufigsten ist die *missense*-Mutation p.T294K (Abb. 3, <https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/mutation-and-patient-database>). Die *missense*-Mutationen sind in der gesamten CLN7-Sequenz sowohl in luminalen, zytosolischen und Transmembran-Domänen lokalisiert (Abb. 3).

Eine Kumulation von *missense*-Mutationen existiert in der zweiten zytosolischen Schleife (Aminosäuren 157-170) und in der Transmembrandomäne 11 (Aminosäuren 452-469) von CLN7.

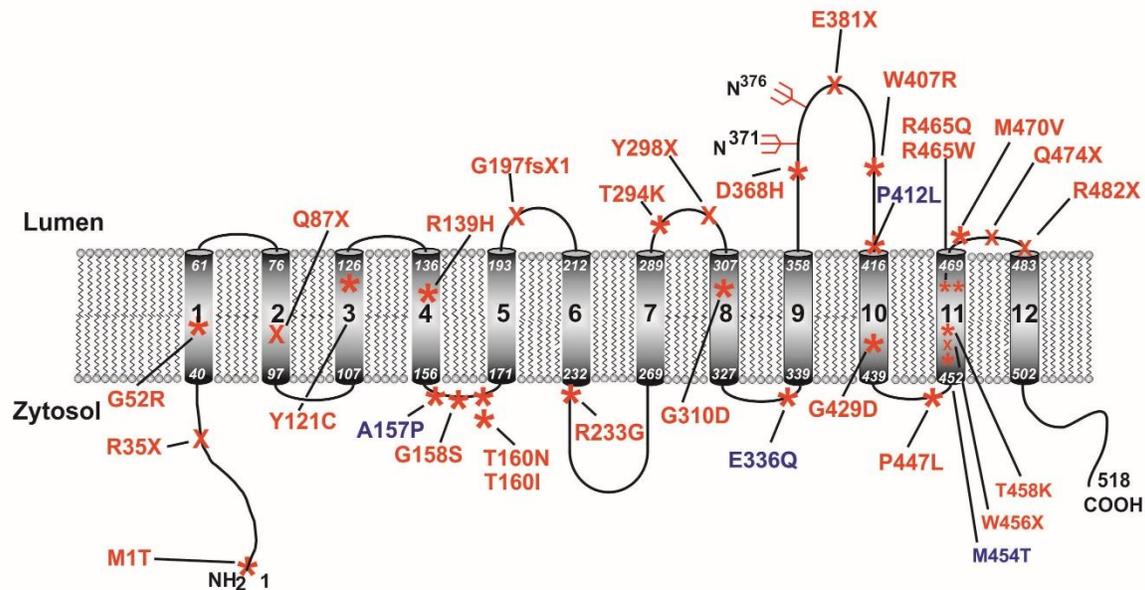


Abbildung 3: Lokalisation der identifizierten CLN7- Patientenmutationen im CLN7- Protein. Positionen der *missense*- (mit *gekennzeichnet) und *nonsense*- (mit X gekennzeichnet) -Mutationen sind in rot eingezeichnet. Mutationen, die mit einem milderen Krankheitsverlauf oder mit isolierter ophthalmologischer Symptomatik assoziiert waren, sind in blau gekennzeichnet.

CLN7-Patienten mit spät-infantilem Phänotyp zeigen trotz des variablen zeitlichen Beginns der ersten Symptomatik einen relativ uniformen Krankheitsverlauf, was mit einem vollständigen Funktionsverlust der mutierten CLN7-Proteine erklärbar wäre (Kousi et al. 2012). Neben dem spät-infantilen Phänotyp wurde auch ein CLN7-Patient mit juvenilem Phänotyp beschrieben. Bei diesem CLN7-Patienten wurde die *missense*-Mutation p.A157P im CLN7-Protein identifiziert (Abb. 3) und ein milderer Krankheitsverlauf beschrieben: Sehschwäche mit 11 Jahren, motorische Einschränkungen mit 24 Jahren, epileptische Anfälle mit 25 Jahren und Benutzung eines Rollstuhls mit 39 Jahren (Kousi et al. 2009). Ferner existieren adulte Patienten mit CLN7-Mutationen, bei denen eine isolierte Zapfen-Stäbchen-Dystrophie bzw. Makula-Dystrophie ohne Auftreten der typischen NCL-Symptomatik beschrieben wurde (MIM#616170). Bei diesen CLN7-Patienten mit adultem Phänotyp wurden die Mutationen p.E336Q, p.P412L und p.M454T und identifiziert (Abb. 3, Roosing et al. 2015; Zare-Abdollahi et al. 2019). Es ist zu vermuten, dass die *missense*-Mutationen, die mit einem milderen Krankheitsverlauf verbunden sind, nur zu einem partiellen Funktionsverlust des CLN7-Proteins führen.

Bei der CLN7-Erkrankung sind in vielen Geweben autofluoreszierende Ceroid-Lipopigmente zu detektieren. Der elektronenmikroskopische Nachweis von Speichermaterial in Hautbiopsien in

Kombination mit humangenetischen Analysen und klinischen Untersuchungen erlauben die Diagnose einer CLN7-Erkrankung (Radke et al. 2015). In elektronenmikroskopischen Analysen von Biopsien aus der Haut, Bindehaut und dem Rektum wird bei allen NCL Speichermaterial detektiert. Man unterscheidet aufgrund der Ultrastruktur der Einschlüsse in der Elektronenmikroskopie Fingerabdruck-, rectilineare und kurvilineare Strukturen (Anderson et al. 2013). Die Akkumulation der autofluoreszierenden Lipopigmente ist besonders prominent in den Perikarya und den Axonhügeln der Neurone, schwächer in Astrozyten und am geringsten in Oligodendrozyten, Ependymzellen und im Plexus choroideus (Mole et al. 2011). Die neuronale Speicherung ist dabei sehr ausgeprägt in den Schichten II – VI der Großhirnrinde, in cerebellären Purkinje-Zellen und in Neuronen des Hippocampus. Bereiche ohne Speichermaterial enthielten hypertrophe Astrozyten und Phagozyten, also Mikroglia, die entweder einzeln waren oder aggregiert zu resorptiven Knötchen vorlagen und mit autofluoreszierenden Ablagerungen beladen waren (Mole et al. 2011). In der Retina kommt es zu einer allmählichen Degeneration von Photorezeptoren durch progressive Reduktion der Neurone, die sich proportional zur Progression der Erkrankung zeigte mit einer zusätzlichen reaktiven Astrozytose (Mole et al. 2011).

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren noch keine kurativen Therapieoptionen für die CLN7-Erkrankung wie für die meisten *NCLs*. In einer 1-Personen Studie einer 7-jährigen CLN7-Patientin wurde die therapeutische Effektivität eines 22-mer Antisense-Oligonukleotid (Milasen) erprobt, das das Spleißen der prä-mRNA von CLN7 verändern und verbessern soll (Kim et al. 2019). Symptomlindernde, palliative Behandlungsansätze stellen weiterhin die therapeutischen Hauptsäulen für Betroffene und deren Familien dar, um die optimale Lebensqualität im Rahmen dieser Erkrankung für sie zu ermöglichen (Schulz et al. 2013).

2 Zielsetzung

Mutationen im *CLN7/MFSD8*-Gen, welches für das lysosomale CLN7-Transmembranprotein kodiert, führen zur neurodegenerativen CLN7-Erkrankung. CLN7 besitzt Sequenzhomologien zur Gruppe der sekundär aktiven Transporter der Major Facilitator Superfamilie (MFS). Die Funktion/-en und möglichen Substrate des CLN7-Proteins sind jedoch unbekannt. Ferner ist unklar, warum die Defizienz des putativen lysosomalen CLN7-Membrantransporters zu lysosomaler Dysfunktion, Störungen der Autophagie, Akkumulation von autofluoreszierendem Speichermaterial, Neuroinflammation und zur selektiven Schädigung und zum Untergang von Neuronen im Cerebrum, im Cerebellum und in der Photorezeptoren-Schicht der Retina führt. Zur Analyse von Pathomechanismen bei der CLN7-Erkrankung wurde im Labor ein *Cln7 knockout (Cln7 ko)* -Mausmodell generiert, das wichtige Merkmale der CLN7-Erkrankung beim Menschen im Gehirn und in der Retina rekapituliert.

In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, welche molekularen Mechanismen zu lysosomaler Dysfunktion bei der CLN7-Erkrankung beitragen. Als Modell für die Untersuchungen wurden immortalisierte embryonale Fibroblasten (MEFs) und primäre Makrophagen aus dem etablierten *Cln7 ko* Mausmodell verwendet. Zur Analyse quantitativer Unterschiede lysosomaler Proteine wurde das Proteom von WT und *Cln7 ko* MEFs nach Isotopenmarkierung (SILAC) und anschließender magnetischer Isolierung reiner Lysosomen durch massenspektrometrische Untersuchung bestimmt. Basierend auf den quantitativen Proteomdaten aus *Cln7 ko* MEFs sollten die Daten anschließend an *Cln7 ko* Makrophagen verifiziert werden.

Des Weiteren sollten durch *Green Fluorescent Protein (GFP)*-Affinitätsaufreinigung mit anschließender massenspektrometrischer Detektion Interaktionspartner von CLN7 identifiziert werden, die möglicherweise zu einem besseren Verständnis der unbekanntenen Funktion von CLN7 und seiner möglichen Bedeutung für Reaktions- und Signalkaskaden beitragen. Ferner sollte im Rahmen der Expressions- und Interaktionsanalysen überprüft werden, ob dimere oder oligomere CLN7-Formen in lysosomalen Membranen existieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Modell</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav	3850 EL	Systec
Gel-/Blotdokumentationsanlage	ChemiDoc™XRS	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator	Galaxy® 170S	New Brunswick
Dounce-Homogenisator	1 ml	Wheaton
Drehrad	Rotator	Neolab
Eismaschine	AF10	Scotsman
Feinwaage	AC 100	Mettler Toledo
Fluoreszenzdetektor	MX3000P	Stratagene
Geldokumentationsanlage	E Box VX2	Vilber
Gelelektrophoresekammer (Agarosegele)	PerfectBlue Maxi M	Peqlab
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	PerfectBlue Twin M	Peqlab
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad
Heizblock	HLC by	Ditabis
Inkubator	Innova 4230	New Brunswick
Inverses Mikroskop	CKX31	Olympus
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	DM IRE2	Leica
Magnetrührer	MR Hei-Mix D	Heidolph
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten	Research plus	Eppendorf
Pipettierhilfe	peqMATE	Peqlab
Schüttler	Innova 4080	New Brunswick
Semi-Dry Elektrobloetter	PerfectBlue™	Peqlab
Spannungsquelle	PeqPOWER E300	Peqlab

Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	Peqlab
Sterilwerkbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Stickstofftank	ARPEGE 55	Air liquide
Thermocycler	PeqSTAR	Peqlab
Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery™ M120	Thermo Scientific
UV-Lampe	N36K	Konrad Benda-Herolab
Vakuumpumpe	PC 2004 VARIO	Vacuubrand
Vortexer	peqTWIST	Peqlab
Waage	MR Hei-MixD	Heidolph
Wasserbad	WBT22	Roth
Zentrifugen	5424R, 5415D, 5804R	Eppendorf

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One
Amicon Ultra-Zentrifugenfilter (3K)	Merck
Cellophanfolien	Pütz Folien
Deckgläser	Roth
Glaspipetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Glasplättchen	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Immersionsöl 518 C	Zeiss
Kanülen	BD
Kryoröhrchen	Sarstedt
Küvetten	Brand
Linspapier MN 10 B	Zeiss
Nitrozellulosemembran Protran™	Whatman
Parafilm	Bemis
Petrischalen	Sarstedt
Pipetten	Eppendorf

Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt
Skalpelle	BBraun
Spritzen	BBraun
Spritzenvorsatzfilter	VWR
Superfrost Plus Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Whatman-Papiere	Roth
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

3.1.3 Chemikalien, Assays und Kits

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
2- Mercapto-Ethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich
4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agar	Roth
Agarose	AppliChem
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Aqua-Poly/Mount [®]	Polysciences
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck
Carbenicillin	Roth
Chloroform	J. T. Baker
Coomassie [®] Blue R	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DNase I	Roche
E64	Sigma-Aldrich

Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HPLC-Wasser	Roth
Hefe-Extrakt	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kanamycin	Roth
Luminol	Roth
Lysozym	Serva
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck
NNN'N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Nonidet P 40 (NP40)	Roche
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Salzsäure (HCl)	Merck
Saponin	Fluka

Silbernitrat (AgNO ₃)	Applichem
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Sukrose	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizma [®] Base (Tris)	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton	Roth
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid	Merck

<i>Assays und Kits</i>	<i>Hersteller</i>
GeneJet Plasmid-Minipräparationskit	Thermo Fisher Scientific
High-Capacity cDNA reverse transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
jetPEI [™] -Polyplus Transfektionsreagenz	Peqlab
KAPA Hifi [™] PCR-Kit	Peqlab
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	Peqlab
PeqGold Total RNA Kit	VWR
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Life Technologies
Protein Assay Dye reagent	Bio-Rad
QIAquick [®] -Gelextraktionskit	Qiagen
QIAquick [®] -Plasmid-Midipräparationskit	Qiagen
Taqman [®] Gene Expression Assay	Invitrogen

3.1.4 Vektoren

<i>Vektoren</i>	<i>Hersteller</i>
p3xFLAG-CMV [™] -10	Sigma-Aldrich
pcDNA [™] 3.1 D/V5 His-TOPO [™]	Thermo Fisher Scientific
pEGFP-C1	Takara Bio

3.1.5 Bakterienstamm und Kulturmedien

- Bakterienstamm: chemisch kompetente *E. coli* Top10
- LB-Medium: 10 g/l Trypton/Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g /l NaCl
- LB-Platten: 15 g/l Agar in LB-Medium

Je nach Bedarf wurden Antibiotika zugegeben: 100 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin

3.1.6 Zellen, Reagenzien und Zellkulturmedien

HEK293T -Zellen wurden von ATCC (*American Type Culture Collection*), *MFSD8 ko* HAP1-Zellen von der Firma Horizon Genomics GmbH kommerziell erworben. Embryonale Mausfibroblasten (MEFs) sowie Makrophagen (BMM) wurden aus *Cln7 ko* -Mäusen (Brandenstein et al. 2016) isoliert. Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in folgenden Kulturmedien kultiviert:

<i>Zelllinie</i>	<i>Kulturmedium</i>
HEK 293T	DMEM, 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 1xGlutaMAX™
HAP1	IMDM, 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1xGlutaMAX™
MEF	DMEM, 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 1xGlutaMAX™
BMM	DMEM/HAM's F-12, 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, 1xGlutaMAX™

<i>Medium/Reagenz</i>	<i>Hersteller</i>
DMEM/HAM's F-12	Biochrom AG
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Life Technologies
Fötale Kälberserum (FKS)	GE Healthcare
GlutaMAX™ (100x)	Life Technologies
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Life Technologies
Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF)	PeptoTech
Opti-MEM®	Life Technologies
Penicillin (1000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)	Life Technologies
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Life Technologies
Trypsin/EDTA	Life Technologies

3.1.7 Antikörper

<i>Primäre Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller (Kat.-Nr.)</i>
α -Tubulin	Maus	WB 1:2000	Sigma-Aldrich (T9026)
AP2	Maus	WB 1:1000	BD Biosciences
Cathepsin B	Ziege	WB 1:2000	Neuromics (GT15047)
Cathepsin D	Ziege	WB 1:500	Santa Cruz (sc-6486)
Cathepsin L	Ziege	WB 1:500	R&D Systems (AF1515)
Cathepsin S	Maus	WB 1:200	Santa Cruz (sc-6503)
Cathepsin Z	Ziege	WB 1:250	R&D Systems (AF1033)
CD68	Maus	IF 1:100	Santa Cruz (sc-20060)
CD74	Ratte	WB 1:5000	BD Bioscience (ln-1)
Cln5	Kaninchen	WB 1:200	Abcam (ab170899)
Cln7	Kaninchen	WB 1:1000	Damme et al. 2014
Creg1	Ziege	WB 1:1000	R&D Systems (AF1697)
Dpp7	Ziege	WB 1:500	R&D Systems (AF3436)
FLAG	Maus	WB 1:1000	Sigma-Aldrich (M2)
Gapdh	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz (sc-25778)
GFP	Maus	WB 1:4000	Roche
Lamp1	Ratte	WB 1:1000	Hybridoma-Überstand (1D4B)
Lamp2	Ratte	WB 1:1000	Hybridoma-Überstand (H4B4)
Limp2	Kaninchen	WB 1:2000	PD Dr. Schwake, Bielefeld
Npc2	Kaninchen	WB 1:100	Santa Cruz (sc-33776)
Ppt1	Kaninchen	WB 1:1000	Millipore (ABS1118)
Prosaposin/Saposin	Ziege	WB 1:1000	Prof. Sandhoff, Bonn
Rab7	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling (#9367)
SCMAS	Kaninchen	WB 1:3000	Prof. Neufeld, Los Angeles

WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenzmikroskopie

<i>Sekundäre Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
AF488-gekoppeltes anti-Maus IgG	IF 1:500	Thermo Fisher Scientific
HRP-gekoppeltes anti- Maus IgG	WB 1:3000	Dianova
HRP-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG	WB 1:5000	Dianova
HRP-gekoppeltes anti-Ziege IgG	WB 1:3000	Dianova
HRP-gekoppeltes anti-Ratte IgG	WB 1:3000	Dianova

AF: AlexaFluor®, HRP: *Horse-radish peroxidase*, WB: Western-Blot, IF: Immunfluoreszenz-mikroskopie

3.1.8 Sequenzen der verwendeten Primer

CLN7C401S-F: 5'-AGACCAACTGGTAGCTCGATTGAACAAG-3'

CLN7C401S-R: 5'-CTTGTTCAATCGAGCTACCAGTTGGTCT-3'

CLN7C408S-F: 5'-GAACAAGCCTGGTCCCTCTACACCCCG-3'

CLN7C408S-R: 5'-CGGGGTGTAGAGGGACCAGGCTTGTTTC-3'

Mfsd8-F: 5'-TGGTGCATTAATACAGTCCTAGAATCC-3'

Mfsd8-R: 5'-CTAGGGAGGTTTCAGATAGTAGAACCC-3'

15472-F: 5'-TTCCACCTAGAGAATGGAGCGAGATAG-3'

5-FRT-R: 5'-CCACAACGGGTTCTTCTGTT-3'

3.1.9 Assays für quantitative *real-time* PCR

<i>Gen</i>	<i>Protein</i>	<i>Assay (Primer und Sonde)</i>
<i>Aga</i>	Aspartylglucosaminidase	Mm01208043_m1
<i>Cd74</i>	CD74	Mm00658576_m1
<i>Cln5</i>	CLN5	Mm01224444_m1
<i>Cln7</i>	CLN7	Mm01294801_m1
<i>Creg1</i>	CREG1	Mm00516189_m1
<i>Ctsb</i>	Cathepsin	Mm01310506_m1
<i>Ctsd</i>	Cathepsin D	Mm00515587_m1
<i>Ctsl</i>	Cathepsin L	Mm00515597_m1

<i>Ctss</i>	Cathepsin S	Mm01255859_m1
<i>Ctsz</i>	Cathepsin Z	Mm00517697_m1
<i>Glb1</i>	Beta-Galactosidase	Mm00515342_m1
<i>Dpp7</i>	Dipeptidyl peptidase 2	Mm00473420_m1
<i>Epdrl</i>	Mammalian ependymin-related protein 1	Mm00840848_m1
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	Mm99999915_g1
<i>Jam2</i>	Junktionale Adhäsionsmolekül B	Mm01344068_m1
<i>Naaa</i>	N-Acylethanolamin-hydrolysierende-Saure-Amidase	Mm01341699_m1
<i>Npc2</i>	Niemann-Pick-Typ C2-Protein	Mm00499230_m1
<i>Ppt1</i>	Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1	Mm00477078_m1
<i>Prcp</i>	Lysosomale Pro-X Carboxypeptidase	Mm00804502_m1
<i>Psap</i>	Prosaposin	Mm00478327_m1
<i>Siae</i>	Sialat-O-Acetylerase	Mm00496036_m1
<i>Slpi</i>	Sekretorischer Leukozyten-Protease-Inhibitor	Mm00441529_g1
<i>Tpp1</i>	Tripeptidyl-peptidase 1	Mm00487016_m1

3.1.10 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems
BLAST®	National Library of Medicine (Bethesda, USA)
Corel Draw X11	Corel
Endnote X9	Thomson Reuters
GraphPad PRISM	GraphPad Software
Image Lab™	Bio-Rad
Leica Confocal Software	Leica
Microsoft Office 2013	Microsoft
MxPro-qPCR Software	Agilent Technologies
Quantity One v4.6.7	Bio-Rad

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli* –Zellen

50 µl chemisch kompetente *E.coli* - Zellen (Stamm: Nova Blue) wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligations-Ansatz bzw. mit 50 ng Plasmid-DNA vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 s bis 2 min) bei 42 °C und einer weiteren Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf eine vorgewärmte LB-Agar-Platte, die entweder Carbenicillin (Carb, 100 µg/ml) oder Kanamycin (Kan, 50 µg/ml) enthielt, ausplattiert und im Inkubationsschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Lagerung wurden die LB-Agar-Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung von hochreiner DNA für nachfolgende Anwendungen (Transfektion, DNA-Sequenzierung, Mutagenese) wurden Einzelklone von LB-Carb- oder LB-Kan-Agar-Platten gepickt und in einem Volumen von 5 ml LB-Carb oder LB-Kan-Flüssigmedium im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Isolierung kleinerer DNA-Mengen (bis 20 µg) wurde der GeneJet® -Plasmid-Minipräparationskit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für die Isolierung größerer Plasmid-DNA-

Mengen (bis zu 200 µg) wurde der QIAquick®-Plasmid-Midi-Präparationskit (Qiagen) nach Herstellerangaben benutzt.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen destilliertes Wasser oder mit NanoDrop®, der die Extinktion der Nukleinsäuren bei 260 nm misst. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Reine DNA besitzt einen OD_{260/280}-Quotienten von 1,8 und reine RNA einen OD_{260/280}-Quotienten von 2,0.

3.2.4 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung von *missense*- oder *nonsense* Mutationen in eine cDNA wurde die ortsspezifische Mutagenese nach der Quik-Change Methode (Agilent Technologies) mit der Phusion® DNA-Polymerase durchgeführt. Aufgrund ihrer 3'→5' Exo-Nuklease-Aktivität besitzt die Phusion® DNA-Polymerase eine Korrekturlesefunktion und ist daher für eine DNA-Amplifikation mit hoher Genauigkeit geeignet. Für die ortsspezifische Mutagenese werden komplementäre Oligonukleotid-Primer synthetisiert, die die Mutation und flankierende komplementäre Sequenzen von 15-25 bp Länge am 5'- und 3'-Ende enthalten.

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen/Menge</i>
5x Phusion® High Fidelity Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Forward Primer	0,5 µM
Reverse Primer	0,5 µM
cDNA	50 ng
Phusion® DNA Polymerase	0,5 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl

Temperatur	Dauer	Zyklen
98 °C	30 sek	1
98 °C	10 sek	
45 °C	30 sek	20
72 °C	1 min/kB Plasmid-Länge	
72 °C	10 min	1

Anschließend wurde die parentale, methylierte Plasmid-DNA bei 37°C für 30 min mit dem Restriktionsenzym *Dpn I* gespalten. Danach erfolgte die Transformation der mutierten, einzelsträngigen, zirkulären DNA in chemisch kompetente *E. coli* Nova Blue-Zellen, um dort zur doppelsträngigen Plasmid-DNA vervollständigt zu werden. Für jede ortsspezifische Mutagenese wurden 5 Einzelklone von LB-Carb oder LB-Kan-Agarplatten gepickt und die Klone in LB-Carb- bzw. LB-Kan-Medium bei 37°C im Schüttel-Inkubator (250 rpm) über Nacht kultiviert. Zur Identifizierung von Klonen mit mutierter Plasmid-DNA wurde die isolierte Plasmid-DNA mit vektor-spezifischen Primern sequenziert. Die DNA-Sequenzierung wurde durch einen kommerziellen Anbieter (Microsynth Seqlab, Göttingen) durchgeführt.

3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele vorbereitet. Dazu wurde Agarose je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (1-2% w/v) in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (40 mM Tris/HCl, pH 8,5, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) im Mikrowellenherd aufgeköcht, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml Gelvolumen) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Agarosegele wurden nach Aushärtung in eine mit TAE-Puffer befüllte Gelkammer überführt. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer gemischt, in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V für 20-30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit Hilfe der Geldokumentationsanlage fotografiert. Zur Größenbestimmung und Abschätzung der Konzentration der DNA-Banden diente der Längenstandard GeneRuler™ 1 kb (Thermo Scientific).

3.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Banden wurden in den Agarosegelen unter UV-Licht anhand des Längenstandards identifiziert und anschließend unter UV-Schutz mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem QIAquick®-Gelextraktionskit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.7 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Microsynth Seqlab (Göttingen) kommerziell durchgeführt. Für die DNA-Sequenzierung wurden 1,2 µg Plasmid-DNA mit 30 pmol des Sequenzierungs-Primers in einem Endvolumen von 15 µl versetzt.

3.2.8 Extraktion von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen und Zellpellets

Für die Extraktion von genomischer DNA aus Schwanzspitzen und Zellpellets wurde der KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit (Peqlab) verwendet.

Extraktionspuffer

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>
10x KAPA Express Extract Puffer	10 µl
KAPA Express Extract Enzym	2 µl
ddH ₂ O	88 µl

Mausschwanzspitzen oder Zellpellets wurden in 100 µl DNA-Extraktionspuffer suspendiert und für 10 min bei 75°C im Thermoblock erhitzt. Zur Inaktivierung der thermostabilen Protease wurden die Proben für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben bei 20.000 x g für 1 min wurden die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 1 µl der Überstände für eine Genotypisierungs-PCR verwendet.

3.2.9 Genotypisierung von Mäusen

Für die Genotypisierung von Mäusen und embryonalen Fibroblasten wurde der KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit von Peqlab verwendet. Folgender Ansatz wurde in einem Volumen von 25 µl pipettiert:

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen/Menge</i>
2x KAPA 2G Fast Hot Start Genotyping Mix	12,5 μ l
Mfsd8-F-Primer (10 pmol/ μ l)	1,25 μ l
Mfsd8-R-Primer (10 pmol/ μ l)	1,25 μ l
15472-F-Primer (10 pmol/ μ l)	1,25 μ l
DMSO	1,25 μ l
genomische DNA	1 μ l
dd H ₂ O	6,5 μ l
Endvolumen	25 μ l

Die Sequenzen der Primer Mfsd8-F, Mfsd8-R und 15472-F sind in Kapitel 3.1.8. angegeben. Die Proben wurden gemischt und anschließend im Thermocycler bei folgenden Temperaturen und Zyklen inkubiert:

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	3 min	1
95°C	15 sek	
55°C	15 sek	35
72°C	30 sek	
72°C	5 min	1

Die Reaktionsansätze wurden zusammen mit einem DNA-Längenstandard auf einem 1,5% - igen Agarosegel aufgetragen, bei einer Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt und die Längen der amplifizierten PCR-Produkte durch einen Vergleich mit dem DNA-Längenstandard bestimmt.

3.2.10 Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen und cDNA-Synthese

Zur Extraktion von RNA wurden Zellen in 35-mm Schalen bis zur Konfluenz kultiviert und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS abgeschabt. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem PeqGOLD Total RNA Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben. Die RNA Proben wurden bei Bedarf bei -80° C aufbewahrt.

Zur Synthese der einzelsträngigen komplementären DNA (cDNA) aus isolierter RNA wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Vor der cDNA-

Synthese wurde die Qualität der verwendeten RNA durch Auftrennung im Agarosegel überprüft. Für die quantitativen *real-time* PCR-Analysen wurden 1 µg RNA in cDNA nach folgendem Temperaturprofil synthetisiert.

<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
10 min	25°C
120 min	37°C
5 min	85°C
∞	4°C

3.2.11 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR beruht auf dem Prinzip der PCR, ermöglicht aber die Quantifizierung der RNA-Expression. Hierfür wurde der *Taqman*[®] *Gene Expression Assay* (Thermo Fisher Scientific) verwendet, der gen- und speziesspezifische Primer und Sonden enthält. Die *Taqman*[®]-Sonde, die spezifisch zwischen *forward*- und *reverse*-Primer an die cDNA bindet, ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff, 6-Carboxyfluorescein (FAM), markiert und am 3'-Ende mit dem fluoreszierenden Quencher-Farbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Das 3'-Ende ist zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert, um die Extension der Sonde zu verhindern. Die Energie des Reporter-Farbstoffs nach Anregung bei 488 nm wird direkt an den Quencher übertragen, wenn dieser maximal 17-20 Basenpaare zu dem Reporterfarbstoff entfernt liegt. Dieser Mechanismus, der sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), sorgt dafür, dass nur das Fluoreszenzspektrum des Quenchers emittiert wird (Cardullo et al. 1988). Die *Taq*-Polymerase, die eine zusätzliche 5'→3'-Exonukleaseaktivität besitzt, setzt beim Erreichen der Sonde während der Extension die Reporter-Fluoreszenz frei. Dabei wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben, so dass das entstehende Fluoreszenzsignal von FAM detektiert werden kann. Der Anstieg der Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur synthetisierten DNA-Menge. Da die entstehenden Produktmengen zunächst zu gering sind und die gemessene Fluoreszenz aufgrund der Hintergrundfluoreszenz unverändert bleibt, ist der Zyklus der PCR, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, grundlegend für die weitere Auswertung. Bei diesem Zyklus wird der so genannte C_T-Wert (=cycle of threshold) gesetzt.

Die Analyse der Daten erfolgte nach der 2^{-ΔΔC_T}-Methode (Livak und Schmittgen 2001). Zuerst wurde die Differenz zwischen dem C_T-Wert des zu untersuchenden Gens und dem Kontrollgen gebildet (*β-Aktin*

oder *Gapdh*). Die relative Expression wurde aus dem Vergleich der einzelnen Gruppen nach den folgenden Gleichungen gebildet (z. B. Wild-Typ gegen *Cln7 ko*):

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ aus } \Delta C_T = C_{T(\text{Gen})} - C_{T(\text{Kontrollgen})}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Cln7 KO})} - \Delta C_{T(\text{Wild-Typ})}$$

$\Delta C_{T(\text{Wild-Typ})}$ wurde für die graphische Auswertung gleich 1 gesetzt.

Für die quantitative Analyse der Genexpression wurden folgende PCR-Ansätze in Dreifachbestimmung pro Gen pipettiert:

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen</i>
2 x TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl
TaqMan® Gene Expression Assay	1 µl
H ₂ O	7 µl
Matritzen cDNA	2 µl

Für die anschließende PCR wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklen</i>
95 °C	10 min	1
65 °C	15 sek	40
60 °C	1 min	

Der Nachweis und die Analyse der Fluoreszenz erfolgten mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000PTM.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Steriles Arbeiten

Um eine Kontamination der Zelllinien mit Bakterien und Pilzen vorzubeugen, wurden alle Arbeitsschritte unter einer Steril-Bank durchgeführt. Sämtliche Arbeitsflächen und verwendete Werkzeuge wurden vor Beginn der Arbeiten sorgfältig mit 70 % igem Ethanol gereinigt; PBS-Lösungen, Pasteur-Pipetten und Pipettenspitzen wurden vor der Verwendung autoklaviert.

3.3.2 Kultivierung von adhärenen Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in 25 cm² (oder in 75 cm²) Zellkulturflaschen in den jeweils optimierten Medien (Kapitel 3.1.6.) bei 37°C, 5% CO₂-Partialdruck und gesättigter Wasserdampfatosphäre in einem Brutschrank kultiviert. Die Zellpassage erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 80-100% je nach Zelllinie ein- bis dreimal wöchentlich. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen, um Trypsin-Inhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Die adhären wachsenden Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung und Inkubation bei 37°C für 5 min abgelöst. Zur Inhibierung von Trypsin wurden die Zellen in 9 ml Kulturmedium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren vereinzelt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit vorgewärmtem Kulturmedium aufgefüllt und weiter kultiviert, die restliche Zellsuspension wurde verworfen (Verdünnungsverhältnis 1:3 – 1:10). Zur Bestimmung der Zellzahlen vor Durchführung einer Transfektion oder einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

3.3.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zelllinien

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bis zur nächsten Verwendung gelagert. Zur Kryokonservierung wurden konfluente Zellen trypsiniert, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, bei 5° C und 900 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 3 ml Einfriermedium (DMEM, 10% FKS, 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert. Je Kryoröhrchen wurde 1 ml der Zellsuspension pipettiert und zunächst in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter auf -80°C heruntergekühlt. Zur längeren Kryokonservierung wurden die Zellen nach 24 Stunden in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen vorsichtig aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 900 x g für 5 min bei Raumtemperatur in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert, die Zellsuspension in kleine Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden das Medium und nicht angewachsene Zellen abgesaugt und mit frischem vorgewärmten Medium ersetzt.

3.3.4 Konditionierung von Medium

Für die Analyse der Sezernierung von Proteinen ins Medium wurden Zellen in 35 mm- Kulturschalen ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz (70-80%) nach 1-2 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die

Zellen mit PBS gewaschen und für 24 h mit 1 ml vorgewärmtem OptiMEM® bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3.3.5 Isolierung und Kultivierung von Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen

Die Isolierung von Makrophagen erfolgte aus den Knochen (Tibiae und Femora) von Wild-Typ und *Cln7 ko* Mäusen. Dazu wurden 5 Monate alte Mäuse durch CO₂-Inhalation betäubt und dekapitiert. Zur Verifizierung des Genotyps wurde eine Schwanzspitze abgeschnitten. Nach Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurde die Haut von den Beinen abgezogen, die Knochen freipräpariert, die Femora vorsichtig an der Hüfte disloziert und abgenommen. Die Füße wurden unterhalb der Tibia mit dem Skalpell weggeschnitten. Aufgrund der Kontaminationsgefahr wurde bei diesem Arbeitsschritt genau darauf geachtet, dass der Knochenraum unversehrt blieb. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Knochenmarks unter der Steril-Bank, indem das Femur am Hals und die Tibia distal angeschnitten wurden. Danach wurde jeweils ein Femur und eine Tibia mit dem angeschnittenen Knochenmark nach unten in einem gelochten PCR-Reaktionsgefäß eingeführt, welches in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 15 sek bei 5900 x g, das geerntete Knochenmark wurde danach rasch in 500 µl Kulturmedium aufgenommen und durch ein steriles 70 µm Zell-Sieb in ein 50 ml Falcon-Röhrchen filtriert. Die Zellzahlen pro ml wurden mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Kulturmedium ausgesät, das 50 ng/ml M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) enthielt, um die Differenzierung der Makrophagen zu induzieren. Ein Medium-Wechsel erfolgte an jedem zweiten Tag, die ersten 5 Tage wurde dabei auf einen Waschvorgang mit PBS verzichtet.

3.3.6 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsvektoren

Für die transiente Transfektion wurde das jetPEI™- Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden Zellen in Petrischalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 50-70% kultiviert. In Abhängigkeit von dem Durchmesser der verwendeten Zellkulturschalen wurden die Zellen mit unterschiedlichen DNA-Mengen und jetPEI™ im Verhältnis 1:2 transfiziert. Die DNA- und jetPEI™-Lösungen wurden gemischt und nach einer 15-30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellen pipettiert.

<i>Kulturschale (cm)</i>	<i>DNA (μg)</i>	<i>NaCl (μl)</i>	<i>jetPEITM (μl)</i>	<i>NaCl (μl)</i>	<i>Kulturmedium (ml)</i>
3,5	3	auf 100	6	auf 100	1,8
6	5	auf 250	10	auf 250	4,5
10	10	auf 250	20	auf 250	9,5

3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Deckgläschen, die zuvor durch Einlegen in 70% Ethanol sterilisiert wurden, wurden in 12-Well Gewebekulturschalen ausgelegt. Primäre murine Makrophagen wurden auf den Deckgläschen ausgesät und für 10 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Die Makrophagen wurden für 20 min in 4 % PFA in PBS bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurden freie Aldehyd-Gruppen durch dreimaliges Waschen mit 50 mM NH₄Cl in PBS gequenchet. Nach dreimaligem Waschen in eiskaltem 1xPBS wurden die Makrophagen zur Blockierung unspezifischer Epitope und Reduktion unspezifischer Proteinwechselwirkungen mit Blockier-Lösung (3 % BSA in PBS, 0,1 % Saponin) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Deckgläschen auf Parafilm® Streifen und Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockier-Lösung über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen und mit Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern in Blockier-Lösung unter Lichtausschluss für 30 Minuten bei RT inkubiert. Zur Darstellung der Zellkerne erfolgte nach erneutem 3-maligem Waschvorgang die Inkubation der Makrophagen mit DAPI (2 μ g/ml in PBS) unter Lichtausschluss. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS und anschließend mit destilliertem Wasser. Die Deckgläschen wurden luftblasenfrei mithilfe von Aqua-Poly/Mount® auf Objektträger eingebettet und über Nacht bei RT getrocknet. Die Ränder wurden mit farblosem Nagellack verschlossen. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Vergrößerung: 63x, Leica Modell SP8, Wetzlar). Für die Bearbeitung der Bildaufnahmen wurden Adobe Photoshop 7.0 und Leica-Software verwendet.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Ernte und Herstellung von Lysaten aus Zellen

Zellen wurden in Petrischalen mit 6 cm bzw. 10 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 80-100 % kultiviert. Zur Ernte wurden sie zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 1

ml 1 x PBS abgeschabt und bei 1000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet je nach Größe in 50-200 µl Lysispuffer resuspendiert und für 20 min unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 16000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, Proteaseinhibitoren

3.4.2 Herstellung von Membranlysaten aus Zellen

HEK293-Zellen bzw. MEFs wurden in 10 cm Petrischalen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die Zellpellets wurden unter Zugabe von 1 ml Homogenisierungspuffer mit einem Glas-Dounce-Homogenisator (40 Hübe) homogenisiert und anschließend bei 4 °C und 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand wurde erneut bei 4 °C und 20000 x g für 10 min zentrifugiert und das gewonnene Pellet mit der Membranfraktion in 50 µl Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Homogenate für 10 min bei 20000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

- Homogenisierungspuffer: 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Na₂HPO₄,
Proteaseinhibitoren

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1% Triton X-100 (TX-100), 1 mM EDTA,
Proteaseinhibitoren

3.4.3 Herstellung von TX-100-unlöslichen Lysaten aus Makrophagen

Die Detektion der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase (SCMAS) und Saposin D im Immunblot erfolgte durch Analyse von Detergenz (TX-100) unlöslichen Fraktionen. Zellen von 12-Well-Platten wurden zweimal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und mit 50 µl Lysispuffer pro Well-Platte kurz inkubiert. Anschließend wurden sie auf Eis abgeschabt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und für 20 min mit gelegentlichem Mischen bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Zelllysate bei 13000 x g und 4 °C für 15 min. Der Überstand enthält die TX-100 löslichen Proteine, während in den Pellets die Detergenz-unlöslichen Proteine vorhanden sind. Nach Überführung der TX-100 löslichen Proteine in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford. Die Zellpellets der Detergenz-unlöslichen Fraktionen wurden mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in SDS/PBS-Puffer resuspendiert. Dabei wurde die Lademenge für die SDS-PAGE an die Konzentration der TX-100-löslichen Fraktionen angepasst.

- Lysispuffer: 1 x PBS, 0,5 % TX-100, 50 mM EDTA, Proteaseinhibitoren

- SDS/PBS-Puffer: 1 x PBS, 2 % SDS

3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch kolorimetrische Messung nach Bradford (Bradford 1976). Für die Analysen wurde das Protein Micro-Assay (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Erstellung der Eichgeraden wurde eine Standardreihe mit Rinder Serumalbumin (BSA, $c = 0,2 \text{ mg/ml}$) pipettiert und die Absorption der Proben nach Zugabe des Protein Assay Dye Reagenz bei 595 nm photometrisch bestimmt. Die Absorption der Protein- Coomassie-Brillant-Blau G-250-Komplexe bei 595 nm ist im Bereich von 0-20 μg Protein/ml proportional zur Proteinkonzentration.

<i>BSA ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>BSA (μl) 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$</i>	<i>Wasser(μl)</i>	<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate (μl)</i>	<i>Gesamtvol. (μl)</i>
0	0	800	200	1000
5	25	775	200	1000
10	50	750	200	1000
15	75	725	200	1000
20	100	700	200	1000

Standardreihe für Bradford-Assay

3.4.5 Aufbereitung von Medium

Zur Analyse der Sezernierung des Cln5-Proteins ins Medium wurden MEFs in 35 mm-Schalen bis zur vollständigen Konfluenz in DMEM-Medium bei 37 °C kultiviert, vorsichtig mit vorgewärmten 1 x PBS gewaschen und anschließend für 24 h in 1 ml OptiMEM® bei 37 °C kultiviert. Das konditionierte Medium wurde gesammelt und zur Abtrennung toter Zellen und Zellresten bei 4° C und 900 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 x Protease-Inhibitor versetzt. Für Western-Blot-Analysen wurde 500 μL Medium mit Amicon Ultra-0,5ml® Zentrifugen-Filter (Merck) nach Herstellerangaben aufkonzentriert.

3.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen mit molaren Massen zwischen 5 und 250 kDa wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen,

denaturierenden Puffersystem verwendet. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches an Proteine bindet und ihnen eine konstante negative Ladung gibt.

Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele variierte von 8 bis 12,5 % in Abhängigkeit von der molaren Masse des zu analysierenden Proteins. Die Gele wurden mit dem PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S/M (VWR) präpariert. Zunächst wurde die Trenngel-Lösung zwischen die Glasplatten des Elektrophorese-Systems pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Polyacrylamids wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel über das Trenngel unter Verwendung von Kämmen (10-20 Taschen /Kamm) pipettiert. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Polyacrylamid-Gele entweder direkt verwendet oder über Nacht bei 4°C gelagert. Aliquots der Proteinproben (30-100 µg Protein) wurden mit Solubilisierungspuffer gemischt und für 5 min bei 95°C oder alternativ für 10 min bei 50°C (Solubilisierung von CLN7, CLN3 und Sialin) erhitzt. Anschließend wurden die Polyacrylamid-Gele in einer Elektrophorese-Kammer eingespannt und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der molaren Massen der detektierten Proteine wurde ein Marker mit Proteinbanden definierter Masse (Bereich: 10 kDa-170 kDa, 10 Markerbanden, PageRuler™ Prestained) parallel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA pro Gel bei Raumtemperatur.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Trenngel:	8-12 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,08 % APS, 0,08 % TEMED
Sammelgel:	4 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED
Anodenpuffer:	192 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl (pH 8,6)
Kathodenpuffer:	192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris/HCl (pH 8,6)
reduzierender Solubilisierungspuffer:	125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 1 % SDS, 10 % Glycerin, Coomassie® Blue, 100 mM DTT
Nicht-reduzierender Solubilisierungspuffer:	125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 1 % SDS, 10 % Glycerin, Coomassie® Blue

Gele und Puffer für SDS-PAGE

3.4.7 Western-Blot-Analyse

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran durch Elektrotransfer in einem Tank-Blot-System.

Zum Aufbau der Transferapparatur wurde zunächst eine Blotting-Kassette in Transferpuffer eingelegt. Anschließend wurden die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge zusammgebaut: Blot-Schwamm, zwei Whatman-Blotting-Papiere, PVDF/Nitrocellulose-Membran, SDS-Polyacrylamid-Gel, zwei Whatman-Blotting-Papiere, Blot-Schwamm. Die Blot-Kassette wurde verschlossen und im Elektroblo-Tank fixiert. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung für 10 sek in Methanol inkubiert und anschließend auf dem Wipp-Schüttler für 5 min in dd H₂O gewaschen. Die Nitrocellulose- und PVDF-Membranen wurden vor Verwendung für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Für Mini-Gele wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld mit einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 90 min angelegt. Für Midi-Gele wurde eine Stromstärke von 900 mA für 3 Stunden verwendet.

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Transferpuffer:	25 mM Tris (pH 7,4), 192 mM Glycin, 20 % Methanol
TBS:	25 mM Tris (pH 7,4), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
Blockierungspuffer:	TBS, 0,1 % Tween 20, 5 % Milchpulver
Waschpuffer:	TBS, 0,1 % Tween 20
ECL-1:	100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 0,44 mM p-Cumarinsäure 2.7 mM Luminol
ECL-2:	100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 0,02 % H ₂ O ₂

Puffer und Reaktionsansätze für Proteintransfer, Blockierung und ECL Detektion

Nach dem Elektro-Transfer der Proteine wurden die Membranen für 60 min auf dem Wipp-Schüttler in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit den Primärantikörpern für 1-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht auf dem Wipp-Schüttler. Nach Abnahme der Antikörperlösung wurden die Membranen dreimal für 10 min mit Waschpuffer bei RT auf dem Wipp-Schüttler gewaschen und anschließend für 1h mit HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelten Sekundärantikörpern auf dem Wipp-Schüttler bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Abnahme der Antikörperlösung wurden die Membranen zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper dreimal für 10 min mit Waschpuffer auf dem Wipp-Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der immunreaktiven Banden durch eine ECL-Reaktion (*enhanced chemiluminescence*). Hierfür wurden jeweils 5 ml der Lösungen ECL-1 und ECL-2 gemischt und die Membran für 30 sek inkubiert. Licht der Wellenlänge 425 nm wird emittiert, wenn Luminol durch HRP oxidiert wird und 3-Aminophtalat entsteht. Die Entwicklung der Signale erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem ChemiDoc™XRS (BioRad). Je nach Signalstärke betrug die Expositionszeit zwischen 10 sek und

mehreren Minuten. Mit der Software Image Lab™ wurden die Intensitäten der immunreaktiven Proteinbanden densitometrisch quantifiziert.

Zur mehrfachen Verwendung von Nitrozellulose- oder PVDF- Membranen für Immunblot-Analysen wurden die Primär und Sekundär-Antikörper durch Inkubation in einer basischen Lösung entfernt. Die Membranen wurden zunächst für 5 min in Waschpuffer, für 5 min in H₂O und anschließend in 0,2 molarer NaOH-Lösung für 5 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 min in 1 x PBS, konnte die Membran erneut für eine erneute Immundetektion mit anderen Primär- und Sekundär-Antikörpern verwendet werden.

3.4.8 Silberfärbung nach Blum von Polyacrylamidgelen

Zum sensitiven Nachweis von Proteinbanden nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurde eine modifizierte Silberfärbung nach Blum durchgeführt (Blum et al. 1987). Dabei bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit den Glutamat-, Aspartat- und Cystein-Resten der Proteine. Die Empfindlichkeit der Proteindetektion beträgt 5-30 ng/ 0,5 cm Bande (Rehm 2016). Die Färbung der Polyacrylamid-Gele erfolgte nach den unten aufgeführten Schritten. Nach Anfärben der Proteinbanden wurden die Polyacrylamid-Gele luftblasenfrei mit zwei Cellophan-Folien umhüllt und im Warmlufttrockner für 2 h getrocknet.

<i>Schritte</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Dauer</i>
1. Fixierung	40 % Ethanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)	60 min
2. Waschen	30 % Ethanol (v/v)	3 x 20 min
3. Vorbehandlung	0,02% Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	1 min
4. Waschen	dd H ₂ O	3 x 20 sek
5. Färben	0,2 % Silbernitrat (AgNO ₃), 0,00875 % Formaldehyd (CH ₂ O)	20 min
6. Waschen	dd H ₂ O	2 x 20 sek
7. Entwickeln	3 % Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), 0,00175 % Formaldehyd (CH ₂ O)	2-5 min →bis Gel braun wird
8. Stoppen	1 % Glycin (v/v)	10 min
9. Waschen	dd H ₂ O	2 x 20 min

Silberfärbung nach Blum et al. 1987, modifiziert.

3.4.9 Kolloidale Coomassie- Färbung von Polyacrylamidgelen

Eine alternative Methode zur Proteindetektion stellt die Färbung mit Coomassie® G-250 Brilliant Blue dar. Im Gegensatz zur Silberfärbung nach Blum ist die Methode weniger sensitiv; sie ist jedoch mit massenspektrometrischen Methoden zur Proteinidentifizierung kompatibel (Rehm 2016). Die Polyacrylamid-Gele wurden nach Fixierung und Vor-Inkubation mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung G 250 für 2 Tage auf einem Wipp-Schüttler bei RT inkubiert. Nach Abnahme der Färbelösung wurden die Polyacrylamid-Gele zur Entfärbung mit H₂O für mehrere Stunden gewaschen.

<i>Schritte</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Dauer</i>
1. Fixierung	50 % Methanol (v/v), 2 % Phosphorsäure(v/v)	14 h
2. Waschen	dd H ₂ O	3 x 30 min
3. Inkubation	34 % Methanol (v/v), 2 % Phosphorsäure (v/v), 17 % Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1 h
4. Färben	34 % Methanol (v/v), 2 % Phosphorsäure (v/v), 17 % Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄), 0,066 % Coomassie G-250	48 h
5. Entfärben	dd H ₂ O	3-6 h

Kolloidale Coomassie-Färbung

3.5 Statistische Auswertung von Messdaten

Sämtliche Messdaten wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel® 2013 ausgewertet. Bei Mehrfachbestimmungen wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Der *Student's t-Test* wurde verwendet, um die Signifikanz zwischen zwei Datensätzen zu berechnen. Ein Signifikanzwert (p-Wert) von kleiner 0,05 beim Vergleich von zwei Datensätzen wurde statistisch als signifikant bewertet. Es wurde zwischen drei unterschiedlichen Signifikanzniveaus differenziert: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,005$ (***)).

4 Ergebnisse

Die folgende Arbeit setzt sich aus drei unterschiedlichen experimentellen Anteilen zusammen:

Im ersten Abschnitt (Kapitel 4.1) der Arbeit wurde das lysosomale Proteom von Isotop-markierten Wild-Typ (WT) und *Cln7 ko* MEFs (SILAC) quantitativ analysiert und die Expression veränderter lysosomaler löslicher Proteine durch quantitative *real-time* PCR- und Western-Blot-Analysen validiert. Die massenspektrometrischen Analysen wurden in Kollaboration mit der AG Thelen an der Universität Bonn durchgeführt. Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt wurden unter dem Titel: „Loss of CLN7 results in depletion of soluble lysosomal proteins and impaired mTOR reactivation“ im Journal „*Human Molecular Genetics*“ publiziert. Für die Übersicht wird auf das Zitieren im ersten Abschnitt auf diese Veröffentlichung verzichtet.

Im zweiten Teil (Kapitel 4.2) der vorliegenden Arbeit wurden mRNA- und Expressionsanalysen lysosomaler Proteine an primären kultivierten WT und *Cln7 ko* Makrophagen durchgeführt.

Im letzten Teil (Kapitel 4.3) der Arbeit wurden Kopräzipitationsanalysen in transient transfizierten, GFP-CLN7 exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Interagierende Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und tryptischer Spaltung durch massenspektrometrische Analysen identifiziert. Die Validierung der CLN7-Protein-Interaktionen erfolgte durch Kopräzitation in GFP-CLN7 exprimierenden HEK293-Zellen und Nachweis der endogenen interagierenden Proteine durch Immunblot-Analysen. In Expressions- und Präzipitationsanalysen wurde überprüft, ob CLN7 Dimere oder Oligomere bildet.

4.1 Das lysosomale Proteom in *Cln7 ko* MEF

CLN7 ist ein putativer lysosomaler Membrantransporter der MFS-Familie, dessen Funktion, Transportrichtung (Export, Import), Transporteigenschaften (Uniporter, Antiporter, Symporter), Substrate und Kristallstruktur unbekannt sind. Zur Aufklärung der molekularen Ursachen der lysosomalen Dysfunktion in *Cln7*-defizienten Zellen und Geweben wurden vergleichende quantitative, proteomische Analysen von isolierten Lysosomen aus WT und *Cln7 ko* MEFs durchgeführt. Als Modell wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) aus einer *Cln7 ko* Maus verwendet, die wichtige Merkmale der CLN7-Erkrankung beim Menschen rekapituliert (Brandenstein et al. 2016).

WT und *Cln7 ko* MEFs wurden parallel für 6 Passagen in Arginin- und Lysin-freiem DMEM-Medium, das die natürlichen leichten L-Arginin ($^{12}\text{C}_6\ ^{14}\text{N}_4$) und L-Lysin ($^{12}\text{C}_6\ ^{14}\text{N}_2$, *Cln7 ko* MEFs) oder die nicht-radioaktiven, schweren L-Arginin ($^{13}\text{C}_6\ ^{15}\text{N}_4$) und L-Lysin ($^{13}\text{C}_6\ ^{15}\text{N}_2$) Isotope (WT MEFs) enthielt,

metabolisch markiert. Nach der metabolischen Markierung erfolgte eine 24-stündige Inkubation der Zellen in DMEM-Medium, das Dextran-gekoppelte Magnetitpartikel enthielt. Zum vollständigen Transport der endozytierten Dextran-gekoppelten Magnetitpartikel zu lysosomalen Kompartimenten wurde eine Chase-Periode von 36 Stunden in komplettem DMEM-Medium angeschlossen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Magnetit-beladenen intakten Lysosomen durch magnetische Isolierung. Nach tryptischer Spaltung der isolierten lysosomalen Proteine erfolgte die Auftrennung der markierten Peptide durch Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) mit anschließender Identifizierung und Quantifizierung der Proteine (Thelen et al. 2017). Durch den Einbau der schweren Isotope wird das Molekulargewicht der markierten Peptide erhöht, was zu einer entsprechenden Verschiebung des Signals im Massenspektrum führt.

4.1.1 Vergleichende quantitative Proteom-Analyse lysosomaler Proteine in *Cln7 ko* und Wild-Typ MEFs

Nach massenspektrometrischer Analyse erfolgte die Auswertung der erhaltenen Rohdaten zur Identifizierung und Quantifizierung der isolierten Proteine in den *Cln7 ko* und WT MEFs. Bei den proteomischen Analysen wurden insgesamt 3335 Proteine identifiziert. Es wurden die Mehrzahl der bekannten löslichen lysosomalen Proteine (Anzahl: 56) und ca. 20% der bekannten, abundant exprimierten lysosomalen Membranproteine (Anzahl: 29) bei den MS Analysen identifiziert (Tabellen 3 und 4). Aus 4 unabhängigen Markierungsexperimenten wurden die absoluten Mengen der identifizierten lysosomalen Proteine in *Cln7 ko* und WT MEFs quantifiziert und der Quotient der Proteinmengen (*Cln7 ko*/WT) berechnet. Ein Quotient von größer 1,25 wurde als signifikante Erhöhung und ein Quotient von kleiner 0,75 als signifikante Verminderung der Proteinkonzentration festgelegt. Die Berechnung der Quotienten ergab, dass die Mengen von 12 löslichen lysosomalen Proteinen in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT Kontrollzellen vermindert und von 3 löslichen lysosomalen Proteinen erhöht waren (Abb. 4). Die Konzentration der Mehrzahl der identifizierten lysosomalen Proteine (Anzahl: 41) war in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT Kontrollzellen unverändert (Abb. 4). Die Proteine mit erniedrigten Konzentrationen in *Cln7 ko* Lysosomen wurden aufgrund ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt (Glykanabbau: Sialat O-acetylerase (Siae), Aspartylglucosaminidase (Aga), *N*-Acetylglucosamin-6-sulfatase (Gns), Peptidabbau: lysosomale Pro-X Carboxypeptidase (Prp), Carboxypeptidase Q (Cpq), Dipeptidylpeptidase 2 (Dpp7), Lipidabbau: N-

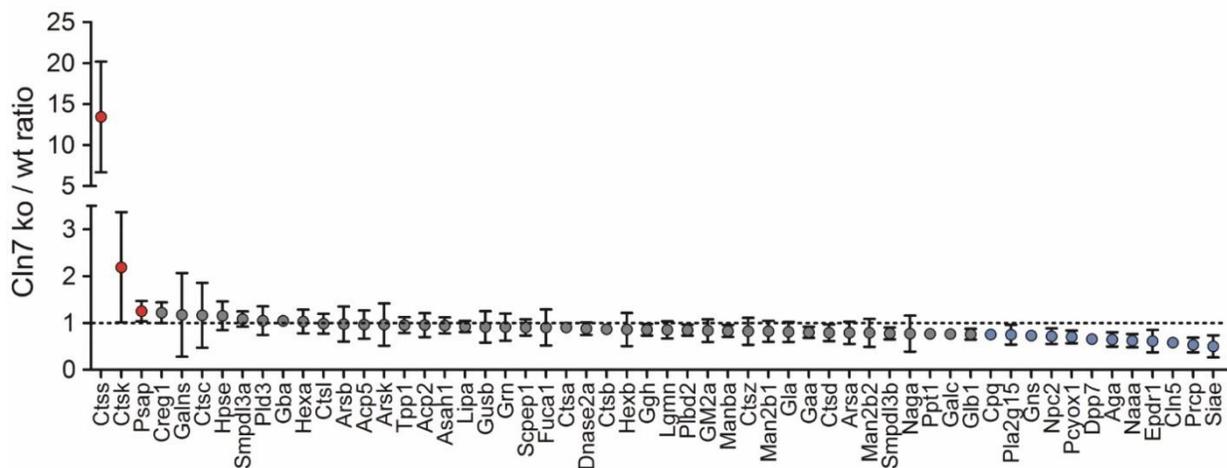


Abbildung 4: SILAC-basierte, vergleichende quantitative Analyse des löslichen lysosomalen Proteoms in WT und *Cln7 ko* MEF

Nach Markierung von kultivierten WT und *Cln7 ko* MEF mit leichten (Arg, Lys) bzw. schweren Isotopen (Arg $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$, Lys $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$) erfolgte eine Inkubation der Zellen in Anwesenheit von Magnetit-Dextran im Medium für 24 Stunden. Nach einer Chase-Periode von 36 Stunden in frischem Medium wurden postnukleare Überstände präpariert und vereinigt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Magnetit-beladenen, intakten Lysosomen durch magnetische Isolation. In der MS Analyse der lysosomalen Fraktionen wurden 56 lösliche lysosomale Proteine identifiziert. Die Abbildung zeigt das relative Verhältnis (*Cln7 ko* / *wt*; Mittelwert \pm SD) der identifizierten lysosomalen Proteine aus 4 unabhängigen SILAC-Experimenten. Lysosomale Proteine mit signifikant erhöhten und verminderten Mengen in *Cln7 ko* MEF sind mit roten bzw. blauen Kreisen dargestellt.

Acylethanolamin-hydrolysierende saure Amidase (Naaa), Gruppe XV Phospholipase A2 (Pla2g15), Abbau von prenilyerten Proteinen: Prenylcysteinoxidase (Pcyox1). Ferner waren die Konzentrationen lysosomaler Proteine mit unbekannter Funktion wie dem Niemann-Pick Typ C2-Protein (Npc2), dem neuronalen Ceroid-Lipofuscin Protein 5 (Cln5) und dem Ependymin-ähnlichen Proteins (Epdr1) in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT MEFs erniedrigt. Die Konzentrationen von drei Proteinen (Cathepsin S (Ctss, 13,4-fach), Cathepsin K (Ctsk, 2,2-fach), Prosaposin (Psap, 1,25-fach) waren in *Cln7 ko*- im Vergleich zu WT-Lysosomen erhöht. Die lysosomalen Cysteinproteasen Ctss und Ctsk spalten antigene Proteine bzw. Proteine der Knochenmatrix, wie Elastin, Kollagen und Gelatin (Vidak et al. 2019). Prosaposin und die prozessierten, aktiven Saposine A-D sind wichtig als Cofaktoren beim lysosomalen Abbau von Sphingolipiden (Breiden und Sandhoff 2019).

4.1.2 Validierung der lysosomalen Proteom-Analyse

Zur Validierung der quantitativen proteomischen Daten wurde die Expression ausgewählter lysosomale Proteine mit veränderter Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen durch Western-Blot-Analysen von Gesamt-Proteinhomogenaten aus WT und *Cln7 ko* MEFs quantifiziert (Abb. 5). Für die Immunblot-Analysen wurden lysosomale Proteine ausgewählt, für die kommerzielle Antikörper verfügbar waren.

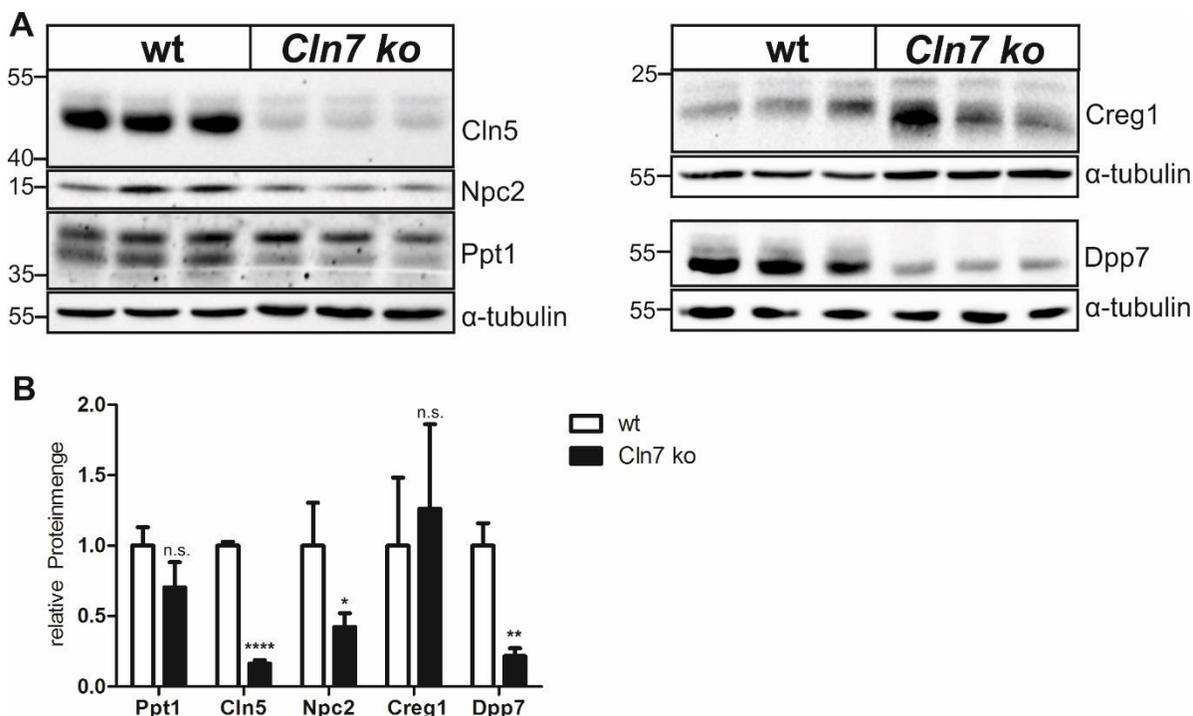


Abbildung 5: Depletion löslicher lysosomaler Proteine in immortalisierten *Cln7 ko* MEF

(A) Validierung der quantitativen Proteom-Daten für dysregulierte lysosomale Proteine in *Cln7 ko* und WT MEFs. Gesamt-Proteinhomogenate (70 μ g Protein) wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und die Expression von Cln5, Npc2, Ppt1, Creg1 und Dpp7 durch Western-Blot-Analyse untersucht. Als Kontrolle für gleichmäßige Proteinladung wurde eine α -Tubulin Immunblot-Analyse durchgeführt. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben. (B) Densitometrische Quantifizierung der Intensitäten der immunreaktiven Banden und Normalisierung der Proteinmengen gegen die Ladekontrolle aus drei unabhängigen Experimenten. Die relativen Proteinmengen in WT MEFs wurden gleich 1 gesetzt und in einem Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung; n.s.: nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

In Übereinstimmung mit den proteomischen Daten waren in *Cln7 ko* MEF im Vergleich zu WT MEF die detektierten Mengen von Cln5 um 84 %, von Npc2 um 57 % und von Dpp7 um 78 % reduziert, wie quantitative Immunblot-Analysen ergaben (Abb. 5B). Die densitometrische Quantifizierung von Cln5 zeigte, dass die reife prozessierte Cln5-Form in *Cln7 ko* MEFs vermindert war, während die Cln5-Proform in *Cln7 ko* MEFs nicht verändert war (Abb. 5).

Obwohl ein Trend zu verminderten Ppt1- und erhöhten Creg1-Konzentrationen in *Cln7 ko* MEFs zu detektieren war, waren die Unterschiede im Vergleich zu WT MEFs statistisch nicht signifikant (Abb. 5). In den quantitativen proteomischen Analysen isolierter Lysosomen waren die *Cln7 ko*/WT-Quotienten der Proteinmengen für Creg 1 (1,22) und Ppt1 (0,77) unterhalb bzw. oberhalb der willkürlich festgelegten Grenzwerte von 1,25 und 0,75 lokalisiert (Tabelle 3).

4.1.3 Quantifizierung der mRNA-Expression dysregulierter lysosomaler Proteine in *Cln7 ko* MEFs

Neben Veränderungen der Biosynthese, der biosynthetischen Prozessierung, der Sekretion und der Proteininstabilität ist es möglich, dass auch Unterschiede in der mRNA-Expression der dysregulierten lysosomalen Proteine zu veränderten steady-state Konzentrationen im Lysosom beitragen. Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen dysregulierter lysosomaler Proteine in WT und *Cln7 ko* MEFs wurden quantitative *real-time* PCR Analysen durchgeführt. Es wurden die mRNA-Expression von Genen mit erhöhter (*Creg1* und *Psap*) bzw. verminderter Proteinexpression (*Ppt1*, *Glb1*, *Npc2*, *Dpp7*, *Aga*, *Naaa*, *Epdr1*, *Cln5*, *Prcp* und *Siae*) in WT und *Cln7 ko* MEFs untersucht.

Die quantitativen *real-time* PCR-Analysen ergaben keine signifikanten Veränderungen der *Cln5*, *Ppt1*, *Prcp*, *Siae*, *Glb1*, *Tpp1* und *Ctsd* mRNA-Expression in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT Kontroll-MEFs (Abb. 6).

Die mRNA-Expression von *Aga*, *Psap*, *Dpp7*, *Arsb* ($p < 0,05$) sowie *Naaa* ($p < 0,01$) und *Epdr1* ($p < 0,001$) war in *Cln7*-defizienten MEFs im Vergleich zu Kontroll-MEFs signifikant reduziert. Die mRNA Konzentration von *Creg1* war in *Cln7 ko* MEFs signifikant ($p < 0,001$) erhöht.

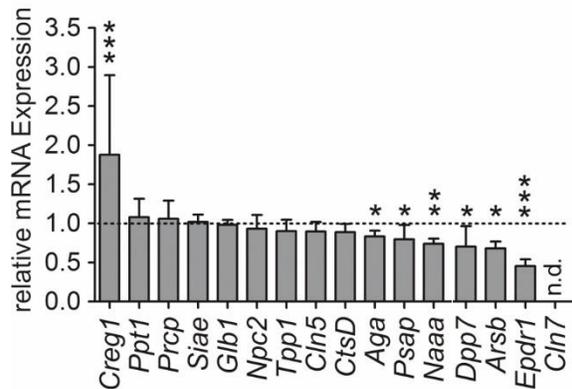


Abbildung 6: Quantitative *real-time* PCR Analyse der mRNA-Expression dysregulierter Proteine in *Cln7 ko* MEF

Die Veränderung der mRNA-Mengen von Proteinen mit erhöhter (*Creg1* und *Psap*) und erniedrigter Expression (*Ppt1*, *Prcp*, *Siae*, *Glb1*, *Npc2*, *Tpp1*, *Cln5*, *CtsD*, *Aga*, *Psap*, *Naaa*, *Irgm1*, *Dpp7*, *Arsb* und *Epdr1*) normalisiert auf die mRNA-Mengen des Kontrollgens *Gapdh* wurden in *Cln7 ko* MEFs relativ zu *Wt* MEFs quantifiziert. Zum Nachweis der Defizienz der *Cln7*-mRNA wurde die *Cln7* mRNA-Expression in *Cln7 ko* MEFs und *Wt* MEFs quantifiziert. Die mRNA-Mengen in *Wt* MEFs wurden gleich 1 gesetzt und das Verhältnis von *Cln7 ko* MEFs zu *Wt* MEFs im Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm Standardabweichung; n.d.: nicht detektierbar; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Daten zeigen, dass für eine Fraktion der lysosomalen Proteine mit veränderter Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen keine veränderte mRNA-Expression der korrespondierenden Gene detektiert wurde. Für *Creg1* und *Aga*, *Dpp7*, *Arsb*, *Naaa*, *Epdr1* wurden eine erhöhte bzw. verminderte mRNA-Expression gefunden, so dass bei diesen Genen eine veränderte mRNA-Expression zur Erhöhung bzw. Depletion auf Proteinebene beiträgt. Interessanterweise war die *Psap* mRNA-Expression in *Cln7 ko* MEFs vermindert, obwohl höhere *Psap*-Proteinkonzentrationen in *Cln7 ko* Lysosomen detektiert wurden.

4.1.4 Depletion der D- und G-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ H⁺ ATPase- Komplexes in *Cln7 ko* Lysosomen

In den quantitativen Proteom-Analysen wurden 29 verschiedene lysosomale Membranproteine identifiziert (Tabelle 4). Es wurden integrale Membranproteine (CD63, *Glmp*, *Itm2c*, *Lamp1*, *Lamp2*, *Laptm4a*, *Limp2*, *Tmem 55a*, *Tmem 55b*, *Tmem 63a*, *Tmem 192*), Transporter (*Clcn7*, *Cystinosin*, *Lyaat1*, *Mfsd1*, *Npc1*, *Sidt2*) und 12 Untereinheiten der vakuoläre Protonen-Adenosinriphosphatase (V-Typ H⁺ ATPase) durch MS identifiziert. Von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Funktionen und die Azidifizierung der Lysosomen ist die V-Typ H⁺ ATPase (Collins und Forgac 2020). Sie transportiert ATP-abhängig Protonen vom Zytosol in das lysosomale Lumen. Das entstehende saure

Milieu in der lysosomalen Matrix ist notwendig für die Aktivierung zahlreicher Enzyme, die am Abbau zahlreicher intra- und extrazellulären Substrate beteiligt sind (Mellman 1992). Die V-Typ H⁺ ATPase ist aus der integralen V0-Domäne und der zytosolischen V1-Domäne zusammengesetzt (Cotter et al. 2015). Die V0-Domäne besitzt bei Eukaryoten 6 verschiedene Untereinheiten (a, d, e, c, c' und Ac45) und die V1-Domäne 8 verschiedene Untereinheiten (A-H, Abb. 7).

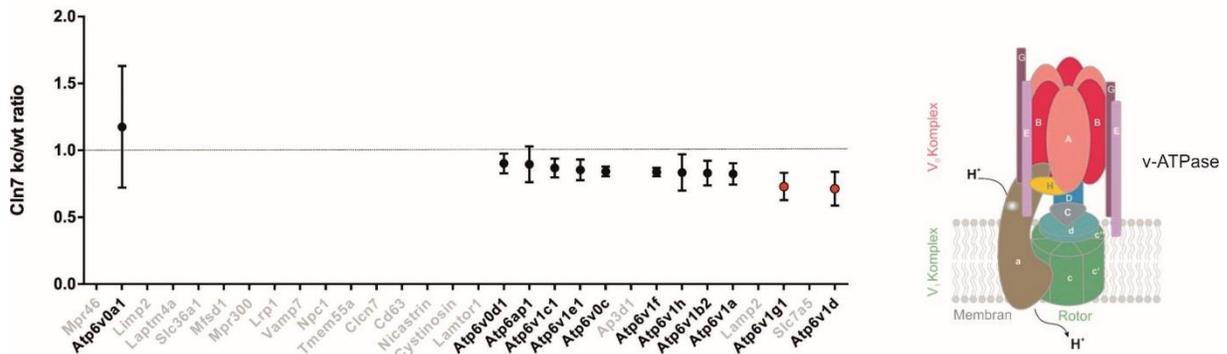


Abbildung 7: Depletion der D- und G-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ H⁺ ATPase Komplexes in *Cln7 ko* Lysosomen

Die Konzentrationen der MS identifizierte Untereinheiten der V0 und V1-Komplexe der V-Typ H⁺ ATPase in *Cln7 ko* MEFs wurden quantifiziert und das Verhältnis (*Cln7 ko* / WT) der Proteinmengen aufgetragen. Dabei wurden Werte aus vier 4 unabhängigen quantitativen Proteom-Analysen berücksichtigt (Mittelwert ± SD). Untereinheiten mit signifikant erniedrigten Konzentrationen in *Cln7 ko* MEFs sind mit roten Kreisen dargestellt.

In den Proteom-Analysen wurden 11 Untereinheiten des V-Typ H⁺ ATPase-Komplexes und eine akzessorische Untereinheit identifiziert: die a1-, c- und d-Untereinheiten der V0-Domäne, die A-, B2-, C1-, D-, E1-, F-, G1- und H-Untereinheiten der V1-Domäne und die akzessorische S1-Untereinheit (Abb. 7, Tabelle 4). In den proteomischen Analysen wurde eine 0,73-fache Verminderung der G1-Untereinheit und eine 0,71-fache Verminderung der D-Untereinheit der V1-Domäne in *Cln7 ko* Lysosomen im Vergleich zu WT Lysosomen detektiert. (Abb. 7, Tabelle 4).

4.1.5 Depletion von *Cln5* in verschiedenen *Cln7 ko* Zellen und Gehirngewebe

Zur Analyse, ob die Depletion in *Cln7 ko* Fibroblasten Zelltyp- und Spezies-spezifisch war, wurden weitere Immunblot-Analysen an humanen haploiden (HAP1) *Cln7 ko* Zellen und an primären *Cln7 ko* Makrophagen der Maus durchgeführt. Zusätzlich wurde die *Cln5*-Expression in *Cln7 ko* Maushirnen analysiert (Abb. 8).

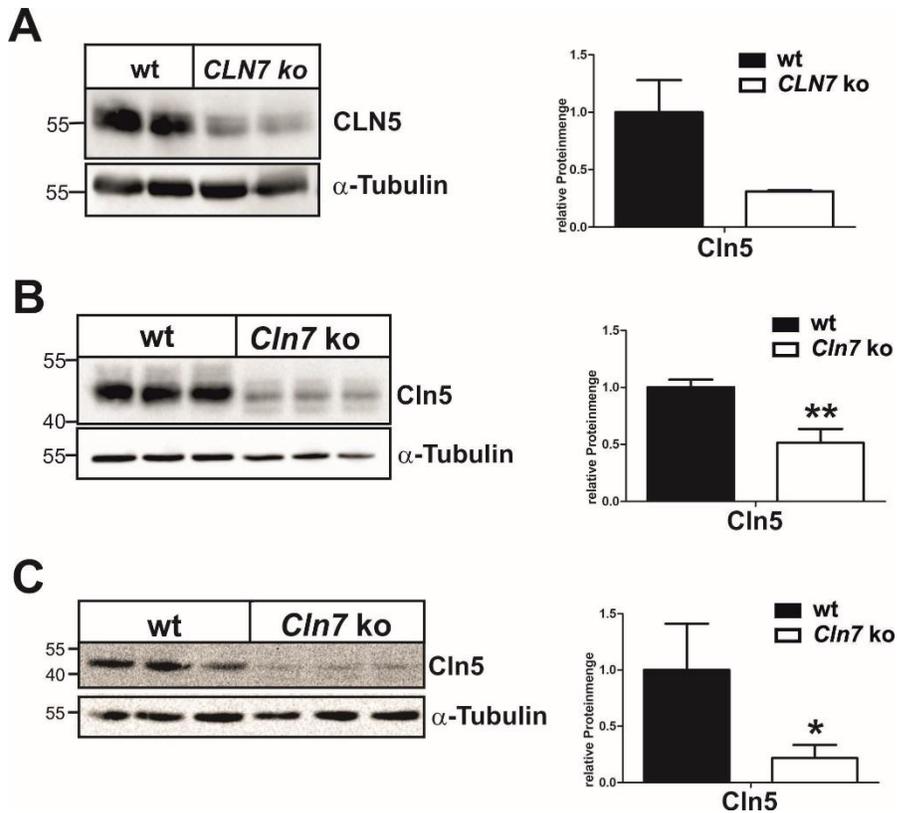


Abbildung 8: Depletion von Cln5 in humanen haploiden *CLN7 ko* HAP1-Zellen, in murinen *Cln7 ko* Makrophagen und in murinem *Cln7 ko* Hirngewebe

Gesamt-Proteinhomogenate aus (A) *Cln7 ko* HAP1-Zellen, (B) primären *Cln7 ko* Makrophagen, und (C) Gehirnen von 10 Monate alten *Cln7 ko* und altersgleichen WT Mäusen wurde durch Cln5-Western-Blotting analysiert. Als Kontrollen für die gleichmäßige Beladung wurden α -Tubulin Immunblots durchgeführt. Die Intensität der immunreaktiven Banden wurde densitometrisch quantifiziert. Die relativen Cln5-Protein-Mengen normalisiert auf die α -Tubulin-Mengen sind im Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert \pm SD). (n=2 (A), n=3 (B), n=5 (C); *p<0,05, **p<0,01).

Die densitometrische Quantifizierung der immunreaktiven Banden zeigte, dass die Cln5-Expression in *Cln7 ko* HAP-Zellen um 70 %, in primären *Cln7 ko* Makrophagen um 50 % und in *Cln7 ko* Gehirnen um 80 % im Vergleich zu WT Kontrollen vermindert waren (Abb. 8). Die Untersuchungen zeigen, dass die Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* MEFs nicht Zelltyp- und Spezies- spezifisch war, sondern auch in humanen *Cln7 ko* HAP1-Zellen, in primären *Cln7 ko* Makrophagen und in *Cln7 ko* Maushirn zu detektieren war.

4.1.6 Unveränderter intrazellulärer Transport von Cln5 in *Cln7 ko* MEF

Der biosynthetische Transportweg neusynthetisierter löslicher lysosomale Enzyme umfasst die Synthese des Mannose-6-Phosphat-Erkennungsmarkers im Golgi-Apparat, die Bindung an die M6P-Rezeptoren im TGN, den Transport der M6P-Rezeptor-Protein-Komplexe zu endosomalen Kompartimenten und die

proteolytische Aktivierung der Enzyme in Lysosomen. Variable Anteile neusynthetisierter lysosomaler Proteine (5-10 %) werden ins Medium sezerniert und anschließend durch den 300 kDa M6P-Rezeptor internalisiert (Braulke und Bonifacino 2009). Zur Analyse, ob eine Missortierung ins Medium zur Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* Lysosomen beiträgt, wurden die Cln5-Mengen in Lysosomenangereicherten Fraktionen (LF), Gesamtproteinhomogenaten (Zellen) und in Medienüberständen (Medium) durch Immunblot-Analysen quantifiziert (Abb. 9A).

Sowohl in den Gesamtproteinhomogenaten als auch in den Lysosomenangereicherten Fraktionen von *Cln7 ko* und WT MEFs wurden eine 55 kDa Cln5-Proform und eine prozessierte 50 kDa reife Cln5-Form detektiert, was den korrekten biosynthetischen Transport und die proteolytische Prozessierung von Cln5 in Lysosomen in Abwesenheit von Cln7 zeigte (Abb. 9A). In Übereinstimmung mit den quantitativen proteomischen Daten (Abb. 4) und den Immunblot-Analysen (Abb. 5A) waren die Cln5-Mengen in Gesamtproteinhomogenaten und LF in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT MEFs vermindert (Abb. 9A). In den Medienüberständen von WT und *Cln7 ko* MEFs wurde wie erwartet nur die nicht-prozessierte 55 kDa Cln5-Proform detektiert. In den WT und *Cln7 ko* MEF-Zellen wurden 25% bzw. 22% der Cln5-Gesamtproteinmenge in den Medien detektiert (Abb. 9B). Die Tendenz zu einer verminderten Sekretion von Cln5 ins Medium in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT MEFs war jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre lysosomale Depletion von Cln5 nicht auf eine vermehrte Sekretion von Cln5 ins Medium zurückzuführen ist. Ferner zeigen die Daten, dass der Transport von Cln5 zu Lysosomen und die proteolytische Prozessierung der Cln5-Proform in die reife Cln5-Form in Abwesenheit von funktionellem Cln7 nicht gestört sind.

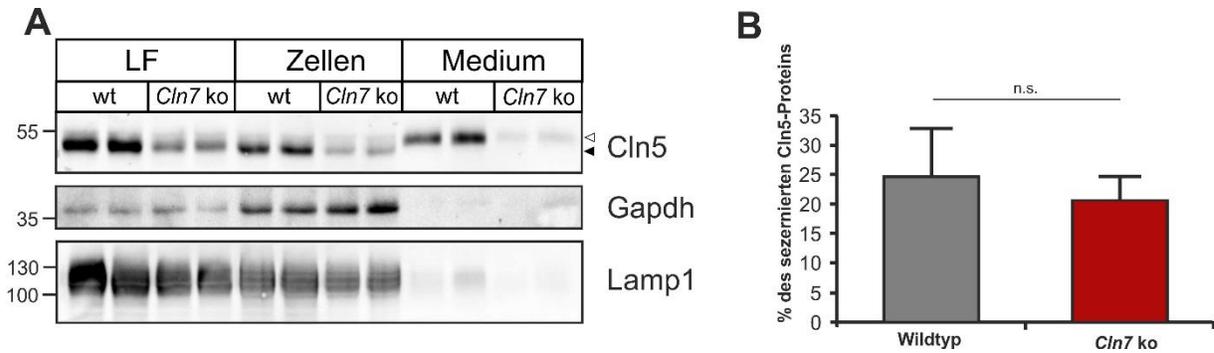


Abbildung 9: Unveränderter intrazellulärer Transport von Cln5 in *Cln7 ko* MEF

(A) Zur Bestimmung der sezernierten Cln5-Fraktion wurden immortalisierte WT und *Cln7 ko* MEF für 24 h in Opti-MEM Medium kultiviert und die konditionierten Medien gesammelt. Nach Lyse der Zellen wurden Lysosomen-angereicherte Fraktionen (LF) und Gesamtproteinhomogenate (Zellen) isoliert. LF (50 µg Protein), Gesamtproteinhomogenate (100 µg Protein) und konditionierte Medien (Medium, 20%) wurden durch Cln5-Immunblot analysiert. Zur Bestimmung der Reinheit (LF und Medienüberstände) und der gleichmäßigen Beladung des Gels (LF und Gesamtproteinhomogenate) wurden Lamp1 und Gapdh Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Positionen der Vorläufer-Cln5-Formen (weißer Pfeilkopf), der reifen Cln5-Formen (schwarzer Pfeilkopf) und der molaren Massen der Markerproteine (in kDa) sind angegeben. (B) Dargestellt ist die densitometrische Quantifizierung der Intensität der immunreaktiven Banden von 4 unabhängigen Experimenten. Der Anteil der sezernierten Cln5-Vorläuferform (in %) in Relation zur gesamten Cln5-Proteinmenge (intrazellulär und extrazellulär) in WT (grau) und *Cln7 ko*-Zellen (rot) ist im Balkendiagramm dargestellt (Mittelwert ± Standardabweichung; n.s.: nicht signifikant).

4.1.7 Depletion von Cln5 durch Cysteinprotease-vermittelten Abbau in *Cln7 ko*

Lysosomen

Um zu überprüfen, ob ein erhöhter intralysosomaler Cln5-Proteinabbau zur Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* Lysosomen beiträgt, wurden lysosomale Cysteinproteasen und Aspartylproteasen durch Zugabe spezifischer Inhibitoren (Leupeptin, E64 bzw. Pepstatin A) ins Medium gehemmt. Cystein- und Aspartylproteasen sind wichtig für den konstitutiven Abbau von Proteinsubstraten in den Lysosomen. Dabei spalten sie innerhalb eines Proteins Peptidbindungen durch Hydrolyse bzw. durch einen Katalyse-Mechanismus (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). Nach einer Inkubation der Zellen in Ab- oder Anwesenheit der Cysteinprotease- oder Aspartylprotease-Inhibitoren für 20 h wurden die Cln5-Konzentrationen durch Immunblot-Analysen von Gesamt-Proteinhomogenaten aus *Cln7 ko* und WT MEFs quantifiziert (Abb. 10).

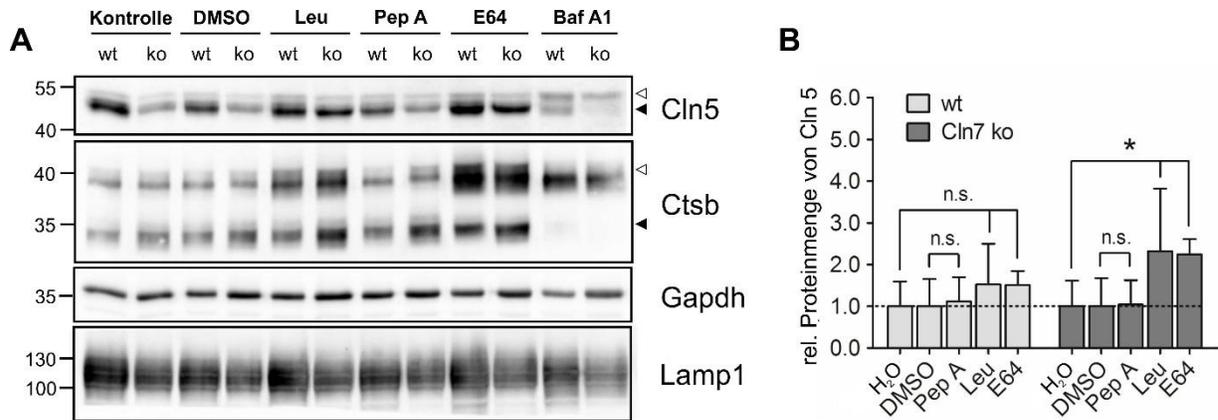


Abbildung 10: Depletion von Cln5 durch Cysteinprotease-vermittelten Abbau in *Cln7 ko* Lysosomen

(A) Wt und *Cln7 ko* MEF-Zellen wurden in Anwesenheit von Leupeptin (Leu, 100 µg), Pepstatin (Pep A, 30 µg), E64 (50 µg) oder Bafilomycin A1 (Baf A1, 100 nm) im Medium für 20 h inkubiert. Nicht behandelte (Kontrolle) oder in Dimethylsulfoxid (DMSO) kultivierte Zellen dienten als Negativkontrollen für Leupeptin/ E64 bzw. Pepstatin/ Bafilomycin A1. Gesamt-Proteinhomogenate (75 µg Protein) wurden durch Cln5-, Cathepsin B- (Ctsb) und Lamp1- Immunblot analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung wurde ein Gapdh-Western-Blot durchgeführt. Die Positionen der Vorläufer (weißer Pfeilkopf), und reifen Proteinformen (schwarzer Pfeilkopf) sind angegeben. Die molaren Massen der Markerproteine (in kDa) sind dargestellt. (B) Densitometrische Quantifizierung der immunreaktiven Banden von drei unabhängigen Experimenten. Die relative Cln5-Proteinmenge im Verhältnis zu Wasser- oder DMSO-Kontrollen wurde berechnet und im Balkendiagramm (Mittelwert ± Standardabweichung) dargestellt (n.s.: nicht signifikant; *p < 0,05).

Die densitometrische Auswertung der immunreaktiven Cln5-Banden zeigte, dass die Inhibierung lysosomaler Cysteinproteasen durch Leupeptin oder E64 zu einer Stabilisierung der reifen Cln5-Formen in WT und *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu nicht-inhibierten Kontrollzellen führte (Abb. 10B). Der Anstieg der Cln5-Konzentrationen war jedoch nur in *Cln7 ko* MEFs signifikant (*p < 0,05). Nach Hemmung von Aspartyl-Proteasen durch Pepstatin A wurde keine Stabilisierung der reifen Cln5-Formen in WT und *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu nicht-inhibierten Kontrollzellen detektiert. Die Inhibierung der lysosomalen Azidifizierung durch Bafilomycin A1, einem V-Typ H⁺ ATPase-Inhibitor, führte zu einer Hemmung der proteolytischen Prozessierung der Proformen in die reifen Cln5- und Cathepsin B (Ctsb)-Formen in WT und *Cln7 ko* MEFs (Abb. 10A). Die Daten zeigen, dass der verstärkte proteolytische Abbau durch lysosomale Cysteinproteasen zur Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* Lysosomen beiträgt.

4.2 Analyse lysosomaler Kompartimente in primären *Cln7 ko* Makrophagen

Makrophagen kommen in allen Geweben vor und weisen eine große funktionelle Vielfalt auf. So spielen sie unter anderem eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, in der Homöostase und der Gewebereparatur (Wynn et al. 2013). Die Isolierung primärer Makrophagen erfolgte aus dem Knochenmark von 20 Wochen alten *Cln7 ko* und altersgleicher Wild-Typ Mäuse. Dazu wurde das isolierte Knochenmark mit BMM (*bone marrow microenvironment*)-Zellen für 10-14 Tage in RPMI-Medium, welches mit M-CSF (50 ng/ml) supplementiert wurde, kultiviert, bis primäre Makrophagen ausdifferenziert waren. Primäre Zellen entsprechen im Vergleich zu immortalisierten Zelllinien morphologisch und biochemisch eher der Situation *in vivo*.

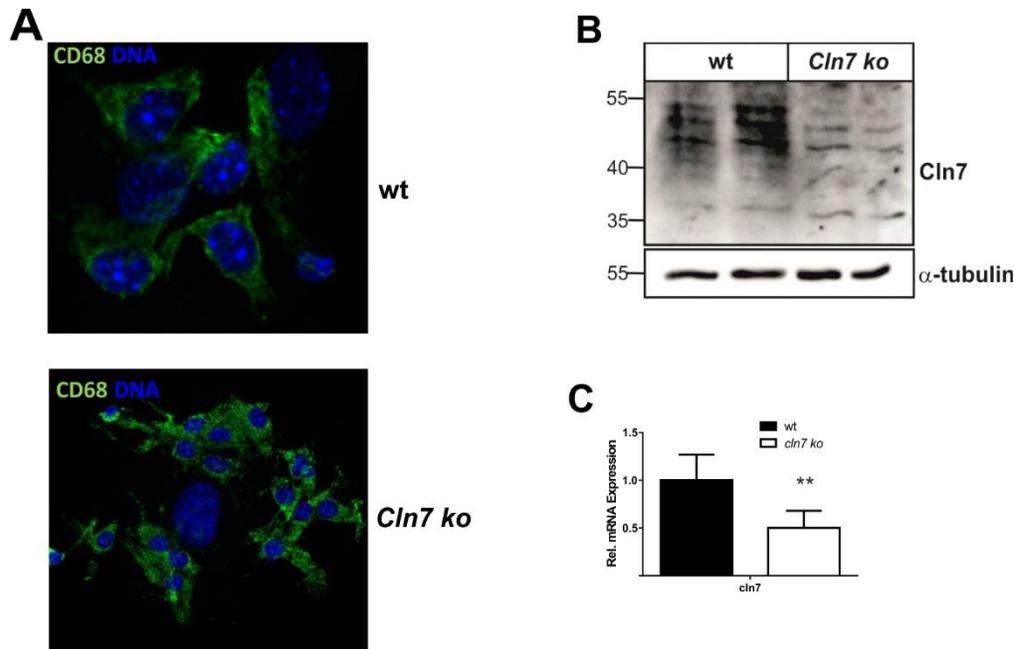


Abbildung 11: Charakterisierung kultivierter primärer *Cln7 ko* Makrophagen

(A) Primäre kultivierte *Wt* und *Cln7 ko* Makrophagen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen das Makrophagen-spezifische Oberflächenantigen CD68 (grün) und den Kernmarker DAPI (violett) inkubiert. Nach Inkubation mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte eine qualitative Analyse durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie. (B) BMM-Zellysate aus 2 unabhängigen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch *Cln7*-Western-Blotting analysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben. (C) Quantifizierung der relativen *Cln7*-mRNA-Expression in *WT* und *Cln7 ko* Makrophagen mittels quantitativer *real-time* PCR. Zur Normalisierung der *Cln7* mRNA-Expression wurde eine Quantifizierung der *Gapdh* mRNA durchgeführt.

Zur Charakterisierung der primären Makrophagen wurden Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit Antikörpern gegen das Makrophagen-spezifische Oberflächenantigen CD68 durchgeführt (Abb. 11A).

Sämtliche primären Makrophagen aus *Cln7 ko* und WT Mäusen waren positiv für den Makrophagenmarker CD68, was die Differenzierung zu Makrophagen bestätigte. In Immunblot-Analysen von Gesamtextrakten wurde eine immunoreaktive Bande mit molaren Massen zwischen ~ 45-55 kDa in WT Makrophagen detektiert, die in Extrakten aus *Cln7 ko* Makrophagen schwächer war (Abb. 11B). Quantitative *real-time* PCR Analysen zeigten eine Reduktion der *Cln7* mRNA in *Cln7 ko* Makrophagen um 50% im Vergleich zu WT Makrophagen (Abb. 11C).

4.2.1 Expressionsanalysen lysosomaler Cathepsine und von Cathepsin S-Substraten in *Cln7 ko* Makrophagen

Lysosomen enthalten eine Vielzahl von Proteasen, von denen Cathepsine einen wesentlichen Anteil ausmachen. Cathepsine spielen neben ihrer Hauptfunktion beim lysosomalen Proteinabbau und -recycling eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen wie der Antigenprozessierung und -präsentation, die für eine wirksame adaptive Immunität wichtig sind (Bird et al. 2009). Extrazelluläre Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen, wie B-Zellen, dendritischen Zellen oder Makrophagen aufgenommen und in den Lysosomen proteolytisch zu Peptiden gespalten. Die Peptide werden anschließend an MHC Klasse II-Komplexe gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert (Löffler 1998). Cathepsin S ist am proteolytischen Abbau von CD74 beteiligt, einem Oberflächenprotein, welches mit dem MHC II-Komplex im endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist, um eine vorzeitige Antigenbindung zu verhindern (Abb. 12, Honey und Rudensky 2003).

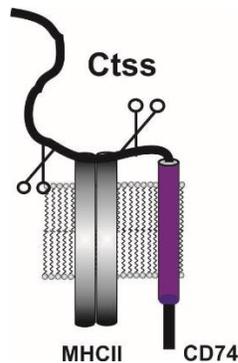


Abbildung 12: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von CD74 durch Cathepsin S

Das Membranprotein CD74 bindet kotranslational an MHCII-Komplexe im endoplasmatischen Retikulum. Die Bindung von CD74 an MHCII verhindert die frühzeitige Antigenbindung in prälysosomalen Kompartimenten. In endosomalen/lysosomalen Kompartimenten erfolgt die proteolytische Spaltung von CD74 durch Cathepsin S in ein membranständiges Class-II-Invariant-chain-Peptid (CLIP)-Fragment (lila).

In den quantitativen proteomischen Analysen wurde eine erhöhte Konzentration der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin S (Ctss) in den *Cln7 ko* Lysosomen detektiert (Abb. 4). Die Ctss-Erhöhung war von allen untersuchten löslichen lysosomalen Proteinen (13,4-fach \pm 6,75) am stärksten. Da Ctss eine wichtige Funktion in Antigen-präsentierenden Zellen besitzt, wurde die Ctss-Expression in primären *Cln7 ko* Makrophagen analysiert. Zusätzlich wurde die Konzentration des Ctss-Substrats CD74 in *Cln7 ko* Makrophagen untersucht. In Gesamt-Proteinhomogenaten von *Cln7 ko* Makrophagen wurden

2,5-fach erhöhte Mengen der 25 kDa Cathepsin S-Form im Vergleich zu Homogenaten aus WT Makrophagen gefunden (Abb. 13A). In den *Cln7 ko* Makrophagen war die Expression der 33 kDa CD74-Bande im Vergleich zu WT Makrophagen erhöht. Zusätzlich wurde in den *Cln7 ko* Makrophagen eine 10-12 kDa CD74-Doppelbande detektiert, die in WT Makrophagen nicht gefunden wurde (Abb. 13A).

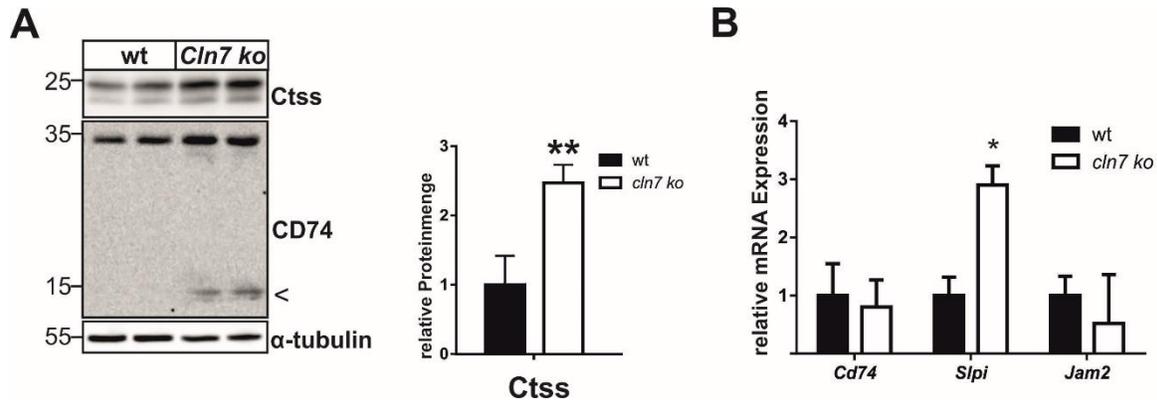


Abbildung 13: Erhöhte Cathepsin S-Expression und Analyse der mRNA-Konzentrationen von Cathepsin S Substraten in *Cln7 ko* Makrophagen

(A) Gesamt-Proteinextrakte (40 μ g Protein) aus 2 unabhängigen WT und *Cln7 ko* Makrophagenkulturen wurden nach SDS-PAGE Auftrennung durch Ctss- und CD74- Immunblot analysiert. α -Tubulin Western-Blotting diente als Ladekontrolle. Die densitometrische Quantifizierung der immunreaktiven Banden und Normalisierung auf den Gehalt von α -Tubulin zeigte einen 2,5-fachen Anstieg von Ctss in *Cln7 ko* Makrophagen im Vergleich zu WT Kontrollmakrophagen. Im CD74-Western-Blotting zeigten sich akkumulierte, degradierte Zwischenstufen in *Cln7 ko* Makrophagen (Pfeil). (B) Relative mRNA Expression ausgewählter Cathepsin S- Substrate wie *Cd74*, *Slpi* und *Jam2* in *Cln7 ko* Makrophagen (weißer Balken) im Vergleich zur *wt* Kontrolle (schwarzer Balken) (Mittelwert \pm SD, n=3, *p<0,05).

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Genexpression ausgewählter Ctss-Substrate in *Cln7 ko* Makrophagen (Abb. 13B). Zu diesen zählen neben CD74 das junctionale Adhäsionsmolekül B (JAM-B), ein Adhäsionsmolekül an der Blut-Hirn-Schranke, und der sekretorische Leukozyten Protease-Inhibitor (*secretory leukocyte protease inhibitor* (*Slpi*)), der eine zentrale Rolle beim Elastin-Abbau in der Lunge spielt (Wilkinson et al. 2015). Während die *CD74* und *JAM-B* mRNA-Expression in *Cln7 ko* und WT Makrophagen vergleichbar waren, waren die *Slpi*-mRNA-Mengen signifikant 2,9-fach in *Cln7 ko* im Vergleich zu WT Makrophagen erhöht (Abb. 13B).

In früheren Untersuchungen wurden erhöhte *Cathepsin B*-, *D*-, und *Z*-mRNA und Protein-Konzentrationen in Gehirnen von 10 Monate alten *Cln7 ko* Mäusen im Vergleich zu altersgleichen Wild-Typ-Mäusen gefunden (Brandenstein et al. 2016). Zur Analyse, ob erhöhte Konzentrationen von Cathepsinen auch in phagozytierenden und antigenpräsentierenden *Cln7 ko* Zellen zu detektieren sind, wurden primäre *Cln7 ko* Makrophagen untersucht. In den Immunblot-Analysen von Gesamtprotein-

Extrakten wurden 38 kDa-Vorläufer und 33 kDa reife Ctsb-Formen in *Cln7 ko* und WT Zellen detektiert (Abb. 14A). Die Ctsb-Mengen in den primären *Cln7 ko* Makrophagen waren im Vergleich zu WT Makrophagen nicht signifikant verändert (Abb. 14B). In Western-Blot-Analysen wurden 38 kDa Vorläufer-, 33 kDa Intermediär- und 20 kDa reife Ctss-Formen in *Cln7 ko* und WT Makrophagen gefunden. Die Ctss-Mengen waren in *Cln7 ko* Makrophagen nicht signifikant verändert im Vergleich zu WT Makrophagen. Die Ctsz-Expression war in *Cln7 ko* Makrophagen ebenfalls nicht signifikant verändert im Vergleich zu Kontrollmakrophagen (Abb. 14A und B). Die Ctss-Proteinexpression in *Cln7 ko* Makrophagen war 0,6-fach reduziert im Vergleich zu WT Makrophagen. Die Reduzierung der Ctss-Intermediärformen war in *Cln7 ko* Makrophagen am stärksten. Die proteolytische Prozessierung der Ctss-Vorläuferformen zu den Intermediär und reifen Formen war in Abwesenheit von Cln7 nicht verändert. Quantitative *real-time* PCR-Analysen zeigten einen Trend zu erhöhter *Ctsb*, *Ctss*, *Ctss* und *Ctss* mRNA-Expression in *Cln7 ko* im Vergleich zu WT Makrophagen, der jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 14C). Die *Ctsz* mRNA-Konzentrationen waren in *Cln7 ko* Makrophagen signifikant erhöht im Vergleich zu WT Makrophagen.

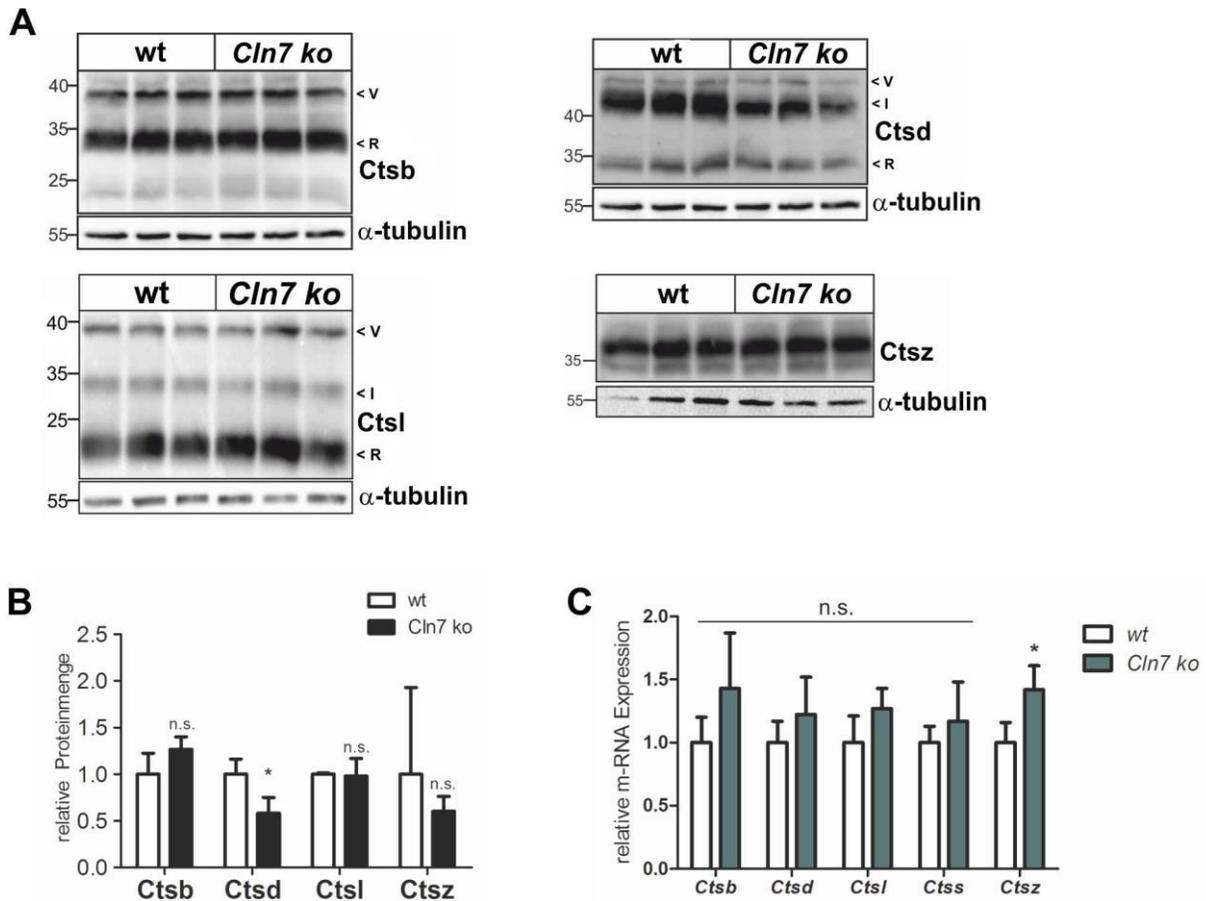


Abbildung 14: Verminderte Cathepsin D Proteinexpression in primären *Cln7 ko* Makrophagen

(A) Gesamt-Proteinhomogenate (35 µg Protein), gewonnen aus 3 unabhängigen Präparationen primärer kultivierter Makrophagen aus 5 Monate alten WT und *Cln7 ko* Mäusen, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Cathepsin B (Ctsb), Cathepsin D (Ctsd), Cathepsin Z (Ctsz) und Cathepsin L (Ctsl) Immunblot analysiert. Als Ladekontrolle wurde ein α -Tubulin Western-Blot durchgeführt. Die Positionen der Vorläufer (V), intermediären (I) und reifen (R) Cathepsin-formen und die molaren Massen der Markerproteine (in kDa) sind dargestellt. (B) Die Intensitäten der immunreaktiven Banden wurde densitometrisch quantifiziert und die relativen Proteinmengen der Cathepsine normalisiert auf die Ladekontrolle im Balkendiagramm dargestellt. Die relativen Ctsb-, Ctsd-, Ctsl- und Ctsz-Mengen in WT Makrophagen wurden gleich 1 gesetzt (n.s. nicht signifikant, * $p < 0,05$). (C) Aus den kultivierten wt und *Cln7 ko* Makrophagen wurde mRNA isoliert und die *Ctsb*, *Ctsd*, *Ctsl*, *Ctsz* mRNA-Expression durch quantitative *real-time* PCR analysiert. Die relative mRNA-Expression der Cathepsine, normalisiert auf die Menge an *Gapdh* mRNA, ist im Balkendiagramm dargestellt, wobei die relative Cathepsin mRNA-Expression in wt Makrophagen gleich 1 gesetzt wurde (n.s. nicht signifikant, * $p < 0,05$).

4.2.2 Speicherung der Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase in *Cln7 ko* Makrophagen

Ein Merkmal der NCLs und der CLN7-Erkrankung ist die Akkumulation von Speichermaterial im Gehirn und peripheren Organen (Mole et al. 2011). Während bei den CLN1- und CLN10-Erkrankungen

die Sphingolipid-Aktivator-Proteine (Saposin) A und D akkumulieren, ist bei den anderen NCLs die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase (SCMAS) die Hauptprotein-komponente des Speichermaterials (Radke et al. 2015). SCMAS wurde auch in Neuronen unterschiedlicher Gehirnregionen, im Herz, in der Niere und in der Leber von 10 Monate alten *Cln7 ko* Mäusen detektiert (Brandenstein et al. 2016). Um zu analysieren, ob das Speichermaterial in *Cln7 ko* Makrophagen Saposin A/D oder SCMAS enthält, wurden TX-100-unlösliche Fraktionen aus Extrakten von Makrophagen präpariert und anschließend durch Saposin D und SCMAS-Immunblot untersucht. In den TX-100-unlöslichen Proteinextrakten aus WT und *Cln7 ko* Makrophagen wurden eine 70 kDa Vorläufer-Prosaposin-Form und eine 10 kDa prozessierte Saposin D-Form in der Immunblot Analyse detektiert (Abb. 15A). Die Mengen an Prosaposin und Saposin D waren in den TX100-unlöslichen Extrakten der *Cln7 ko* Makrophagen im Vergleich zu WT Makrophagen nicht verändert (Abb. 15A).

In den TX100-unlöslichen Fraktionen der *Cln7 ko* Makrophagen wurde die 10 kDa SCMAS detektiert, die in den Extrakten von WT Zellen nicht gefunden wurde (Abb. 15B). Die Daten zeigen, dass in kultivierten *Cln7 ko* Makrophagen SCMAS, nicht jedoch Saposin D Proteinbestandteil des Speichermaterials ist.

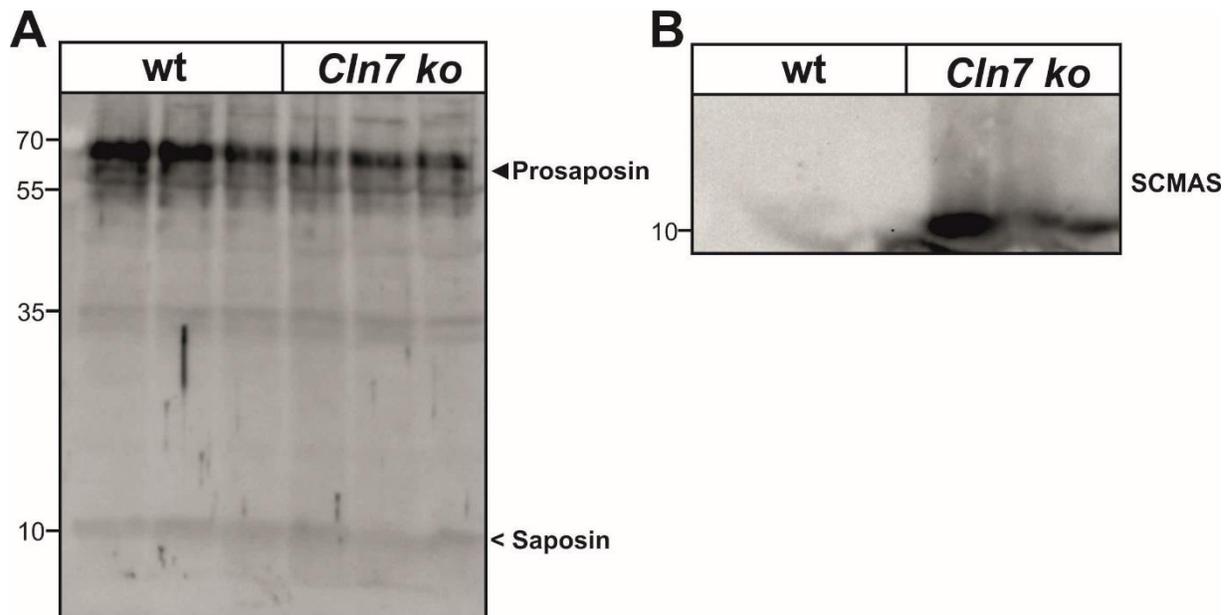


Abbildung 15: Akkumulation von SCMAS in primären *Cln7 ko* Makrophagen

Primäre wt und *Cln7 ko* Makrophagen wurden für 13 Tage kultiviert und die Zellen anschliessend lysiert. Aliquots TX100-unlöslicher Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Saposin D-Immunblot (Acrylamidkonzentration: 12,5%) und (B) SCMAS-Immunblot (Acrylamidkonzentration: 15%). Die Position der Molekulargewichtsmarker und der Prosaposin- (Pfeil) und Saposin D-Formen (Pfeilkopf) sind eingezeichnet. Die Lademengen wurden an die Konzentration der TX100-löslichen Fraktion angepasst.

4.3 Identifizierung von potenziellen Interaktionspartnern des CLN7-Proteins

In der Literatur sind vielfältige Methoden beschrieben, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Dazu gehören unter anderem die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SRP), Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET), isothermale Titrationskalorimetrie (ITC), Proteinfragment-Komplementations-Assays (PCA), verschiedene Two-Hybrid-Systeme, Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP), chemisches Crosslinking, Proximity-Labeling mit Biotin-Ligase-Fusionsproteinen und Ko-Immunpräzipitation (Berggård et al. 2007).

Durch Hochdurchsatzanalysen wurden bisher 28 Interaktionspartner des humanen CLN7-Proteins identifiziert (<https://thebiogrid.org/129168/summary/>, Huttlin et al. 2017; Huttlin et al. 2015). Es ist jedoch unklar, ob die gefundenen Interaktionen funktionell wichtig sind. Zur Identifizierung von CLN7-Protein-Interaktionspartnern, die möglicherweise zu einem besseren Verständnis der unbekannt CLN7-Funktion oder seiner möglichen Bedeutung für Signal- oder Reaktionskaskaden beitragen, wurden Kopräzipitationsanalysen aus Proteinextrakten von GFP-CLN7 überexprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt (Abb. 18). Im Rahmen der Interaktionsanalysen wurde auch überprüft, ob CLN7 in dimerer oder oligomerer Form in der lysosomalen Membran vorliegt.

Zur Immunpräzipitation wurde ein GFP-Epitop-Tag an den N-Terminus von CLN7 fusioniert. Durch die Fusion sind GFP und die N-terminalen 40 Aminosäuren von CLN7 im Zytosol lokalisiert. Die N-terminale Fusion von GFP verändert die intrazelluläre Lokalisation des CLN7-Fusionsproteins im Lysosom nicht und erlaubt die Verwendung von hochspezifischen und hochaffinen anti-GFP-Einzeldomänen-Antikörpern zur Immunpräzipitation von GFP-CLN7 (Steenhuis et al. 2010). Der GFP-Epitop-Tag erlaubt die Quantifizierung der Transfektions-Effizienz durch FACS- oder Immunfluoreszenz-Analysen.

4.3.1 Immunpräzipitation von GFP-CLN7 und massenspektrometrische Analyse der interagierenden Proteine

In Vorversuchen wurde überprüft, ob sich GFP-CLN7 in HEK293-Zellen überexprimieren und nach Zelllyse mit GFP-Trap *Beads* präzipitieren lässt. HEK293-Zellen wurden transient mit der GFP-CLN7 cDNA transfiziert und nach Lyse der Zellen wurde eine Mitochondrien/Lysosomen-angereicherte Fraktion präpariert. Nach Lyse der Mitochondrien/Lysosomen-Fraktion erfolgte eine Immunpräzipitation der GFP-CLN7-Fusionsproteine durch GFP-Trap *Beads* (Abb. 16).

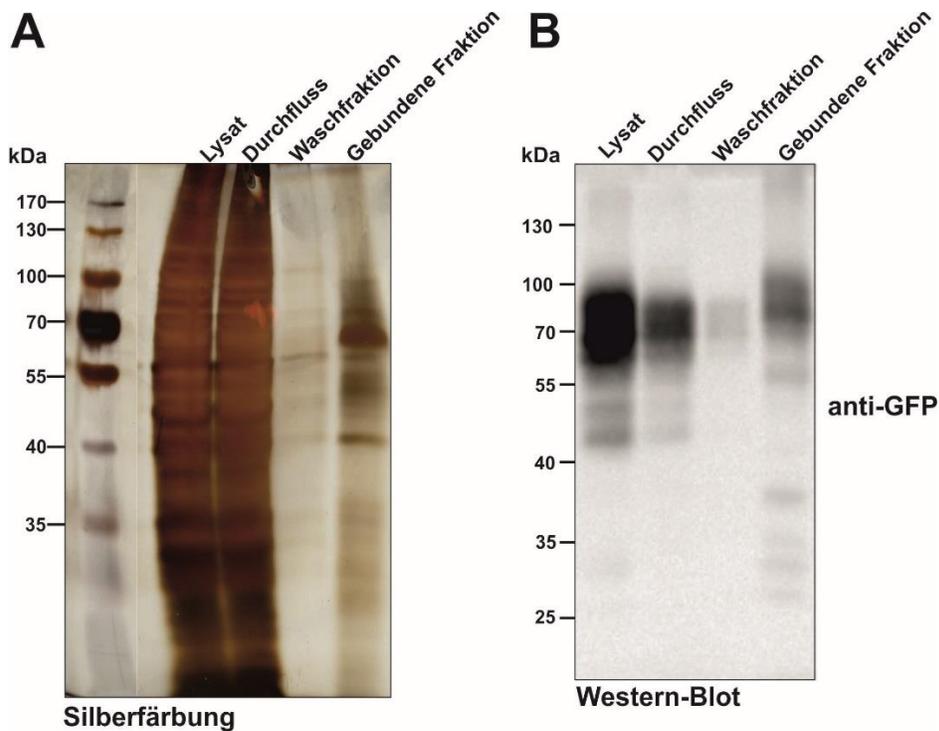


Abbildung 16: Immunpräzipitation von GFP-CLN7 und Identifizierung potenzieller Interaktionspartner

HEK293-Zellen wurden mit der GFP-CLN7 cDNA transient transfiziert. Nach Lyse der Zellen und Isolierung einer mitochondrialen/lysosomalen Membranfraktion (Lysat) wurde GFP-CLN7 mit GFP-Trap *Beads* immunpräzipitiert. Nach Waschen der *Beads* wurden GFP-CLN7 und gebundene Proteine durch Hitzedenaturierung bei 95°C unter reduzierenden Bedingungen eluiert. Mittels SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung der Membranfraktion (5% vom Lysat), der nicht an GFP-CLN7 gebundenen Fraktion (10% vom Durchfluss), der Waschfraktion (10%) und der gebundenen Fraktion (20%). (A) GFP-CLN7 und potenzielle Interaktionspartner wurden mit einer Silberfärbung nach Blum visualisiert. (B) GFP-CLN7 Western-Blot-Analyse. Aliquots des Lysates, des Durchflusses, der Waschfraktion und der gebundenen Fraktion wurden zur Detektion des GFP-CLN7 Fusionsproteins in GFP-Immunblots analysiert. Die molaren Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

Zur Analyse der Expression und Aufreinigung der GFP-CLN7-Fusionsproteine wurden Aliquots des Lysates, des Durchflusses, der Waschfraktion und der eluierten Fraktion durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung dargestellt (Abb. 16A). In der eluierten Fraktion wurden zwei Hauptbanden von ca. 70 kDa und 40 kDa durch Silberfärbung detektiert (Abb. 16A, Spur 4). Neben diesen Hauptbanden waren noch weitere Banden mit molaren Massen zwischen 10 kDa und 100 kDa angefärbt. Zusätzlich wurden für die Analyse der GFP-CLN7-Expression und der Effizienz der GFP-Trap-Aufreinigung GFP-Immunblot-Analysen durchgeführt (Abb. 16B). In diesen Western-Blot-Analysen wurde eine 60-90 kDa immunreaktive Bande in den Lysaten detektiert, die dem GFP-CLN7-Protein entspricht (Abb. 16B, Spur 1). Die Analyse des Durchflusses zeigte, dass GFP-CLN7 unter den

Versuchsbedingungen nicht quantitativ von der GFP-Trap-Matrix gebunden wurde (Abb. 16B, Spur 2). In der gebundenen Fraktion wurde eine 70-100 kDa GFP-CLN7 Bande detektiert. In der Silber-Färbung war die präzipitierte 70-100 kDa GFP-CLN7-Bande in der gebundenen Fraktion zu detektieren (Abb. 16A). Ziel war es, mögliche CLN7-Protein-Interaktionspartner im nächsten Schritt durch massenspektrometrische Analysen zu identifizieren.

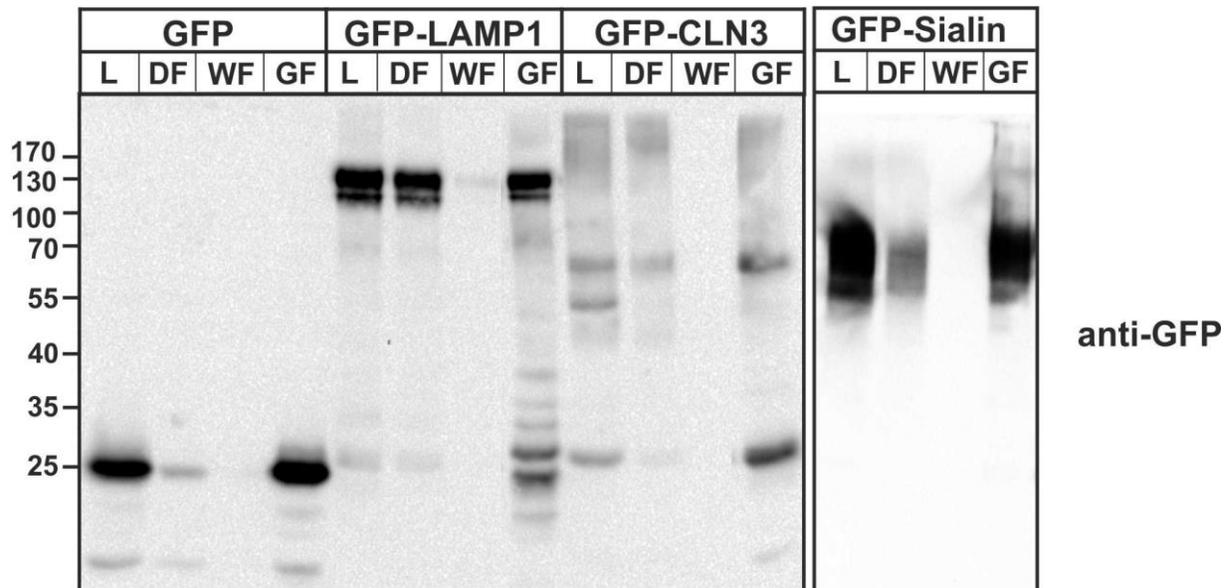


Abbildung 17: Screening nach einem geeigneten Kontrollprotein für GFP-CLN7-Kopräzipitationsanalysen
HEK293-Zellen wurden mit der GFP, GFP-LAMP1, GFP-CLN3 oder GFP-Sialin cDNA transient transfiziert. 24h nach Beginn der Transfektion wurden Gesamtprotein-Homogenate (L) präpariert, GFP bzw. GFP-Fusionsproteine mit GFP-Trap *Beads* immunpräzipitiert und die gebundenen Proteine (GF) bei 95°C eluiert. Die Proben wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und im GFP Immunblot untersucht. Die Positionen der Markerproteine sind in kDa angegeben (L=Lysat, DF= Durchfluss, WF=Washfraktion, GF= gebundene Fraktion).

Um ein geeignetes lysosomales Membranprotein als Kontrolle für die Kopräzipitationsanalysen zu finden, wurden HEK293-Zellen mit der cDNA von GFP, GFP-LAMP1, GFP-CLN3 oder GFP-Sialin transient transfiziert und anschließend eine Immunopräzipitation mit GFP-Trap *Beads* durchgeführt (Abb. 17). Die Fragestellung war, ob sich das GFP-fusionierte Kontrollprotein in HEK293-Zellen gut exprimieren und durch GFP-Trap effektiv aufreinigen lässt. Während LAMP1 ein lysosomales Typ I Membranprotein darstellt, sind CLN3 und Sialin polytope lysosomale Membranproteine mit 6 bzw. 12 Transmembrandomänen (Schwake et al. 2013). In den GFP-Immunblot-Analysen wurden in den Lysaten immunreaktive Banden von 26 kDa (GFP), 130 kDa (GFP-LAMP1), 60 kDa (GFP-CLN3) und 55-70 kDa (GFP-Sialin) detektiert (Abb. 17). Während die Expressionshöhen von GFP, GFP-LAMP1 und GFP-Sialin in transfizierten HEK293-Zellen vergleichbar waren, war die GFP-CLN3-Expression schwach. Zusätzlich waren in den Lysaten und gebundenen Fraktionen GFP-CLN3 exprimierender HEK293-Zellen vermehrt GFP-immunreaktive 26 kDa-Banden detektierbar, was auf einen

proteolytischen Abbau des CLN3-Proteinanteils hindeutet. Da die Bindung der GFP-Sialin-Fusionsproteine an die GFP-Trap *Beads* effektiver als der GFP-LAMP1-Fusionsproteine war, wurde GFP-Sialin als Kontrollprotein für die weiteren Kopräzipitationsanalysen ausgewählt.

Für die massenspektrometrischen Analysen der Immunpräzipitate wurden 6 x 10 cm Platten HEK293-Zellen mit GFP-CLN7 oder mit GFP-Sialin transient transfiziert. Nach Inkubation der Membranfraktionen mit den GFP-Trap *Beads* auf dem Drehrad wurden die *Beads* gewaschen und die an die Matrix gebundenen Proteine durch Hitzedenaturierung eluiert. Aliquots der Lysate (L), des Durchflusses (DF), der Waschfraktion (WF) und die gesamte gebundene Fraktion (GF) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Blue angefärbt (Abb. 18A). Trotz der geringen Empfindlichkeit der Coomassie Blue-Färbung (untere Nachweisgrenze 200-400 ng Protein pro Bande), ist die Methode im Gegensatz zur Silberfärbung mit der MS Proteinidentifizierung kompatibel (Rehm 2016). Die Spuren mit den aufgetrennten Proteinen wurden in kleinere Stücke geschnitten und die Proteine anschließend tryptisch in Peptide gespalten. Die MS Identifizierung der Peptidfragmente wurde durch die Core Facility Massenspektrometrische Proteomik am UKE durchgeführt.

In den MS Analysen wurden insgesamt 2649 Proteine identifiziert, die mit GFP-CLN7 als Köderprotein kopräzipitierten. Mit Hilfe der Eintragsnummern wurde die subzelluläre Lokalisation der kopräzipitierten Proteine in der UNIPROT-Datenbank bestimmt (Abb. 18B). Die Mehrzahl der identifizierten Proteine (N=1122, 42%) war im Zytosol lokalisiert, gefolgt von Kernproteinen (N=423, 16%) und Proteinen der Plasmamembran (N=271, 10%, Abb. 18B). Weitere potenzielle CLN7-Interaktionspartner waren in den Mitochondrien (N=243, 9%), im endoplasmatischen Retikulum (ER, N=211, 8%), im Golgi-Apparat (N=147, 6%) oder in den Lysosomen (N=50, 2%) lokalisiert oder waren Bestandteile des Zytoskeletts (N=182, 7%).

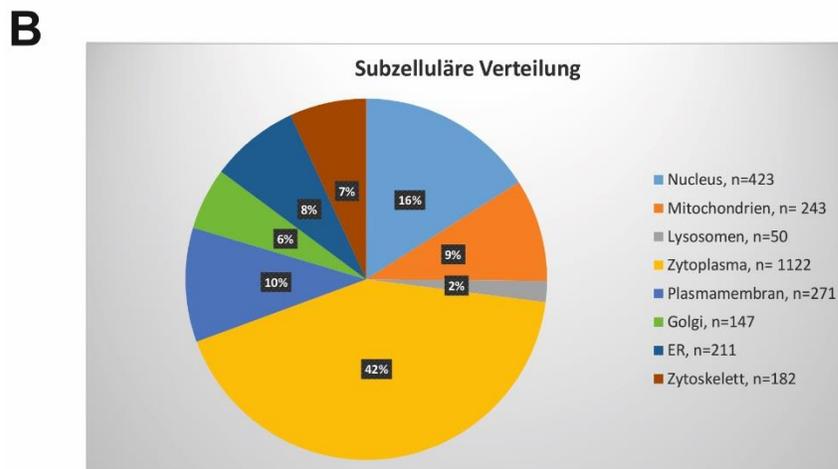
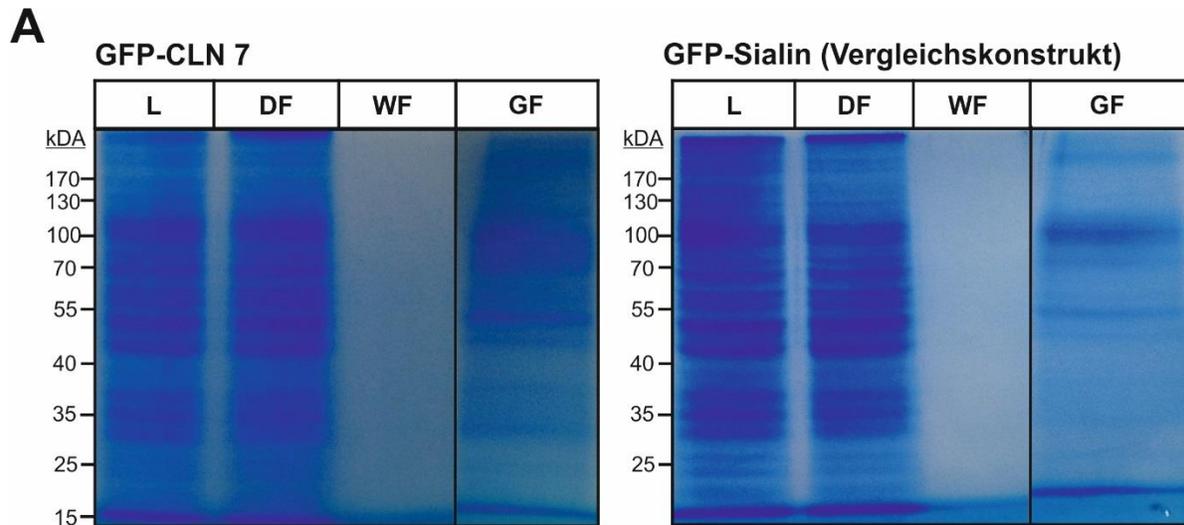


Abbildung 18: GFP-CLN7 und GFP-Sialin Expressionsanalyse und subzelluläre Verteilung identifizierter CLN7-Interaktionspartner

(A) HEK293-Zellen wurden mit der GFP-CLN7 bzw. der GFP-Sialin cDNA transient transfiziert. 24 h nach Beginn der Transfektion wurde nach Lyse der Zellen eine Gesamt-Membranfraktion präpariert und GFP-CLN7 bzw. GFP-Sialin durch GFP-Trap *Beads* immunpräzipitiert. Nach Waschen der *Beads* und Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte eine Auftrennung des Gesamt-Membranfraktion vor Zugabe der *Beads* (10%, Lysat (L)), der nicht gebundenen Proteine nach Präzipitation (DF, Durchfluss), der Waschfraktion (WF) und der gebundenen Fraktion (GF) durch SDS-PAGE und im Anschluss Anfärbung der Proteine durch Coomassie Blue. Die molaren Massen der Markerproteine (kDa) sind angegeben. (B) Anzahl und subzelluläre Verteilung von GFP-CLN7 Interaktionspartnern. Die Lokalisation der kopräzipitierten Proteine wurde durch Datenbankrecherche identifiziert und die Anzahl (n) und prozentuale Verteilung kopräzipitierter Proteine des Zellkerns, der Mitochondrien, der Lysosomen, des Zytosols, der Plasmamembran, des Golgi-Apparats, des ER und des Zytoskeletts bestimmt.

4.3.2 Interaktion von Rab7 mit CLN7

In den MS Analysen gebundener Proteine wurden verschiedene lysosomale Membranproteine (LAMP1, LAMP2, LIMP2), die α -Untereinheit des Clathrin-Adaptorproteins 2 (AP2) und die kleine GTPase Rab7 als potenzielle Interaktionspartner von CLN7 identifiziert. Zur Validierung der MS-Daten wurden GFP

und GFP-CLN7 in HEK293-Zellen transient exprimiert und der GFP-Anteil aus den Gesamt-Proteinhomogenaten durch GFP-Trap *Beads* immunpräzipitiert (Abb. 19).

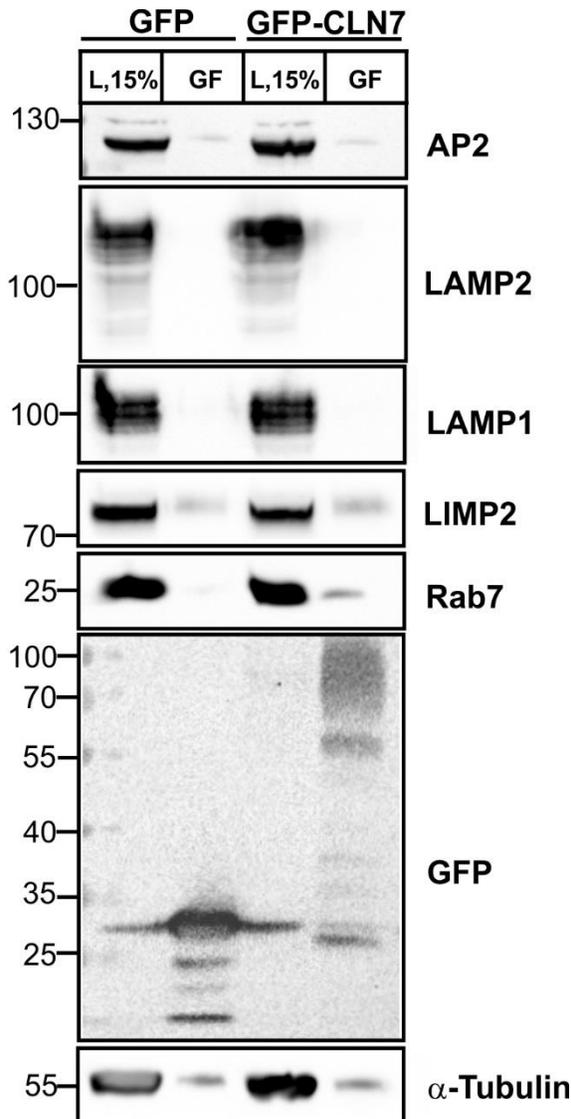


Abbildung 19: Interaktion von Rab7 mit CLN7

Membranlysate (L) aus mit GFP oder GFP-CLN7 transient transfizierten HEK293-Zellen wurden mit GFP-Trap *Beads* immunpräzipitiert. GFP diente dabei als Negativkontrolle, um eine unspezifische Bindung an GFP auszuschließen. 15% der Membranlysate (L, 15%) und die gesamte gebundene Fraktion (GF) wurden durch AP-2 alpha, LAMP2, LAMP1, LIMP2, Rab7 und GFP-Immunblot analysiert. Als Ladekontrolle diente α -Tubulin. Die molaren Massen der Markerproteine (in kDa) sind angegeben.

In den Eluaten wurden wie erwartet immunreaktive Banden von 27 kDa und von 70-100 kDa im GFP-Immunblot detektiert, die den molaren Massen von GFP bzw. GFP-CLN7 entsprechen (Abb. 19). In den Kopräzipitations-Analysen von GFP-CLN7 exprimierenden HEK293-Zellen wurde die Interaktion von

CLN7 mit der α -Untereinheit von AP2, LAMP2, und LAMP1 nicht bestätigt. Die Interaktion von GFP-CLN7 mit LIMP2 wurde verifiziert; es wurde jedoch eine ähnlich starke Wechselwirkung zwischen GFP allein und LIMP2 gefunden, so dass die CLN7-LIMP2 Wechselwirkung wahrscheinlich über eine Bindung an GFP vermittelt wird oder alternativ eine unspezifische Bindung an die Matrix darstellt. Die Interaktion zwischen CLN7 und Rab7 wurde durch die Kopräzipitationsanalysen bestätigt (Abb. 19). Die Interaktion von Rab7 mit dem CLN7-Anteil im GFP-CLN7-Fusionsprotein wurde durch die Nichtbindung von Rab7 an GFP allein gezeigt. Die α -Tubulin Immunblots bestätigten die gleichmäßige Proteinbeladung in den Lysat-Fractionen und eine geringe Kontamination mit dem Zytoskelett-Protein in den gebundenen Fraktionen (Abb. 19).

4.3.3 CLN7 bildet keine über kovalente Disulfidbrücken-verbundene Dimere oder Oligomere

Bioinformatische Analysen ergaben, dass die luminalen Cysteinreste an Position 401 und 408 Hinweise über eine mögliche Dimerisierung von CLN7 geben (Abb. 20A). Sequenzvergleiche zeigten darüber hinaus, dass diese Aminosäurereste in unterschiedlichen Spezies (*H. sapiens*, *M. musculus*, *D. rerio*) hochkonserviert sind (Abb. 20B).

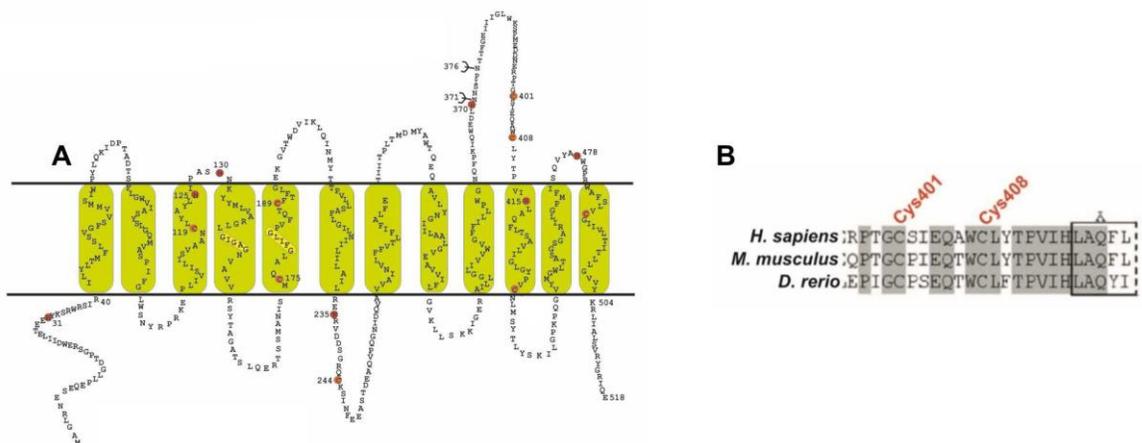


Abbildung 20: Lokalisation von Cysteinresten im CLN7-Protein für potenzielle intra- und intermolekulare Ausbildung von Disulfidbrücken

(A) Topologie-Modell von humanem CLN7 mit Positionen luminal lokalisierter Cysteinreste (rot markiert). Die Transmembrandomänen 1-12 im CLN7-Protein sind grün dargestellt. (B) Sequenzvergleiche der Aminosäuresequenzen 397-420 von CLN7 aus verschiedenen Spezies (*H. sapiens*, *M. musculus*, *D. rerio*). Die Cysteinreste in den Positionen 401 und 408 der humanen CLN7-Sequenz und konservierte Reste sind rot bzw. grau markiert.

Um die Präsenz möglicher dimerer oder oligomerer Formen von CLN7 zu untersuchen, wurden HEK293- Zellen zunächst mit den Expressionsvektoren 3xFLAG-CLN7 und 3xFLAG-

CLN7 N371/N376Q transient transfiziert. Bei dem 3xFLAG-CLN7 N371/N376Q Konstrukt sind die Asparaginreste der benutzten *N*-Glykosylierungsstellen in den Positionen 371 und 376 in Kombination durch Glutamin ersetzt, sodass nur die nicht-*N*-glykosylierte, elektrophoretisch beweglichere Form von CLN7 im Western-Blot zu detektieren ist (Steenhuis et al., 2012). Nach Zell-Lyse wurden Gesamtprotein-Homogenate unter reduzierenden Bedingungen (+SH) in Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) oder nicht reduzierenden Bedingungen (-SH) in Abwesenheit von DTT solubilisiert und durch FLAG-Immunoblot analysiert (Abb. 21). DTT verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfid-Brücken und reduziert vorhandene Disulfidbrücken in gefalteten Proteinen.

In den Immunoblot-Analysen wurden eine monomere ~ 50-70 kDa CLN7-Bande und eine prozessierte ~36 kDa CLN7-Bande detektiert (Steenhuis et al. 2012). In Extrakten aus 3xFLAG-CLN7 N371/N376Q exprimierenden HEK293-Zellen sind die nicht *N*-glykosylierte 55 kDa CLN7-Bande und die proteolytisch gespaltene 36 kDa CLN7-Bande im FLAG-Immunoblot zu detektieren (Abb. 21A). Im Molekulargewichtsbereich zwischen 100-140 kDa bzw. 72 kDa, wo man potenziell dimere CLN7-Formen erwarten würde, wurden keine weiteren immunoreaktiven CLN7-Banden in Extrakten aus WT-CLN7 und CLN7 N371/N376Q exprimierenden HEK293-Zellen detektiert (Abb. 21A).

Zur Bestätigung der monomeren CLN7-Formen wurden die Cysteinreste in den Positionen 401 und 408 einzeln durch Serin-Reste substituiert. In Proteinextrakten aus 3xFLAG-CLN7-WT, -C401S und -C408S überexprimierenden HEK293-Zellen wurden eine prominente 50-70 kDa immunoreaktive CLN7-Bande und die proteolytisch prozessierte 36 kDa immunoreaktive CLN7-Bande im FLAG-Immunoblot detektiert (Abb. 21B). Die elektrophoretischen Mobilitäten der unter nicht-reduzierenden Bedingungen und der unter reduzierenden Bedingungen denaturierten CLN7-Proteine waren nicht unterscheidbar. In Extrakten von CLN7 C401S und C408S überexprimierenden HEK293-Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen waren die Intensitäten der 55-70 kDa und der 36 kDa immunoreaktiven Banden stärker im Vergleich zu den WT-exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 21B). Im Molekulargewichtsbereich zwischen 100-140 kDa, in dem man CLN7-Dimere erwarten würde, waren in Extrakten aus WT CLN7 überexprimierenden HEK293-Zellen keine immunoreaktiven Banden zu erkennen. Daher war auch ein Vergleich elektrophoretischer Mobilitätsunterschiede zwischen potenziellen WT-CLN7-Dimeren und potentieller CLN7-Monomere in den Mutanten C401S und C408S nicht möglich. Die Ergebnisse zeigen, dass die Serinaustausch der Cysteinreste 401 und 408 in der luminalen Schleife L9 von CLN7 weder die Stabilität und Faltung noch die posttranslationale proteolytische Prozessierung von CLN7 in Lysosomen vermindert.

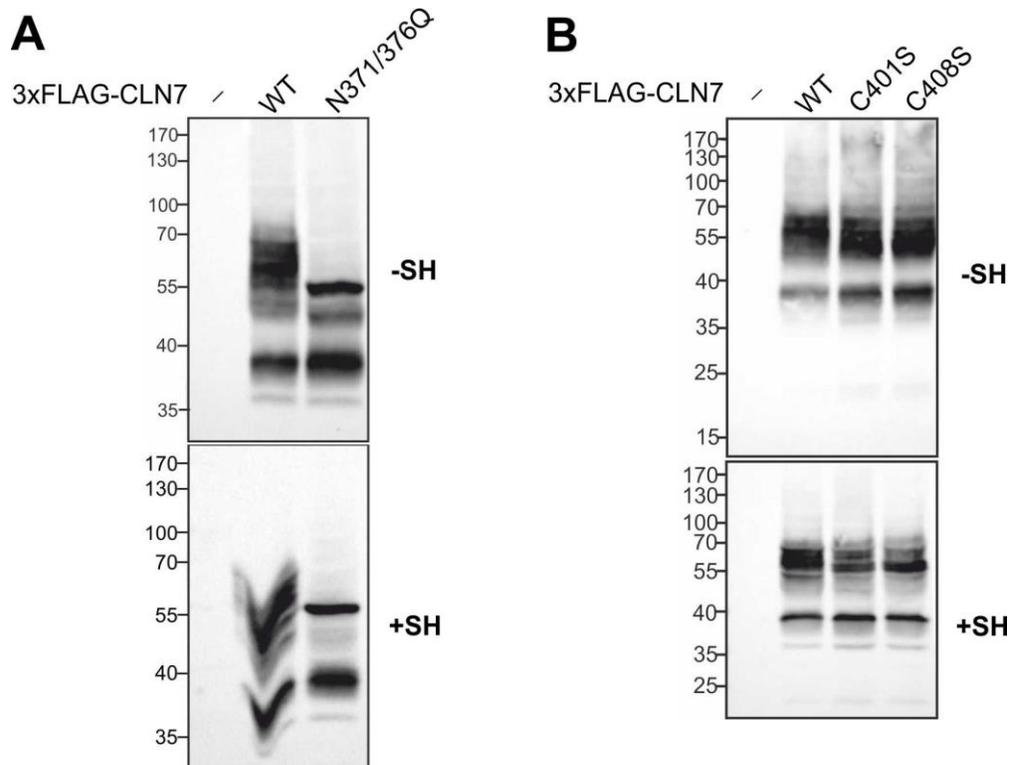


Abbildung 21: Analyse der Dimerisierung von CLN7 durch Disulfidbrücken

HEK293-Zellen wurden mit 3xFLAG-CLN7 Expressionsvektoren, bei denen die Cystein-Reste in den Positionen 401 oder 408 gegen Serin (C401S und C408S) ausgetauscht wurden (**B**), transient transfiziert. Als Kontrollen dienten nicht transfizierte Zellen (-), 3xFLAG-CLN7 und 3xFLAG-CLN7 N371/N376Q transfizierte Zellen. (**A**). Nach Zellyse wurden Gesamt-Proteinhomogenate (70 µg Protein) unter nicht-reduzierenden (-SH) und reduzierenden Bedingungen (+SH) solubilisiert und durch FLAG-Immunblot analysiert. Die molaren Massen der Markerproteine (in kDa) sind angegeben.

5 Diskussion

Die CLN7-Erkrankung mit spät-infantilem Phänotyp ist eine unheilbare neurodegenerative Erkrankung des Kindesalters, die durch Visus-Verlust, Krampfanfälle, psychomotorische Retardierung, Demenz und eine stark verkürzte Lebenserwartung charakterisiert ist (Mole et al. 2011). Ferner wurde adulte CLN7-Patienten mit retinaler Dystrophie ohne Hirnbeteiligung beschrieben (Roosing et al. 2015). Die CLN7-Erkrankung zählt zu den NCLs, einer Gruppe von neurodegenerativen lysosomalen Speichererkrankungen mit heterogenem Speicherematerial (Mole et al. 2011). Analysen von Hirnschnitten aus CLN7-Patienten zeigten *post mortem*, dass autofluoreszierendes Speicherematerial in großen Neuronen des Cortex, Cerebellums und Hippocampus akkumuliert (Sharifi et al. 2010). Es wurden mehr als 35 verschiedene Mutationen im *CLN7/MFSD8*-Gen identifiziert, die zu variant spät-infantilen, juvenilen und adulten Verlaufsformen bei CLN7-Patienten führen (Quelle: NCL-Datenbank, <https://www.ucl.ac.uk/ncl/cln7.shtml>). Das *CLN7/MFSD8*-Gen kodiert für ein polytopes, lysosomales Membranprotein mit unbekannter Funktion, das Sequenzhomologien zur Gruppe der Major Facilitator Superfamilie von Transportern besitzt (Siintola et al. 2007). Bisher kennt man das/die mögliche(n) Substrat(e), den Transportmodus und die Transportrichtung des putativen CLN7-Transporters jedoch nicht. Zur Analyse der Pathomechanismen der CLN7-Erkrankung stand eine *Cln7 knockout* Maus mit Deletion von Exon 2 des murinen *Cln7/Mfsd8*-Gens zur Verfügung, die genetisch CLN7-Patienten mit der *nonsense*-Mutation p.CLN7 R35X ähnlich ist (Kousi et al. 2009). Untersuchungen des CLN7-Mausmodells zeigten, dass die CLN7-Defizienz zu lysosomaler Dysfunktion, Störungen von Autophagieprozessen im Hirn und der Retina, progredienter Neuroinflammation, Neurodegeneration, neurologischen Symptomen und einer verkürzten Lebensdauer der mutanten Mäuse führte (Brandenstein et al., 2016). Biochemische Analysen zeigten, dass die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase (SCMAS) und Saposin D Bestandteile des lysosomalen Speicherematerials im Hirn und der Retina der *Cln7 ko* Mäuse darstellen (Brandenstein et al. 2016; Jankowiak et al. 2016).

5.1 Lysosomale Proteinzusammensetzung in *Cln7 ko* Fibroblasten

Der Zusammenhang zwischen der Defizienz des putativen lysosomalen Transporters *Cln7* und lysosomaler Speicherung und Dysfunktion ist bisher wenig verstanden. In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, welche molekularen Mechanismen zu lysosomaler Dysfunktion bei der CLN7-Erkrankung beitragen. Als Modell für die Untersuchungen wurden immortalisierte embryonale Fibroblasten eines Mausmodells der CLN7-Erkrankung mit variant spät-infantilem Phänotyp verwendet.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden quantitative proteomische Analysen von Lysosomen aus WT und *Cln7 ko* MEFs durchgeführt. In den MS-Messungen wurden 56 lösliche lysosomale Proteine

detektiert, so dass annähernd die Gesamtheit der bekannten ca. 60 löslichen Proteine in den Proteomanalysen identifiziert wurden (Lübke et al. 2009). Aufgrund der niedrigeren Abundanz und der Schwierigkeit der Detektion in MS-Analysen wurden etwa nur 20 % der ca. 125 bekannten lysosomalen Membranproteine detektiert (Tabelle 4, Schwake et al. 2013). Folglich waren Aussagen über quantitative Veränderungen der lysosomalen Membranproteine in *Cln7 ko* MEFs nur für hoch exprimierte Proteine möglich. Es wurden z. B. nur 4 Transporterproteine (H^+/Cl^- -exchange transporter 7, Lyaat1, Mfsd1 und NPC1) in isolierten Lysosomen massenspektrometrisch identifiziert, so dass keine Aussagen über quantitative Unterschiede von lysosomalen Transportern mit möglicherweise redundanten Funktionen zu *Cln7* möglich waren.

Die quantitativen Proteom-Analysen zeigten, dass die Konzentrationen von 12 löslichen lysosomalen Proteine, die beim Abbau von Glykan-Ketten, Fettsäure-modifizierten Proteinen, Peptiden, Lipiden und Fettsäuren in Lysosomen wichtig sind, in *Cln7*-defizienten MEFs im Vergleich zu WT Kontroll-MEFs vermindert waren (Abb. 4, Tabelle 3). Die Depletion multipler löslicher lysosomaler Proteine wurde auch in einem Mausmodell der CLN8-Erkrankung und einer zerebellären *Cln3 knockin (Cln3 ki)* Zelllinie beschrieben (di Ronza et al. 2018; Fossale et al. 2004; Schmidtke et al. 2019).

Proteomische Analysen zeigten, dass in Lysosomen-angereicherten Fraktionen aus der Leber von *Cln8 ko* Mäusen die Konzentration der löslichen lysosomalen Enzyme CtsD, CtsF, Ppt1, Tpp1, N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase und Sialidase 1 im Vergleich zu WT-Kontrollmäusen stark vermindert waren (di Ronza et al. 2018). Die Lamp1-Mengen waren in *Cln8 ko* Lysosomen hingegen unverändert. Der Verlust des CLN8-Cargo-Rezeptors führt folglich zur Depletion löslicher Proteine in Lysosomen aufgrund eines Transportdefekts zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat. In zerebellären *Cln3 knockin (ki)*-Zellen waren die Konzentrationen von 28 löslichen lysosomalen Proteinen vermindert, insbesondere von Proteinen, die für den lysosomalen Lipid-Abbau wichtig sind (Schmidtke et al. 2019). Zu den löslichen Proteinen, die sowohl in Lysosomen der *Cln7 ko* MEFs als auch der zerebellären *Cln3 ki* Zellen depletiert waren, zählen: Ependymin-ähnliches Proteins (Epdrl), Sialat O-acetylerase (Siae), Niemann-Pick Typ C2-Protein (Npc2), neuronales Ceroid-Lipofuscin-Protein 5 (Cln5), lysosomale Pro-X Carboxypeptidase (Prcp), Carboxypeptidase Q (Cpq), Gruppe XV Phospholipase A2 (Pla2g15) und N-Acylethanolamin-hydrolysierende saure Amidase (Schmidtke et al. 2019). Der Vergleich der lysosomalen Proteome aus *Cln3 ki* zerebellären Zellen und *Cln7 ko* MEFs zeigt eine hohe Überschneidung von depletierten löslichen lysosomalen Proteinen. In *Cln3 ki* Zellen waren die lysosomalen Konzentrationen des Lipids Lactosylceramid und von Glykosphingolipiden erniedrigt (Schmidtke et al. 2019). Es ist unklar, ob in *Cln7 ko* MEFs die Depletion multipler löslicher lysosomaler Enzyme ebenfalls zu Veränderungen der lysosomalen Lipidkomposition führen. In *Cln7 ko* Lysosomen

aus MEFs waren allerdings nur zwei lysosomale Proteine (N-Acylethanolamin-hydrolysierende saure Amidase und Gruppe XV Phospholipase A2) vermindert, die Lipide in Lysosomen abbauen. Um spezifische Veränderungen des Lipidstoffwechsels in Abwesenheit von CLN7 zu analysieren und ihre potenziellen biochemischen Mechanismen aufzuklären, wäre es notwendig, lipidomische Studien an *Cln7 ko* -Gewebe oder -Zellen durchzuführen.

Die Konzentrationen der identifizierten lysosomalen Membranproteine waren mit Ausnahme einer geringen Depletion der G1- und D-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ H⁺ ATPase-Komplexes in *Cln7 ko* Lysosomen im Vergleich zu WT Lysosomen unverändert (Abb. 7, Tabelle 4). Die V1-Domäne besitzt die ATPase-Aktivität im V-Typ H⁺ ATPase-Komplex (Collins und Forgac 2020). Es ist allerdings eher unwahrscheinlich, dass die gefundene Verminderung der G1- und D-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ H⁺ ATPase-Komplexes in *Cln7 ko* Lysosomen funktionelle Konsequenzen für die Azidifizierung des lysosomalen Lumens hat. Ratiometrische Analysen in zerebellären *Cln7 ko* Zellen ergaben einen im Vergleich zu zerebellären WT Zellen unveränderten lysosomalen pH-Wert und in Übereinstimmung mit diesen Daten waren die proteolytische Prozessierung der lysosomalen Proteine, die nur bei saurem pH-Wert stattfindet, CtsD, CtsZ und Cln5 in *Cln7 ko* MEFs nicht verändert (Brandenstein et al. 2016; Danyukova et al. 2018; von Kleist et al. 2019). Es ist daher unwahrscheinlich, dass *Cln7* direkt oder indirekt für die Homöostase der lysosomalen Protonenkonzentration wichtig ist. In zerebellären *Cln3 ki* Zellen war trotz erhöhter Konzentrationen der D1-Untereinheit der V0-Domäne, der G1- und H-Untereinheiten der V1-Domäne der V-Typ H⁺ ATPase und der akzessorischen S1-Untereinheit der lysosomale pH-Wert nicht verändert (Schmidtke et al. 2019).

Im Allgemeinen stellen proteomische Analyse-Methoden wie die Markierung von kultivierten Zellen durch Isotope mit unterschiedlichen Massen (SILAC) in Kombination mit magnetischer Aufreinigung von Lysosomen und massenspektrometrischer Identifizierung ein leistungsfähiges Werkzeug dar, um quantitative Veränderungen des Lysosom-spezifischen Proteoms in Zellmodellen von Erkrankungen oder unter besonderen physiologischen Situationen (z. B. Hungern, Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Inhibition wichtiger Signalmoleküle etc.) zu messen (Thelen et al. 2017). Die hohe Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion führte zur Identifizierung einer hohen Anzahl nicht-lysosomaler Proteine, die entweder aufgrund der Kontamination der lysosomalen Fraktionen durch andere Organellen (Organell-Organell-Wechselwirkungen) oder zytosolische Kompartimente oder durch nicht-residente lysosomale Proteine, die durch Endozytose, Phagozytose oder Makro-Autophagie zu den Lysosomen gelangen, verursacht wurden (Schröder et al. 2010). Das Verständnis von Lysosomen als Organellen mit ausschließlich degradativen Funktionen hat sich in den letzten 10 Jahren stark verändert (Ballabio und Bonifacino 2020). Es wurde gezeigt, dass Lysosomen-vermittelte Signalkaskaden und

Transkriptionsprogramme eine wichtige Bedeutung bei vielen zellulären Prozessen wie der Autophagie, der Regulation von Transkriptionsfaktoren, der Energiehomöostase (Wechsel zwischen Anabolismus und Katabolismus) und des Energiestoffwechsels besitzen. Ferner stehen Lysosomen über Membrankontakte mit anderen Organellen (ER, Peroxisomen, und Mitochondrien) und Zellkompartimenten (Plasmamembran) im Austausch (Prinz et al. 2020). Intakte Zellfunktionen sind abhängig von einem funktionierenden lysosomalen Metabolismus, der an das zytosolische und nukleäre Signalsystem gekoppelt ist (Marques und Saftig 2019). Aus diesem Aspekt heraus können zahlreiche nicht-lysosomale Proteine, die durch die MS-Analysen identifiziert und in dieser Arbeit nicht genauer ausgewertet worden sind, möglicherweise auf funktioneller Ebene mit CLN7 verknüpft sein und bedürfen einer näheren Untersuchung.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Defizienz des putativen Cln7-Membrantransporters zur Depletion multipler löslicher lysosomaler Proteine führt, die möglicherweise zu Störungen der lysosomalen Biogenese und Funktion bei der CLN7-Erkrankung beiträgt.

5.1.1 Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* Lysosomen

Für die nachfolgenden Analysen wurden dysregulierte lysosomale Proteine ausgewählt, die i) eine stark verminderte Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen und ii) einen möglichen direkten oder indirekten Bezug zu anderen NCL-Erkrankungen hatten. Mutationen im *CLN5*-Gen führen zur CLN5-Erkrankung mit spät-infantilem Phänotyp, deren klinische Symptomatik und Krankheitsverlauf der CLN7-Erkrankung sehr ähnlich ist (Mole et al. 2011). Die klinische Symptomatik und die biochemische Speicherung von autofluoreszierenden Ceroid-Lipofuscin-Pigmenten im zentralen Nervensystem und peripheren Geweben sind vergleichbar mit anderen spät-infantilen NCLs (Kopra et al. 2004). Es wurden folglich Biosynthese, Expression, intrazelluläre Sortierung und proteolytische Prozessierung von Cln5 in *Cln7 ko* MEFs analysiert. Die proteomischen Analysen ergaben, dass das lösliche Cln5-Protein in *Cln7 ko* Lysosomen im Vergleich zu WT Lysosomen 0,58-fach vermindert war (Abb. 4, Tabelle 3). Die Validierung der proteomischen Studien durch Immunoblot-Analysen ergab, dass die Depletion von Cln5 in Abwesenheit von Cln7 nicht nur zell- und gewebstypspezifisch, sondern auch Spezies-unabhängig war. Die verminderte Cln5-Konzentration wurde in murinen *Cln7 ko* Fibroblasten bestätigt (Abb. 5) und auch in primären *Cln7 ko* Makrophagen, Gehirnlisaten von *Cln7 ko* Mäusen und in humanen *CLN7 ko* HAP1 Zellen gezeigt (Abb. 8, Danyukova et al. 2018). Reduzierte Cln5-Mengen wurden auch in immortalisierten zerebellären *Cln7 ko* Neuronen gefunden (von Kleist et al. 2019).

Mögliche Gründe für eine verminderte Cln5-Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen könnten eine geringere mRNA- oder Proteinexpression, veränderte posttranslationale Modifizierungen, ein gestörter

intrazellulärer Transport mit möglicher Fehlsortierung ins Medium und eine verminderte Halbwertszeit von Cln5 durch gesteigerten proteasomalen oder lysosomalen Proteinabbau sein. Quantitative *real-time* PCR Analysen zeigten keine Veränderungen der *Cln5* mRNA-Expression in *Cln7 ko* MEFs im Vergleich zu WT MEFs, so dass eine verminderte *Cln5* mRNA-Transkription als Grund für verminderte Cln5-Proteinmengen nicht wahrscheinlich ist (Abb. 6). Die Quantifizierung der intrazellulären und sezernierten Cln5-Fractionen in den Immunoblot-Analysen zeigte keine Fehlsortierung von Cln5 in kultivierten *Cln7 ko* MEFs ins Medium (Abb.9, Danyukova et al. 2018). Die proteolytische Prozessierung des Cln5-Vorläuferproteins zum reifen Cln5-Protein war in *Cln7 ko* Lysosomen nicht verändert (Abb. 5 und 9). Beide Befunde zeigen, dass der intrazelluläre Transport von Cln5 in Abwesenheit von funktionellem Cln7 nicht gestört war. In Übereinstimmung mit den Daten konnten von Kleist und Mitarbeiter zeigen, dass der pH-Wert in einer zerebellären *Cln7 ko* Zelllinie im Vergleich zu WT Zellen nicht verändert war (von Kleist et al. 2019). Expressionsanalysen in Anwesenheit verschiedener Protease-Inhibitoren zeigten jedoch, dass ein verstärkter Cysteinprotease-vermittelter Abbau zur verminderten Cln5-Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen beiträgt (Abb.10). Mögliche Gründe für einen verstärkten Abbau von Cln5 in *Cln7 ko* Lysosomen könnten eine direkte Cln5-Cln7-Interaktion, eine indirekte, über ein weiteres lysosomales Protein vermittelte Cln5-Cln7-Interaktion oder eine Veränderung der lysosomalen Membranstruktur durch Cln7-Defizienz sein.

Es bleibt unklar, ob die verminderte Cln5-Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen auch zur Verminderung der Cln5-Aktivität führt. Cln5 soll zunächst als Typ II Membranprotein im ER synthetisiert und anschließend durch die Signal-Peptidase-Typ 3 (SPPL3) in die reife lösliche Form prozessiert werden (Jules et al. 2017). Die Funktion des hoch *N*-glykosylierten löslichen CLN5 Proteins ist unbekannt und es stehen bisher keine enzymatischen Tests zur Bestimmung der CLN5-Aktivität zur Verfügung (Kollmann et al. 2013). In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde postuliert, dass Cln5 in *Dictyostelium discoideum*, einer Gattung der zellulären Schleimpilze, und in *Homo sapiens* möglicherweise eine Glykosid-Hydrolase ist. Cln5 soll die Expression von Glutamat-Decarboxylase (Gad1), einem Enzym, das an der Synthese des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure beteiligt ist, *in vitro* beeinflussen (Huber und Mathavarajah 2018; Singh et al. 2019). Es wurde vorgeschlagen, dass Cln5 für die Rekrutierung von Retromer-Untereinheiten in endosomalen Kompartimenten und für den Transport zwischen Endosomen und dem TGN wichtig ist (Mamo et al. 2012). Der ähnliche klinische Verlauf von Patienten mit *CLN5*- und *CLN7*-Gendefekten in Kombination mit der beobachteten Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* Zellen und Geweben lässt vermuten, dass beide Proteine möglicherweise für gemeinsame Stoffwechsel- oder Signalwege wichtig sein könnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und publizierte Wechselwirkungen von CLN5 mit weiteren NCL-Proteinen wie PPT1, TPP1, CLN3, CLN6 und CLN8

in vitro unterstreichen die wichtige Funktion von CLN5 im NCL-Netzwerk (Lyly et al. 2009; Vesa et al. 2002).

Zusammenfassend zeigten die quantitativen Proteom-Analysen, dass die Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* MEFs durch verstärkten Cysteinprotease-vermittelten Abbau in Lysosomen, nicht jedoch durch veränderte mRNA-Transkription, Protein-Biosynthese, Sortierung und proteolytische Prozessierung von Cln5 begründet waren.

5.1.2 Phänotypische Gemeinsamkeiten der CLN7-Erkrankung mit anderen NCL-Erkrankungen

Durch die quantitativen Proteom-Analysen von WT und *Cln7 ko* MEFs wurden verminderte Ppt1, Npc2, Cln5 und Dpp7-Konzentrationen in *Cln7 ko* Lysosomen detektiert und anschließend durch Immunoblot-Analysen bestätigt (Abb. 4 und 5). Die verminderten Ppt1- und Cln5-Konzentrationen resultierten nicht aus einer geringeren *Ppt1*- und *Cln5*-mRNA-Expression (Abb. 6). Defekte im *CLN1*-Gen, welches für PPT1 kodiert, führen zur CLN1-Erkrankung (Mole et al. 2011). Aufgrund der verminderten, aber nicht komplett defizitären Expression von Ppt1 und Cln5 ist es nicht wahrscheinlich, dass die CLN7-Erkrankung durch Verlust der Ppt1- oder Cln5-Aktivitäten resultiert. Es ist jedoch möglich, dass der kombinierte Mangel beider Proteine (Abb. 4) zu lysosomaler Dysfunktion und zur Pathogenese der CLN7-Erkrankung beiträgt. Kopräzipitationsanalysen zeigten, dass Cln5 und Ppt1 *in vitro* interagieren (Lyly et al. 2009). Es ist daher möglich, dass durch die Defizienz eines der beiden Proteine die Stabilität und Halbwertszeit des interagierenden Proteins in Lysosomen vermindert wird. Es liegen jedoch keine experimentellen Daten vor, ob die Cln5-Konzentrationen in *Cln1 ko*-Zellen oder die Cln1-Konzentrationen in *Cln5 ko* Zellen vermindert sind. In den Gehirnen von *Cln1 ko*- und *Cln5 ko*-Mausmodellen wurden Veränderungen im Lipid und Cholesterinstoffwechsel gezeigt (Ahtiainen et al. 2007; Schmiedt et al. 2012). Cholesterin ist ein wichtiger Baustein für die Zellmembran und Ausgangssubstanz für die Synthese von Steroidhormonen, Gallensalzen, Vitamin D und Liganden für Transkriptionsfaktoren. Es wäre möglich, dass die Cln7-Defizienz aufgrund der kombinierten Depletion von Ppt1 und Cln5 zu einem gestörten Abbau und/oder Transport von Lipiden und Cholesterin in Lysosomen führt. Für den Transport von nicht-esterifiziertem Cholesterin durch die lysosomale Membran sind neben dem NPC1-Membranprotein auch das lösliche NPC2 Protein wichtig, das in *Cln7 ko* Lysosomen vermindert war (Danyukova et al. 2018; McCauliff et al. 2019). In zukünftigen Arbeiten müsste daher untersucht werden, ob Cholesterin oder andere Lipidklassen, wie Glykosphingolipide und Ceramide, in *Cln7 ko* Lysosomen aus Primärzellen oder dem Gehirn akkumulieren.

Mit der Etablierung einer zerebellären *Cln7 ko*-Zelllinie auf Basis von Körnerzellen aus dem *Stratum granulosum* des Cerebellums von *Cln7 ko* Mäusen steht nun ein zellbasiertes Modell zur Verfügung, das im Vergleich zu den *Cln7 ko* MEFs besser geeignet ist, ein Verständnis der Funktion von CLN7 und der molekularen Veränderungen in Lysosomen bei CLN7-Verlust zu gewinnen (von Kleist et al. 2019). Die zerebelläre *Cln7 ko* Zelllinie aus dem Mausmodell ist insbesondere geeignet, da die CLN7-Expression beim Menschen in zerebellären Körnerzellen hoch ist und der Verlust von Neuronen bei CLN7-Patienten in der granulären Schicht am stärksten ist (Brandenstein et al. 2016; Damme et al. 2014; Mole et al. 2011; Sharifi et al. 2010). Aus diesem Aspekt wäre es sicherlich interessant, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte quantitative proteomische Studie mit der neuronalen *Cln7 ko* Zelllinie zu wiederholen.

5.2 Analyse primärer *Cln7 ko* Makrophagen

Aufgrund der erhöhten Cathepsin S (Ctss)-Konzentration in *Cln7 ko* Lysosomen aus MEFs wurden nachfolgend primäre *Cln7 ko* Makrophagen analysiert, die Ctss hoch exprimieren und wegen ihrer phagozytierenden Eigenschaften ein aktives lysosomales Kompartiment besitzen (Gao et al. 2017). Ctss war das einzige lösliche, lysosomale Protein, das in den quantitativen Proteomanalysen in *Cln7 ko* Lysosomen signifikant im Vergleich zu WT Lysosomen erhöht war ($13,43 \pm 6,75$, Abb. 4). Die hohe Standardabweichung ist möglicherweise auf die niedrige Expression von Ctss in den MEFs zurückzuführen. Ctss wird nicht ubiquitär, sondern zelltypspezifisch in Makrophagen, Antigen-präsentierenden Zellen und im Gehirn in Mikrogliazellen exprimiert (Pislar und Kos 2014; Wilkinson et al. 2015). Ctss ist die Hauptprotease für die Spaltung von CD74 (Riese et al. 1996).

Zur Validierung der erhöhten Ctss-Expression wurden neben den *Cln7 ko* MEFs auch primäre *Cln7 ko* Makrophagen untersucht. Die primären Makrophagen wurden aus dem Knochenmark von *Cln7 ko* Mäusen isoliert. In kultivierten primären *Cln7 ko* Makrophagen war die Ctss-Expression 2,5-fach im Vergleich zu WT Zellen erhöht (Abb. 13A). Ctss wird im Maushirn vermehrt von Mikrogliazellen bei Alterung und neuroinflammatorischen Prozessen (Wendt et al. 2008) und von Makrophagen und Mikroglia nach Stimulation durch inflammatorische Mediatoren sezerniert (Liuzzo et al. 1999). In einem Mausmodell der NPC1-Erkrankung wurden im Gehirn und in kultivierten Mikrogliazellen eine erhöhte Ctss-Expression detektiert (Seo et al. 2016). Im Cerebrum von Morbus Alzheimer Patienten war die *Ctss*-mRNA-Expression in betroffenen Hirnregionen erhöht (Lemere et al. 1995). Aufgrund der Aktivierung von Mikroglia ist es wahrscheinlich, dass Ctss auch in *Cln7 ko* Maushirnen ab dem 5. Lebensmonat erhöht ist (Brandenstein et al., 2016). In weiterführenden Untersuchungen müsste geklärt werden, ob und ab welchem Alter die Ctss-Expression in *Cln7 ko* Gehirnen erhöht ist und ob ein

möglicher Ctss-Anstieg durch neuroinflammatorische Prozesse und Aktivierung von Mikroglia-Zellen verursacht wird.

Es ist möglich, dass Ctss kompensatorisch aufgrund der gesteigerten Konzentration von Ctss-Substraten vermehrt exprimiert wird. Neben der Ctss-Expression wurde auch die Expression eines der Hauptsubstrate von Ctss, dem CD74 (invariante Kette) überprüft (Abb. 13A). In den Extrakten aus *Cln7 ko* Makrophagen wurden neben erhöhten Konzentrationen der nicht-gespaltenen 33 kDa CD74-Hauptbande eine zusätzliche 10-12 kDa Doppelbande detektiert, die in WT Makrophagen nicht detektiert wurde (Abb. 13A). Die 10-12 kDa CD74-Doppelbande ist vermutlich das N-terminale membranständige CD74-Fragment (NTF, 82 Aminosäuren), das aus dem sequentiellen proteolytischen Abbau der luminalen CD74-Domäne in endosomalen Kompartimenten durch Ctss und andere Cathepsine hervorgeht (Schröder 2016). Das CD74-NTF wird in Lysosomen durch Intramembranproteolyse durch die Signal Peptid Peptidase like 2A (SPPL2a) in ein intrazelluläres Fragment (ICD) und ein luminales Fragment gespalten (Schneppenheim et al. 2013). Aufgrund der Akkumulation des 10-12 kDa CD74-NTF in *Cln7 ko* Lysosomen ist es möglich, dass die Aktivität der SPPL2a in *Cln7 ko* Makrophagen gehemmt ist. Nach Ausschaltung des *SPPL2a*-Gens in Mäusen akkumulierte das 10 kDa CD74-NTF in IgM-positiven B-Zellen (Schneppenheim et al. 2013). Die Überexpression einer inaktiven SPPL2a-D416A Mutante in HEK293-Zellen erhöhte die Konzentration des CD74-NTF (Schneppenheim et al. 2013). In weiterführenden Analysen müsste untersucht werden, ob die Aktivität der SPPL2a in *Cln7 ko* Makrophagen reduziert ist. Alternativ wäre es möglich, dass die erhöhten CD74-Mengen bei unveränderter SPPL2a Aktivität zu einem Anstieg des CD74-NTF führen. Da keine weiteren CD74-Abbaufragmente zu detektieren waren und die Expression von *Ctsb*, *Ctsl* und *Ctsz* nicht verändert war (Abb. 14A und B), ist ein gehemmter proteolytischer Abbau der luminalen CD74-Domäne durch Cathepsine in *Cln7 ko* Makrophagen auszuschließen.

CtsS ist die einzige Protease, die auch bei neutralem pH-Wert aktiv ist und multiple intra- als auch extrazelluläre Funktionen besitzt (Chapman et al. 1997). Im Gegensatz zu anderen lysosomalen Cathepsinen spaltet CtsS neben intrazellulären Proteinen auch multiple extrazelluläre Substrate, wie z. B. den sekretorischen Leukozyten Protease Inhibitor (SLPI) und Glykosaminoglykane der Extrazellulärmatrix, wie Laminin, Elastin, Osteocalcin, Collagen, Chondroitinsulfat und He-paransulfat (Abb. 22).

Zur Analyse der Expression von Ctss-Substraten in *Cln7 ko* Makrophagen wurde die mRNA-Expression der intrazellulären Substrate CD74 und dem junctionalen- Adhäsionsmolekül-B (JAM-B) sowie dem

extrazellulären Substrat löslicher, extrazellulärer sekretorischer Leukozytenprotease-Inhibitor (SLPI), quantifiziert (Abb. 13B).

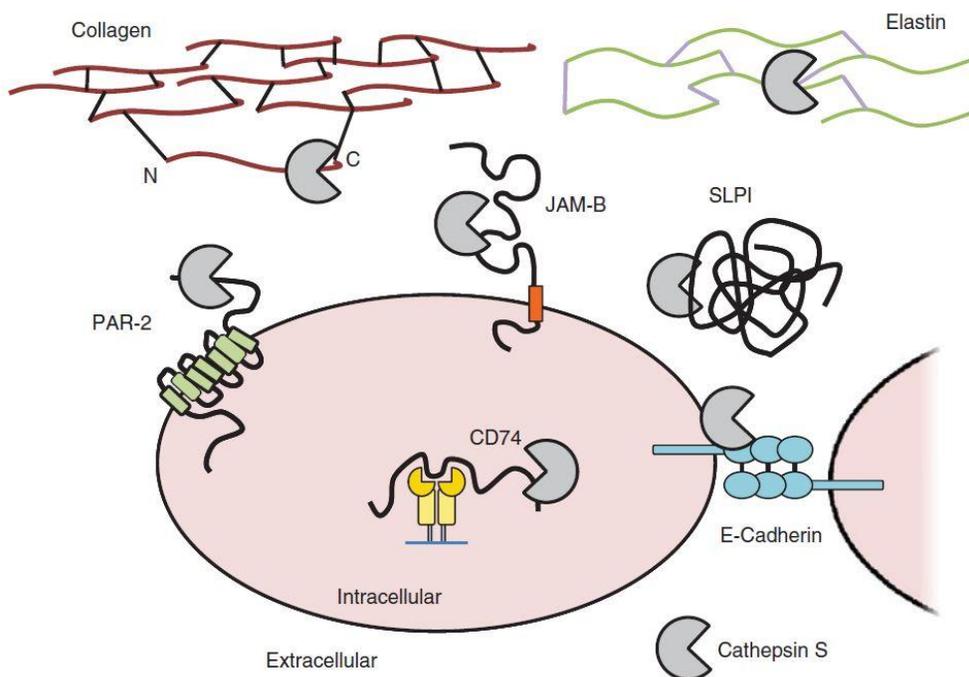


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Lokalisation und Funktion bekannter Cathepsin S-Substrate Cathepsin S ist sowohl intrazellulär in Lysosomen als auch nach Sekretion im Extrazellulärraum lokalisiert. Zahlreiche intra- und extrazelluläre Ctss-Substrate sind bekannt: CD74, Chaperon von MHCII-Komplexen, Protease-aktivierter-Rezeptor-2 (PAR-2), beteiligt an der Schmerz-Modulierung, E-Cadherin, ein intrazelluläres Adhäsionsprotein, Sekretorischer-Leukozyten-Protease-Inhibitor (SLPI), der eine zentrale Rolle beim Abbau von Elastin in der Lunge spielt, das Funktionale-Adhäsionsmolekül-B (JAM-B) und Proteine der Extrazellulärmatrix, wie Kollagen und Elastin (aus Wilkinson et al. 2015).

Die quantitativen *real-time* PCR Analysen zeigten eine 2,9-fach höhere *Slpi* mRNA-Expression in *Cln7 ko* Makrophagen im Vergleich zu WT-Makrophagen (Abb. 13B). Die *Cd74* und *JAM-B* mRNA-Expression waren in *Cln7 ko* Makrophagen im Vergleich zu Kontrollzellen nicht signifikant verändert (Abb. 13B). Die Ergebnisse der quantitativen mRNA Analysen müssten durch Immunblot-Untersuchungen ergänzt werden, um die Expression von SLPI und JAM-B auf Proteinebene zu überprüfen. SLPI wird von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert und besitzt antibakterielle, antivirale und antiinflammatorische Eigenschaften (Doumas et al. 2005). Die Inkubation von peritonealen murinen Makrophagen mit apoptotischen Zellen führt zur gesteigerten Sekretion von SLPI (Otake et al. 2003). Die Ursache für die gesteigerte *Slpi*-mRNA-Expression in *Cln7 ko* Makrophagen ist jedoch unklar. Mögliche Gründe könnten eine erhöhte Apoptose von *Cln7 ko* Zellen oder eine gesteigerte Aktivierung der Makrophagen sein. Die phagozytierenden Eigenschaften und

funktionellen Ähnlichkeiten zwischen Makrophagen und Mikroglia lassen vermuten, dass die in *Cln7 ko* Makrophagen gefundenen Veränderungen des lysosomalen Proteoms auch in *Cln7 ko* Mikrogliazellen existieren. Es wurde gezeigt, dass aktivierte Mikroglia aufgrund der Phagozytose absterbender Neurone im Gehirn am Anfang neuroprotektiv wirken (Li und Barres 2018). Eine Aktivierung des lysosomalen Kompartiments in Mikroglia von *Cln7 ko* Gehirnen wurde durch erhöhte Expression von Ctsz gezeigt (Brandenstein et al., 2016). Die Daten der kultivierten primären *Cln7 ko* Makrophagen lassen vermuten, dass der *Cln7*-Gendefekt allein schon zur Aktivierung des lysosomalen Kompartiments führt. Ob eine Aktivierung von Mikrogliazellen auch in Abwesenheit geschädigter und absterbender Neurone erfolgt, müsste durch biochemische und zellbiologische Analyse von kultivierten WT und *Cln7 ko* Mikrogliazellen überprüft werden.

Zur Analyse, ob die *Cln7*-Defizienz in primären kultivierten Makrophagen zu lysosomaler Dysfunktion und zur Akkumulation von Speichermaterial führt, wurden Immunoblot-Analysen mit Antikörpern gegen die Hauptproteinkomponenten des Speichermaterials, SCMAS und Saposin D, durchgeführt. SCMAS ist aufgrund seiner hohen Hydrophobizität unter pathologischen Bedingungen resistent gegenüber dem proteolytischen Abbau in lysosomalen Kompartimenten (Palmer et al. 1992). Die Immunoblot-Analysen zeigten, dass die Expression von Prosaposin nicht erhöht war und Saposin D in *Cln7 ko* Makrophagen nicht gespeichert wurde (Abb. 15A). Die starke Akkumulation von SCMAS in Detergenz-unlöslichen Fraktionen aus *Cln7 ko* Makrophagen zeigte, dass die *Cln7*-Defizienz zu lysosomaler Dysfunktion und nachfolgender Speicherung hydrophober Substrate, wie SCMAS, führt (Abb. 15B). Im Gegensatz zu diesem Befund wurde keine Speicherung von SCMAS in *Cln7 ko* MEFs (Danyukova et al. 2018) oder einer zerebellären *Cln7 ko* Zelllinie (von Kleist et al. 2019) detektiert. Die Unterschiede zwischen den biochemischen Phänotypen in Gehirnen der *Cln7 ko* Mäuse und den kultivierten *Cln7 ko* Zellen lassen vermuten, dass die lysosomale Dysfunktion durch die *Cln7*-Defizienz mild ist und nur in bestimmten Zelltypen nach fortschreitender Speicherung nicht-abbaubarer Makromoleküle in Lysosomen oder im Gehirn bei Alterungsprozessen manifest wird. Unterschiede zwischen den pathologischen Phänotypen der Mausmodelle und deren abgeleiteter Primärzellen wurden auch für die *CLC7*-Defizienz beschrieben (Kasper et al. 2005). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass primäre *Cln7 ko* Makrophagen und abgeleitet primäre *Cln7 ko* Mikrogliazellen als ein geeignetes Modell zum Studium lysosomaler Dysfunktion in der Zukunft bei der *CLN7*-Erkrankung dienen können.

5.2.1 Bedeutung von Cathepsinen bei neuroinflammatorischen Prozessen bei der CLN7-Erkrankung

Die große Bedeutung des proteolytischen Proteinabbaus in Lysosomen wird durch die Existenz multipler Cathepsine und durch lysosomale Speichererkrankungen, die durch Cathepsin-Defekte in Menschen (CLN10 = CTSD-Defizienz, CLN13 = CTSF-Defizienz) und bei Mausmodellen (ko-Modelle von CtsD, CtsF, CtsB/CtsL) verursacht werden, deutlich (Stoka et al. 2016). Die quantitativen Analysen des lysosomalen Proteoms in kultivierten *Cln7 ko* MEFs zeigten, dass die Expression der lysosomalen Cathepsine CtsC, CtsL, CtsB, CtsA und CtsZ nicht signifikant verändert war (Abb. 4). CtsD war die einzige Protease, die in *Cln7 ko* Lysosomen vermindert war. In kultivierten *Cln7 ko* Makrophagen war die Expression der analysierten Cathepsine B, L und Z auf mRNA- und Protein-Ebene im Vergleich zu WT Zellen nicht verändert (Abb. 14). Die CtsD-Proteinkonzentration war in *Cln7 ko* Makrophagen im Vergleich zu WT Makrophagen vermindert (Abb. 14). Es ist möglich, dass eine verminderte Expression und enzymatische Aktivität von CtsD in *Cln7 ko* Makrophagen zu lysosomaler Speicherung und Dysfunktion beiträgt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde in *knockout* SH-SY5Y-Zellen des lysosomalen Membranproteins ATP13A2 (CLN12) eine verminderte CtsD-Aktivität und eine Akkumulation von Speichermaterial mit Fingerabdruck-Strukturen beschrieben (Matsui et al. 2013). Im Gehirn von 5 Monate *Cln7 ko* Mäusen wurde hingegen eine erhöhte Expression von CtsB, CtsD und CtsZ im Vergleich zu WT-Gehirnen gezeigt (Brandenstein et al. 2016). Durch quantitative mRNA- und Immunoblot-Analysen wurde demonstriert, dass eine transkriptionelle Aktivierung der mRNA-Expression zur erhöhten CtsB, CtsD und CtsZ-Expression auf Proteinebene in Gehirnen der *Cln7 ko* Mäuse beiträgt (Brandenstein et al. 2016). Die Expression der analysierten Cathepsine stieg bis zum finalen Stadium der CLN7-Erkrankung bei Mäusen an. Die Diskrepanz in den Cts-Expressionsmustern zwischen in kultivierten *Cln7 ko* Zellen (MEFs und Makrophagen) und *Cln7 ko* Maushirnen zeigt, dass kultivierte *Cln7 ko* Zellen nur eingeschränkt als Modell für die chronisch fortschreitende, neurodegenerative CLN7-Erkrankung verwendbar sind. Das *Cln7 ko* Maushirn ist aufgrund krankheits- und altersbedingter Veränderungen und der Existenz multipler neuronaler Zelltypen (Neurone, Mikroglia, Astrozyten) wesentlich komplexer als Primärzellen. Wahrscheinliche Ursache für die erhöhten Cathepsin-Mengen in *Cln7 ko* Maushirnen ist die ab dem 5. Lebensmonat beginnende Neuroinflammation (Brandenstein et al. 2016). Es wurde gezeigt, dass aktivierte Mikrogliazellen der Zelltyp mit der höchsten Expression multipler Cathepsine sind (von Bernhardt et al. 2015). Ferner tritt *in vivo* eine Alterung der Neurone und Gliazellen ein, die bei der Kultivierung primärer Zellen aufgrund von Zellteilungen nicht stattfindet. Es wurde gezeigt, dass die Expression der Cathepsine bei Alterungsprozessen und verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, u.a. Morbus Alzheimer

ansteigt (Stoka et al. 2016). Erhöhte CtsB- und CtsD-Konzentrationen wurden im Gehirn von Mausmodellen der NPC1-Erkrankung (Amritraj et al. 2009), der GM1 Gangliosidose, der Gaucher-, Sandhoff- und Niemann-Pick Typ A-Erkrankungen gezeigt (Vitner et al. 2010). Eine Steigerung der Expression, proteolytischen Reifung und enzymatischen Aktivität von CtsD, CtsB und CtsL wurde in MEFs und Gehirnen älterer *Progranulin-knockout* Mäuse, einem Modell der CLN11-Erkrankung, gefunden (Götzl et al. 2018). Ferner wurden erhöhte *CTSD mRNA*-Konzentrationen im Gehirn von Morbus Alzheimer Patienten detektiert (Cataldo et al. 1995).

Obwohl die lysosomale Speicherung bei allen NCLs hauptsächlich in den Neuronen zu detektieren ist, ist es wahrscheinlich, dass die Gendefekte auch die Funktionen von Gliazellen, u. a. Mikroglia und Astrozyten, verändern. In Gehirnen von CLN7-Patienten post mortem wurden neben einer Astrozytose auch eine generalisierte Mikroglia-Aktivierung festgestellt (Sharifi et al. 2010). Ferner wurde eine progredient fortschreitende Mikrogliose und Astrozytose in Gehirnen von *Cln7 ko* Mäusen beginnend ab dem 5. Lebensmonat gezeigt (Brandenstein et al., 2016). In Schaf- und Mausmodellen für multiple NCL-Erkrankungen waren die Mikrogliose und Astrozytose in Hirnregionen mit nachfolgendem Neuronenverlust am stärksten (Cooper et al. 2015). Es ist daher möglich, dass die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten durch die Schädigung von Neuronen induziert wird.

Veränderungen des Immunsystems wurden bei vielen neurodegenerativen LSDs beschrieben. So findet man zahlreiche Berichte über das Vorliegen von dysfunktionalen Immunzellen oder Autoimmunerkrankungen bei Morbus Gaucher, Morbus Niemann-Pick und Mukopolysaccharidose Typ 1 (Liu et al. 2012; Rahman et al. 1998; Speak et al. 2014). Die Präsenz von Autoantikörpern gegen hirnspezifische Proteine in den Seren von CLN3-Patienten und eines *Cln3 ko*-Mausmodells weisen auf die Immunkomponente in der Pathogenese der CLN3-Erkrankung hin (Seehafer et al. 2011). Interessanterweise führte eine Immunsuppression mit Mycophenolatmofetil, einem Wirkstoff, der bei neurologischen Autoimmunerkrankungen als off-label Therapeutikum eingesetzt wird, in *Cln3 ko* Mäusen zu einer Verringerung von Serum-Autoantikörpern, der Abschwächung der Neuroinflammation und der Verbesserung der motorischen Funktionen (Seehafer et al. 2011). Eine kurzfristige Verabreichung dieses Medikaments über wenige Wochen zeigte bei CLN3-Patienten jedoch klinisch keinen therapeutischen Nutzen (Augustine et al. 2019). In Mausmodellen für die CLN1- und CLN3-Erkrankungen wurde gezeigt, dass die sekundäre Neuroinflammation die Neurodegeneration und den klinischen Verlauf verschlechterte (Groh et al. 2013; Groh et al. 2016). Die Verpaarung von CLN1- und CLN3 Mausmodellen mit Lymphozyten- oder Sialoadhesin-defizienten Mäusen zeigte, dass CD8-positive T-Lymphozyten für die Progression der Neurodegeneration und die klinische Verschlechterung kritisch waren. Ob die Suppression der Immunantwort einen therapeutischen Effekt bei den NCLs erzielt,

wurde bereits in präklinischen Studien untersucht. Die Behandlung der CLN1- und CLN3-Mausmodelle mit den Immunsuppressiva Fingolimod und Teriflunomide reduzierte die T-Zellzahlen und die Mikroglia-Aktivierung im Gehirn der Mäuse (Groh et al. 2017). Es ist wahrscheinlich, dass die Neuroinflammation eine wichtige Bedeutung bei dem zugrunde liegenden Pathomechanismus dieser schwerwiegenden lysosomalen Speichererkrankung besitzt. Trotzdem sind *Cln7 ko* Immunzellen bis *dato* nicht tiefgehend untersucht. Ein besseres Verständnis der immunologischen Mechanismen, die der Neuroinflammation zugrunde liegen, könnte die Entwicklung zielgerichteter Therapien fördern.

5.3 Identifizierung unbekannter interagierender Proteine des CLN7

Die Identifizierung von neuen Interaktionspartnern stellt neben quantitativen proteomischen Analysen einen weiteren Ansatz dar, die Funktion eines Proteins aufzuklären. Es wird angenommen, dass von 10.000 Proteinen, die von einer Zelle synthetisiert werden, über 80 % nicht isoliert funktionieren, sondern in Proteinkomplexen (Berggård et al. 2007).

Trotz der niedrigen Abundanz des CLN7-Proteins führt sein Fehlen zu lysosomaler Dysfunktion mit vorzeitiger, progressiv fortschreitender Neurodegeneration, was unterstreicht, dass CLN7 im Lysosomen-Netzwerk eine wichtige funktionelle Bedeutung besitzt. In Hochdurchsatzanalysen unter Verwendung der Affinity-Purification-Mass-Spectrometry-Methode wurden bisher 64 Interaktionspartner von CLN7 aus verschiedenen Zell-Kompartimenten identifiziert. Bislang fehlen jedoch experimentelle Daten, die belegen, ob die gefundenen Interaktionen auch eine funktionelle Bedeutung für die Biosynthese, Halbwertszeit, Lokalisation und Funktion von CLN7 besitzen (Huttlin et al. 2020).

Zur Identifizierung von Protein-Interaktionspartnern wurde ein Kopräzipitationsansatz mit transient transfizierten, GFP-CLN7-überexprimierenden HEK293-Zellen gewählt. Die N-terminale Fusionierung mit GFP ermöglichte die Immunpräzipitation von GFP-CLN7 durch kovalent gekoppelte GFP-Nanobodies (GFP-Trap *Beads*). Zur Minimierung unspezifischer CLN7-Protein-Interaktionen wurde vor Lyse der Zellen und GFP-Trap-Präzipitation eine mit Lysosomen und Mitochondrien angereicherte Membranfraktion präpariert. Kopräzipitierte Proteine wurden durch Massenspektrometrie identifiziert und anschließend nach erneuter Präzipitation aus Lysaten GFP-CLN7 überexprimierender HEK293-Zellen durch Western-Blot validiert (Abb. 19).

Als Kontrollprotein für die Kopräzipitationsanalysen wurde Sialin ausgewählt, da es einen niedrig exprimierten lysosomalen Membrantransporter darstellt, der sich gut in HEK293 Zellen exprimieren und durch GFP-Trap *Beads* effektiv aufreinigen lässt (Abb. 17). Das *SLC17A5*-Gen kodiert für den polytopen

lysosomalen Transporter Sialin (Tabelle 1), der Sequenzhomologien zu CLN7 besitzt und *N*-Acetylneuraminsäure aus dem Lysosom ins Zytosol exportiert (Morin et al. 2004; Verheijen et al. 1999). *SLC17A5* Gendefekte führen zur autosomal-rezessiv vererbaren, neurodegenerativen Salla-Krankheit (MIM# 604369), die durch mentale Retardierung, Hypotonie, zerebelläre Ataxie und Ausscheidung von Sialinsäure im Urin charakterisiert ist (Stevenson et al. 1983). Es wurden Patienten mit der schwer verlaufenden infantilen Form und einer milder verlaufenden adulten Form der Salla Erkrankung beschrieben (Huizing und Gahl 2020).

Zusammenfassend war Rab7 das einzige mit lysosomalen Membranen assoziierte Protein, welches durch die Kopräzipitationsexperimente als CLN7-Interaktionspartner identifiziert und durch Immunoblot-Analysen bestätigt wurde. Da nicht für alle identifizierten interagierenden Proteine kommerzielle Antikörper verfügbar waren, konnten nur für einen kleinen Teil der CLN7-Interaktionspartner Kontroll-Kopräzipitationsexperimente mit anschließender Detektion durch Immunoblot-Analysen durchgeführt werden. Rab-Proteine gehören zur Superfamilie der Ras-ähnlichen, monomeren GTPasen und existieren als molekulare Schalter in aktiven GTP-gebundenen und inaktiven GDP-gebundenen Konformationen (Zerial und McBride 2001). Die ca. 60 verschiedenen, beim Menschen bekannten Rab-Proteine sind intrazellulär in verschiedenen Organellen und Membrankompartimenten lokalisiert und sind wichtig für die Vesikel-Bildung, den Transport von Vesikeln/Organellen und die Anheftung von Vesikeln an die Zielmembranen (Stenmark 2009). Aufgrund der wichtigen Funktionen der Rab-Proteine beim zielgerichteten vesikulären Transport besitzen sie eine Bedeutung bei Prozessen wie der Endozytose, Exozytose und Autophagie (Agola et al. 2011; Chua et al. 2011). Rab7 zählt zu den am besten charakterisierten Rab-Proteinen und ist an unterschiedlichen zellulären Vorgängen beteiligt. Als endosomaler Marker kontrolliert es die Reifung von frühen Endosomen in späte Endosomen, den Transport von späten Endosomen zu Lysosomen, die Biogenese von Lysosomen und die Clusterbildung und Fusion von späten Endosomen und Lysosomen (Stroupe 2018).

Besonders hervorzuheben ist im Kontext mit der Thematik der vorliegenden Arbeit die grundlegende Beteiligung von Rab7 an neuronalen Prozessen wie dem axonalen Transport in Motorneuronen oder dem Wachstum von Neuriten (Deinhardt et al. 2006; Saxena et al. 2005). Die Bedeutung von Rab7 für neuronale Funktionen wird auch durch Patienten mit Mutationen im *RAB7*-Gen unterstrichen, die zur autosomal dominant vererbaren Morbus Charcot-Marie-Tooth Typ 2B Erkrankung, einer Form der peripheren motorisch-sensorischen Neuropathie, führen (Bucci und De Luca 2012). Obwohl Rab7 ein ubiquitär exprimiertes Protein ist, sind weitere Erkrankungen im Zusammenhang mit *RAB7*-Gen-Mutationen bisher nicht bekannt. Kürzlich wurde gezeigt, dass Kontakte zwischen Lysosomen und Mitochondrien durch aktives GTP-gebundenes Rab7 gefördert werden (Wong et al. 2018).

Die funktionelle Bedeutung der CLN7-Rab7 Interaktion müsste durch Bestimmung der Lokalisation, Halbwertszeit und intrazellulärer Sortierung von CLN7 in Rab7-herunterregulierten oder -knockout Zellen untersucht werden. Ferner müsste die CLN7-Rab7 Interaktion in einer neuronalen Zelllinie mit endogenem CLN7 bestätigt werden. Aufgrund der Assoziation von GTP-gebundenem, aktivem Rab7 mit der Außenseite der lysosomalen Membran, wäre eine direkte CLN7-Rab7 Interaktion nur mit den zum Zytosol projizierten Domänen, also den N- und C-terminalen Domänen oder den zytosolischen Schleifen von CLN7, möglich (Abb. 3, Bucci et al. 2000). Die CLN7-Rab7 Interaktion müsste auch durch Ko-Lokalisationsstudien in der Immunfluoreszenz und durch Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-Experimente verifiziert werden. Für diese *in vitro*-Experimente wäre sicherlich auch die kürzlich etablierte zerebelläre *Cln7 ko* Zelllinie nützlich (von Kleist et al. 2019).

Neben der in der vorliegenden Arbeit gefundenen CLN7-Rab7 Interaktion wurden auch CLN3-Rab7 und CLN5-Rab7 Interaktionen *in vitro* beschrieben (Mamo et al. 2012; Uusi-Rauva et al. 2012). CLN3 ist ein lysosomales polytopes Membranglykoprotein mit unbekannter Funktion, dessen Defizienz zur neurodegenerativen CLN3-Erkrankung führt (Mole et al. 2011). Yasa und Kollegen bestätigten die CLN3-Rab7 Interaktion auch *in vivo* durch BRET-Experimente und zeigten darüber hinaus, dass sie für die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen und den retrograden Transport von Cargo-Rezeptoren zwischen Endosomen und dem TGN wichtig ist (Yasa et al. 2020). Die Daten bestätigten die funktionelle Bedeutung der CLN3-Rab7 Interaktion. Durch Kopräzipitations-experimente wurde gezeigt, dass CLN5 mit WT Rab7, der dominant-aktiven Rab7 Q67L und der dominant-negativen Rab7 T22N Mutante interagiert (Mamo et al. 2012).

5.3.1 Intermolekulare Wechselwirkung von CLN7

Wie in den vorherigen Abschnitten erwähnt, ist bisher weder die Funktion noch die Tertiärstruktur von CLN7 bekannt. Dimere/Oligomere stellen oftmals die korrekt gefaltete, funktionell aktive Konformation eines Proteins dar. Disulfidbindungen zwischen zwei Cysteinresten sind wichtig bei der Faltung, Stabilität und Funktion einiger Proteine (Löffler 1998).

Das humane CLN7 enthält zwei Cysteinreste in den Positionen 401 und 408, die aufgrund ihrer Lokalisation in der luminalen Schleife L9 potenziell intramolekulare oder intermolekulare Disulfidbrücken bilden könnten (Abb. 20). Expressionsanalysen von WT und einer *N*-Glykosylierungsdefizienten CLN7-Mutante (N371Q, N376Q) mit anschließender Solubilisierung der Proteine unter nicht-reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen zeigten jedoch, dass CLN7 nicht als Dimer oder Oligomer in Membranen existiert (Abb. 21). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Cysteinreste

intermolekulare Disulfidbrücken zwischen benachbarten CLN7-Proteinen ausbilden. Nach einzelner Substitution der Cysteinreste in den Positionen 401 und 408 durch Serin im CLN7 Protein war die elektrophoretische Mobilität der mutanten CLN7 C401S und CLN7 C408S Proteine im Vergleich zu dem WT-Protein nicht verändert (Abb. 21). Ferner waren keine Unterschiede in der Expression der mutanten CLN7-Proteine und der proteolytischen Spaltung zur 36 kDa CLN7-Form im Lysosom im Vergleich zum WT-Protein zu detektieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Einzelaustausch der Cysteinreste zu keiner Fehlfaltung und zu keiner Retention der mutanten CLN7-Proteine im ER führt. Aufgrund der Daten ist es wahrscheinlich, dass die Cysteinreste 401 und 408 von humanem CLN7 weder intramolekular noch intermolekular Disulfidbrücken bilden (Abb. 21).

6 Zusammenfassung

Die CLN7-Erkrankung ist eine autosomal-rezessiv vererbare, neurodegenerative lysosomale Speichererkrankung des Kindesalters, die durch Defekte im *CLN7/MFSD8* Gen verursacht wird. *CLN7/MFSD8* kodiert für das polytope lysosomale Membranprotein CLN7 mit putativer, sekundär aktiver Transporterfunktion. Die Funktion(en) und Substrate von CLN7 sowie die molekularen Ursachen von Störungen der lysosomalen Biogenese/Funktion und der Autophagie sind bisher unbekannt. Eine *Cln7 knockout (Cln7 ko)* Maus, die Hauptmerkmale der CLN7-Erkrankung rekapituliert, und abgeleitete Primärzellen dienten als Modelle für die experimentellen Analysen.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch vergleichende quantitative Proteomanalysen aufgereinigter Lysosomen aus embryonalen *WT* und *Cln7 ko* Mausfibroblasten analysiert, ob die Defizienz des putativen CLN7-Membrantransporters zu quantitativen Veränderungen löslicher lysosomaler Proteine und lysosomaler Membranproteine führt. In den quantitativen Proteomanalysen wurden 56 lösliche lysosomale Proteine und 29 lysosomale Membranproteine isoliert und massenspektrometrisch identifiziert. Durch anschließende Immunoblot-Analysen wurde bestätigt, dass die Konzentrationen von Cln5, Dpp7, Npc2, Ppt1, in *Cln7 ko* Lysosomen im Vergleich zu *WT* Lysosomen erniedrigt waren, die Creg1-Mengen waren in *Cln7 ko* Lysosomen erhöht. Die Konzentrationen der identifizierten lysosomalen Membranproteine waren mit Ausnahme einer geringen Depletion der G1- und D-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ H⁺ ATPase-Komplexes in *Cln7 ko* Lysosomen im Vergleich zu *WT* Lysosomen nicht verändert. Die Depletion von Cln5 in *Cln7 ko* Lysosomen war nicht durch eine verminderte *Cln5* mRNA- und Protein-Biosynthese, einen Prozessierungsdefekt oder eine erhöhte Sekretion ins Medium, sondern durch einen erhöhten proteolytischen Abbau durch lysosomale Cysteinproteasen zu erklären. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Defizienz des putativen Membrantransporters Cln7 zur Depletion multipler löslicher lysosomaler Proteine führte, was möglicherweise zu lysosomaler Dysfunktion und progredient fortschreitender Akkumulation von Speichermaterial in Cln7-Tiermodellen und bei CLN7-Patienten beiträgt.

Expressionsanalysen in primären kultivierten *Cln7 ko* Makrophagen zeigten 2,5-fach höhere Ctss-Konzentrationen im Vergleich zu *WT*-Kontrollzellen. Bei der Analyse lysosomaler Cathepsine wurden verminderte CtsD-Mengen bei unveränderten CtsB-, CtsL- und CtsZ-Konzentrationen in *Cln7 ko* Makrophagen gefunden. Eine lysosomale Dysfunktion in primären *Cln7 ko* Makrophagen wurde durch die Speicherung des membranständigen N-terminalen CD74-Fragments und SCMAS detektiert. Die Daten zeigen, dass primäre *Cln7 ko* Makrophagen ein geeignetes Zellmodell zur Analyse molekularer Veränderungen bei der CLN7-Erkrankung sind. Kopräzipitationsexperimente in Verbindung mit massenspektrometrischer Identifizierung der Protein-Interaktionspartner in Extrakten von GFP-CLN7

überexprimierenden HEK293-Zellen zeigten, dass CLN7 mit der kleinen GTPase Rab7 spezifisch interagiert.

7 Summary

CLN7 disease is an autosomal recessive inherited childhood-onset neurodegenerative lysosomal storage disease caused by defects in the *CLN7/MFSD8* gene. *CLN7/MFSD8* encodes the polytopic lysosomal membrane protein CLN7 with putative secondary active transporter function. The function and substrates of CLN7 and the connection between CLN7 defects and impaired lysosomal biogenesis, lysosomal function and autophagy are currently not well understood. A recently generated *Cln7 knockout (Cln7 ko)* mouse model which recapitulated key features of CLN7 disease and derived primary cells were used for the experimental analyses.

In the present work comparative quantitative proteomic analyses of isolated lysosomes from *WT* and *Cln7 ko* mouse embryonic fibroblasts were performed to analyze changes in soluble lysosomal proteins and lysosomal membrane proteins in the absence of functional Cln7. In the quantitative proteomic studies 56 soluble lysosomal proteins and 29 lysosomal membrane proteins were identified by mass spectrometry. Immunoblot analyses verified decreased concentrations of Cln5, Npc2, Ppt1, Dpp7 and increased Creg1 levels in *Cln7 ko* lysosomes compared with *WT* lysosomes. The concentrations of the identified lysosomal membrane proteins were except a minor depletion of the G1- und D-subunits of the V1 domain of the v-type H⁺ ATPase-complex not significantly changed in *Cln7 ko* lysosomes. Depletion of Cln5 in *Cln7 ko* lysosomes was not due to decreased *Cln5* mRNA- and protein biosynthesis, processing defects, or increased secretion into the medium, but rather by increased proteolytic degradation mediated by lysosomal cysteine proteases. In summary, loss of the putative lysosomal membrane transporter Cln7 led to depletion of multiple soluble lysosomal proteins, which may contribute to lysosomal dysfunction and the progressive accumulation of storage material in Cln7 animal models and human CLN7 patients.

Expression analyses in primary *Cln7 ko* macrophages showed a 2,5-fold increased Ctss expression compared with *WT* macrophages. Analyses of cathepsin concentrations revealed decreased CtsD levels in *Cln7 ko* macrophages whereas concentrations of CtsB, CtsL und CtsZ were unchanged in *Cln7 ko* macrophages. Lysosomal dysfunction in *Cln7 ko* macrophages was shown by the accumulation of the membrane-bound N-terminal CD74 fragment and the presence of storage material containing SCMAS. The data show that primary *Cln7 ko* macrophages represent a valid model to analyze molecular changes in CLN7 disease. Finally, coprecipitation experiments in combination with identification of protein interaction partners by mass spectrometry in extracts of GFP-CLN7 expressing HEK293 cells revealed that CLN7 specifically interacts with the small GTPase Rab7.

8 Massenspektrometrisch identifizierte lysosomale Proteine

Tabelle 3: Lösliche lysosomale Proteine

#	Uniprot ID	Protein	Gen	Mittelwert	SD
1	O70370	Cathepsin S	<i>Ctss</i>	13,43	6,75
2	P55097	Cathepsin K	<i>Ctsk</i>	2,19	1,18
3	Q61207	Prosaposin	<i>Psap</i>	1,25	0,22
4	O88668	Protein CREG1	<i>Creg1</i>	1,22	0,22
5	Q571E4	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	<i>Galns</i>	1,17	0,89
6	P97821	Dipeptidyl peptidase 1 / Cathepsin C	<i>Ctsc</i>	1,16	0,69
7	Q6YGGZ1	Heparanase	<i>Hpse</i>	1,15	0,31
8	P70158	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	<i>Smpdl3a</i>	1,08	0,16
9	O35405	Phospholipase D3	<i>Pld3</i>	1,05	0,31
10	P17439	Glucosylceramidase	<i>Gba</i>	1,05	0,06
11	P29416	β -Hexosaminidase subunit α	<i>Hexa</i>	1,03	0,25
12	P06797	Cathepsin L	<i>Ctsl</i>	0,98	0,21
13	P50429	Arylsulfatase B	<i>Arsb</i>	0,98	0,37
14	Q05117	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	<i>Acp5</i>	0,97	0,30
15	Q9D2L1	Arylsulfatase K	<i>Arsk</i>	0,97	0,45
16	O89023	Tripeptidyl-peptidase 1	<i>Tpp1</i>	0,96	0,17
17	P24638	Lysosomal acid phosphatase	<i>Acp2</i>	0,95	0,26
18	Q9WV54	Acid ceramidase	<i>Asah1</i>	0,95	0,17
19	Q9Z0M5	Lysosomal acid lipase	<i>Lipa</i>	0,93	0,12
20	P12265	β -Glucuronidase	<i>Gusb</i>	0,92	0,34
21	P28798	Progranulin	<i>Grn</i>	0,91	0,29
22	Q920A5	Retinoid-inducible serine carboxypeptidase	<i>Scpepl</i>	0,91	0,17
23	Q99LJ1	α -L-fucosidase 1	<i>Fuca1</i>	0,90	0,38
24	P16675	Lysosomal protective protein / Cathepsin A	<i>Ctsa</i>	0,90	0,08
25	P56542	Deoxyribonuclease-2- α	<i>Dnase2a</i>	0,88	0,13
26	P10605	Cathepsin B	<i>Ctsb</i>	0,87	0,10
27	P20060	β -Hexosaminidase subunit β	<i>Hexb</i>	0,86	0,35
28	Q9Z0L8	γ -glutamyl hydrolase	<i>Ggh</i>	0,86	0,13
29	O89017	Legumain	<i>Lgmn</i>	0,85	0,18

30	Q3TCN2	Putative phospholipase B-like 2	<i>Plbd2</i>	0,85	0,12	
31	Q60648	Ganglioside GM2 activator	<i>Gm2a</i>	0,84	0,24	
32	Q8K2I4	β -Mannosidase	<i>Manba</i>	0,83	0,13	
33	Q9WUU7	Cathepsin Z	<i>Ctsz</i>	0,82	0,29	
34	O09159	Lysosomal α -mannosidase	<i>Man2b1</i>	0,82	0,22	
35	P51569	α -Galactosidase A	<i>Gla</i>	0,81	0,21	
36	P70699	Lysosomal α -glucosidase	<i>Gaa</i>	0,80	0,12	
37	P18242	Cathepsin D	<i>Ctsd</i>	0,79	0,18	
38	P50428	Arylsulfatase A	<i>Arsa</i>	0,79	0,24	
39	O54782	Epididymis-specific α -mannosidase	<i>Man2b2</i>	0,79	0,30	
40	P58242	Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b	<i>Smpdl3b</i>	0,78	0,13	
41	Q9QWR8	α -N-acetylgalactosaminidase	<i>Naga</i>	0,77	0,38	
42	O88531	Palmitoyl-protein thioesterase 1	<i>Ppt1</i>	0,77	0,08	
43	P54818	Galactocerebrosidase	<i>Galc</i>	0,76	0,04	
44	P23780	β -Galactosidase	<i>Glb1</i>	0,76	0,11	
45	Q9WVJ3	Carboxypeptidase Q	<i>Cpq</i>	0,75	0,04	
46	Q8VEB4	Group XV phospholipase A2	<i>Pla2g15</i>	0,75	0,21	
47	Q8BFR4	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	<i>Gns</i>	0,73	0,07	
48	Q9Z0J0	Niemann Pick type C2 protein	<i>Npc2</i>	0,72	0,17	
49	Q9CQF9	Preylcysteine oxidase	<i>Pcyox1</i>	0,70	0,14	
50	Q9ET22	Dipeptidyl peptidase 2	<i>Dpp7</i>	0,66	0,09	
51	Q64191	Aspartylglucosaminidase	<i>Aga</i>	0,65	0,15	
52	Q9D7V9	N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase	<i>Naaa</i>	0,62	0,14	
53	Q99M71	Mammalian ependymin-related protein 1	<i>Epdr1</i>	0,61	0,24	
54	Q3UMW8	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 homolog	<i>Cln5</i>	0,58	0,09	***
55	Q7TMR0	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	<i>Prcp</i>	0,53	0,16	***
56	P70665	Sialate O-acetylerase	<i>Siae</i>	0,50	0,24	

*** p < 0,001 im Vergleich zur Wild-Typ-Kontrolle, SD: Standardabweichung

Tabelle 4: Lysosomale Membranproteine

#	Uniprot ID	Protein	Gen	Mittelwert	SD
1	<i>Q8CIF6</i>	<i>SID1 transmembrane family member 2</i>	<i>Sidt2</i>	1,53	0,68
2	<i>P15920</i>	<i>V-ATPase 116 kDa subunit A2</i>	<i>Atp6v0a2</i>	1,47	0,50
3	<i>Q91YT8</i>	Transmembrane protein 63A	<i>Tmem63a</i>	1,20	0,12
4	<i>Q91VK4</i>	Integral membrane protein 2C	<i>Itm2c</i>	1,19	0,38
5	<i>O35114</i>	Lysosome membrane protein 2	<i>Limp2</i>	1,17	0,12
6	<i>Q9JHJ3</i>	Glycosylated lysosomal membrane protein	<i>Glmp</i>	1,16	0,22
7	<i>Q60961</i>	Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	<i>Laptm4a</i>	1,11	0,28
8	<i>Q8K4D3</i>	Lyaat1 / H ⁺ -coupled amino acid transporter 1	<i>Slc36a1</i>	1,10	0,05
9	<i>Q9DC37</i>	Major facilitator superfamily domain-containing protein 1	<i>Mfsd1</i>	1,10	0,11
10	<i>O35604</i>	Niemann-Pick type C1 protein	<i>Npc1</i>	1,04	0,16
11	<i>Q9CZX7</i>	Transmembrane protein 55A	<i>Tmem55a</i>	1,04	0,06
12	<i>O70496</i>	H ⁺ /Cl ⁻ -exchange transporter 7	<i>Clcn7</i>	1,03	0,15
13	<i>P41731</i>	CD63 antigen	<i>Cd63</i>	1,01	0,16
14	<i>Q3TWL2</i>	Transmembrane protein 55B	<i>Tmem55b</i>	0,99	0,09
15	<i>P57757</i>	Cystinosin	<i>Cms</i>	0,98	0,27
16	<i>P51863</i>	V-ATPase subunit D1	<i>Atp6v0d1</i>	0,90	0,07
17	<i>Q9R1Q9</i>	V-ATPase subunit S1	<i>Atp6ap1</i>	0,90	0,13
18	<i>P11438</i>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	<i>Lamp1</i>	0,89	0,18
19	<i>Q9Z1G3</i>	V-ATPase subunit C1	<i>Atp6v1c1</i>	0,87	0,07
20	<i>P50518</i>	V-ATPase subunit E1	<i>Atp6v1e1</i>	0,85	0,08
21	<i>P63082</i>	V-ATPase 16 kDa proteolipid subunit	<i>Atp6v0c</i>	0,84	0,04
22	<i>Q9D1K2</i>	V-ATPase subunit F	<i>Atp6v1f</i>	0,84	0,03
23	<i>Q8BVE3</i>	V-ATPase subunit H	<i>Atp6v1h</i>	0,83	0,14
24	<i>P62814</i>	V-ATPase subunit B2	<i>Atp6v1b2</i>	0,83	0,09
25	<i>P50516</i>	V-ATPase catalytic subunit A	<i>Atp6v1a</i>	0,82	0,08
26	<i>P17047</i>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	<i>Lamp2</i>	0,82	0,23
27	<i>Q9CXT7</i>	Transmembrane protein 192	<i>Tmem192</i>	0,81	0,07
28	<i>Q9CR51</i>	V-ATPase subunit G1	<i>Atp6v1g1</i>	0,73	0,10
29	<i>P57746</i>	V-ATPase subunit D	<i>Atp6v1d</i>	0,71	0,13

Kursiv gedruckte Proteine wurden nur in zwei von vier Messungen identifiziert.

9 Literaturverzeichnis

- Adam, T., L. Alexandrescu, F. Voinea, M. Toringhibel, und A. Hancu. 2006. Fabry's disease. *Rom J Intern Med.* 44:455-464.
- Agola, J.O., P.A. Jim, H.H. Ward, S. Basuray, und A. Wandinger-Ness. 2011. Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. *Clin Genet.* 80:305-318.
- Ahtiainen, L., J. Kolikova, A.L. Mutka, K. Luiro, M. Gentile, E. Ikonen, L. Khiroug, A. Jalanko, und O. Kopra. 2007. Palmitoyl protein thioesterase 1 (Ppt1)-deficient mouse neurons show alterations in cholesterol metabolism and calcium homeostasis prior to synaptic dysfunction. *Neurobiol Dis.* 28:52-64.
- Aiello, C., A. Terracciano, A. Simonati, G. Discepoli, N. Cannelli, D. Claps, Y.J. Crow, M. Bianchi, C. Kitzmuller, D. Longo, A. Tavoni, E. Franzoni, A. Tessa, E. Veneselli, R. Boldrini, M. Filocamo, R.E. Williams, E.S. Bertini, R. Biancheri, R. Carrozzo, S.E. Mole, und F.M. Santorelli. 2009. Mutations in MFSD8/CLN7 are a frequent cause of variant-late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mutat.* 30:E530-540.
- Aldahmesh, M.A., Z.N. Al-Hassnan, M. Aldosari, und F.S. Alkuraya. 2009. Neuronal ceroid lipofuscinosis caused by MFSD8 mutations: a common theme emerging. *Neurogenetics.* 10:307-311.
- Amritraj, A., K. Peake, A. Kodam, C. Salio, A. Merighi, J.E. Vance, und S. Kar. 2009. Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice. *Am J Pathol.* 175:2540-2556.
- Anderson, G.W., H.H. Goebel, und A. Simonati. 2013. Human pathology in NCL. *Biochim Biophys Acta.* 1832:1807-1826.
- Ashwini, A., A. D'Angelo, O. Yamato, C. Giordano, G. Cagnotti, T. Harcourt-Brown, T. Mhlanga-Mutangadura, J. Guo, G.S. Johnson, und M.L. Katz. 2016. Neuronal ceroid lipofuscinosis associated with an MFSD8 mutation in Chihuahuas. *Mol Genet Metab.* 118:326-332.
- Augustine, E.F., C.A. Beck, H.R. Adams, S. Defendorf, A. Vierhile, D. Timm, J.M. Weimer, J.W. Mink, und F.J. Marshall. 2019. Short-Term Administration of Mycophenolate Is Well-Tolerated in CLN3 Disease (Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis). *JIMD Rep.* 43:117-124.
- Bajaj, L., J. Sharma, A. di Ronza, P. Zhang, A. Eblimit, R. Pal, D. Roman, J.R. Collette, C. Booth, K.T. Chang, R.N. Sifers, S.Y. Jung, J.M. Weimer, R. Chen, R.W. Schekman, und M. Sardiello. 2020. A CLN6-CLN8 complex recruits lysosomal enzymes at the ER for Golgi transfer. *J Clin Invest.* 130:4118-4132.
- Ballabio, A., und J.S. Bonifacino. 2020. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21:101-118.

- Bargal, R., N. Avidan, E. Ben-Asher, Z. Olender, M. Zeigler, A. Frumkin, A. Raas-Rothschild, G. Glusman, D. Lancet, and G. Bach. 2000. Identification of the gene causing mucopolipidosis type IV. *Nat Genet.* 26:118-123.
- Bauwens, M., S. Storch, N. Weisschuh, C. Ceuterick-de Groote, R. De Rycke, B. Guillemin, S. De Jaegere, F. Coppeters, R. Van Coster, B.P. Leroy, and E. De Baere. 2020. Functional characterization of novel MFSD8 pathogenic variants anticipates neurological involvement in juvenile isolated maculopathy. *Clin Genet.* 97:426-436.
- Berggård, T., S. Linse, and P. James. 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics.* 7:2833-2842.
- Berkovic, S.F., L.M. Dibbens, A. Oshlack, J.D. Silver, M. Katerelos, D.F. Vears, R. Lullmann-Rauch, J. Blanz, K.W. Zhang, J. Stankovich, R.M. Kalnins, J.P. Dowling, E. Andermann, F. Andermann, E. Faldini, R. D'Hooge, L. Vadlamudi, R.A. Macdonell, B.L. Hodgson, M.A. Bayly, J. Savige, J.C. Mulley, G.K. Smyth, D.A. Power, P. Saftig, and M. Bahlo. 2008. Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis. *Am J Hum Genet.* 82:673-684.
- Bi, X., and G. Liao. 2010. Cholesterol in Niemann-Pick Type C disease. *Subcell Biochem.* 51:319-335.
- Bird, P.I., J.A. Trapani, and J.A. Villadangos. 2009. Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. *Nature Reviews Immunology.* 9:871-882.
- Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS.* 8:93-99.
- Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 72:395-447.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brandenstein, L., M. Schweizer, J. Sedlaczek, J. Fiehler, and S. Storch. 2016. Lysosomal dysfunction and impaired autophagy in a novel mouse model deficient for the lysosomal membrane protein Cln7. *Hum Mol Genet.* 25:777-791.
- Brauer, A.U., A. Kuhla, C. Holzmann, A. Wree, and M. Witt. 2019. Current Challenges in Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms in Niemann-Pick Disease Type C1. *Int J Mol Sci.* 20.
- Braulke, T., and J.S. Bonifacino. 2009. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1793:605-614.
- Breiden, B., and K. Sandhoff. 2019. Lysosomal Glycosphingolipid Storage Diseases. *Annu Rev Biochem.* 88:461-485.
- Bucci, C., and M. De Luca. 2012. Molecular basis of Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *Biochem Soc Trans.* 40:1368-1372.

- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, and B. van Deurs. 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 11:467-480.
- Bursch, W. 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 8:569-581.
- Canuel, M., A. Korkidakis, K. Konnyu, and C.R. Morales. 2008. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun*. 373:292-297.
- Cardullo, R.A., S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, and D.E. Wolf. 1988. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:8790-8794.
- Carette, J.E., M. Raaben, A.C. Wong, A.S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A.I. Kuehne, P.J. Kranzusch, A.M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J.M. Dye, S.P. Whelan, K. Chandran, and T.R. Brummelkamp. 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*. 477:340-343.
- Carstea, E.D., J.A. Morris, K.G. Coleman, S.K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M.A. Rosenfeld, W.J. Pavan, D.B. Krizman, J. Nagle, M.H. Polymeropoulos, S.L. Sturley, Y.A. Ioannou, M.E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C.R. Kaneski, E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, E.B. Neufeld, T.Y. Chang, L. Liscum, J.F. Strauss, 3rd, K. Ohno, M. Zeigler, R. Carmi, J. Sokol, D. Markie, R.R. O'Neill, O.P. van Diggelen, M. Elleder, M.C. Patterson, R.O. Brady, M.T. Vanier, P.G. Pentchev, and D.A. Tagle. 1997. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. 277:228-231.
- Cataldo, A.M., J.L. Barnett, S.A. Berman, J. Li, S. Quarless, S. Bursztajn, C. Lippa, and R.A. Nixon. 1995. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*. 14:671-680.
- Chapel, A., S. Kieffer-Jaquinod, C. Sagne, Q. Verdon, C. Ivaldi, M. Mellal, J. Thirion, M. Jadot, C. Bruley, J. Garin, B. Gasnier, and A. Journet. 2013. An extended proteome map of the lysosomal membrane reveals novel potential transporters. *Mol Cell Proteomics*. 12:1572-1588.
- Chapman, H.A., R.J. Riese, and G.P. Shi. 1997. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*. 59:63-88.
- Chua, C.E., B.Q. Gan, and B.L. Tang. 2011. Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cell Mol Life Sci*. 68:3349-3358.
- Collins, M.P., and M. Forgac. 2020. Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*:183341.
- Connolly, K.J., M.B. O'Hare, A. Mohammed, K.M. Aitchison, N.C. Anthoney, M.J. Taylor, B.A. Stewart, R.I. Tuxworth, and G. Tear. 2019. The neuronal ceroid lipofuscinosis protein Cln7 functions in the postsynaptic cell to regulate synapse development. *Sci Rep*. 9:15592.
- Cooper, J.D., M.A. Tarczyluk, and H.R. Nelvagal. 2015. Towards a new understanding of NCL pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1852:2256-2261.

- Cotman, S.L., und J.F. Staropoli. 2012. The juvenile Batten disease protein, CLN3, and its role in regulating anterograde and retrograde post-Golgi trafficking. *Clin Lipidol.* 7:79-91.
- Cotter, K., L. Stransky, C. McGuire, und M. Forgac. 2015. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends Biochem Sci.* 40:611-622.
- Coutinho, M.F., M.J. Prata, und S. Alves. 2012. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol Genet Metab.* 107:257-266.
- Craiu, D., O. Dragostin, A. Dica, D. Hoffman-Zacharska, M. Gos, A.E. Bastian, M. Gherghiceanu, A. Rolfs, N. Nahavandi, M. Craiu, und C. Iiescu. 2015. Rett-like onset in late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN7) caused by compound heterozygous mutation in the MFSD8 gene and review of the literature data on clinical onset signs. *Eur J Paediatr Neurol.* 19:78-86.
- Damme, M., L. Brandenstein, S. Fehr, W. Jankowiak, U. Bartsch, M. Schweizer, I. Hermans-Borgmeyer, und S. Storch. 2014. Gene disruption of Mfsd8 in mice provides the first animal model for CLN7 disease. *Neurobiol Dis.* 65:12-24.
- Danyukova, T., K. Ariunbat, M. Thelen, N. Brocke-Ahmadinejad, S.E. Mole, und S. Storch. 2018. Loss of CLN7 results in depletion of soluble lysosomal proteins and impaired mTOR reactivation. *Hum Mol Genet.* 27:1711-1722.
- De Duve, C. 1957. [The lysosomes: a novel group of cytoplasmic granules]. *J Physiol (Paris).* 49:113-115.
- de Duve, C. 1983. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem.* 137:391-397.
- Deinhardt, K., S. Salinas, C. Verastegui, R. Watson, D. Worth, S. Hanrahan, C. Bucci, und G. Schiavo. 2006. Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron.* 52:293-305.
- Dell'Angelica, E.C., C. Mullins, S. Caplan, und J.S. Bonifacino. 2000. Lysosome-related organelles. *Faseb j.* 14:1265-1278.
- di Ronza, A., L. Bajaj, J. Sharma, D. Sanagasetti, P. Lotfi, C.J. Adamski, J. Collette, M. Palmieri, A. Amawi, L. Popp, K.T. Chang, M.C. Meschini, H.E. Leung, L. Segatori, A. Simonati, R.N. Sifers, F.M. Santorelli, und M. Sardiello. 2018. CLN8 is an endoplasmic reticulum cargo receptor that regulates lysosome biogenesis. *Nat Cell Biol.* 20:1370-1377.
- Doumas, S., A. Kolokotronis, und P. Stefanopoulos. 2005. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun.* 73:1271-1274.
- Elleder, M., Z. Drahota, V. Lisa, V. Mares, V. Mandys, J. Muller, und D.N. Palmer. 1995. Tissue culture loading test with storage granules from animal models of neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten disease): testing their lysosomal degradability by normal and Batten cells. *Am J Med Genet.* 57:213-221.
- Eskelinen, E.L., C.K. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, K. von Figura, E. Knecht, und P. Saftig. 2004. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 15:3132-3145.

- Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13:137-145.
- Faller, K.M., J. Bras, S.J. Sharpe, G.W. Anderson, L. Darwent, C. Kun-Rodrigues, J. Alroy, J. Penderis, S.E. Mole, R. Gutierrez-Quintana, and R.J. Guerreiro. 2016. The Chihuahua dog: A new animal model for neuronal ceroid lipofuscinosis CLN7 disease? *J Neurosci Res.* 94:339-347.
- Faller, K.M., R. Gutierrez-Quintana, A. Mohammed, A.A. Rahim, R.I. Tuxworth, K. Wager, and M. Bond. 2015. The neuronal ceroid lipofuscinoses: Opportunities from model systems. *Biochim Biophys Acta.* 1852:2267-2278.
- Fan, X., H. Zhang, S. Zhang, R.D. Bagshaw, M.B. Tropak, J.W. Callahan, and D.J. Mahuran. 2006. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am J Hum Genet.* 79:738-744.
- Fossale, E., P. Wolf, J.A. Espinola, T. Lubicz-Nawrocka, A.M. Teed, H. Gao, D. Rigamonti, E. Cattaneo, M.E. MacDonald, and S.L. Cotman. 2004. Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Neurosci.* 5:57.
- Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem.* 266:21327-21330.
- Fuller, M., P.J. Meikle, and J.J. Hopwood. 2006. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. A. Mehta, M. Beck, and G. Sunder-Plassmann, editors. Oxford PharmaGenesis, Oxford.
- Gao, Y., Y. Chen, S. Zhan, W. Zhang, F. Xiong, and W. Ge. 2017. Comprehensive proteome analysis of lysosomes reveals the diverse function of macrophages in immune responses. *Oncotarget.* 8:7420-7440.
- Götzl, J.K., A.V. Colombo, K. Fellerer, A. Reifschneider, G. Werner, S. Tahirovic, C. Haass, and A. Capell. 2018. Early lysosomal maturation deficits in microglia triggers enhanced lysosomal activity in other brain cells of progranulin knockout mice. *Mol Neurodegener.* 13:48.
- Groh, J., K. Berve, and R. Martini. 2017. Fingolimod and Teriflunomide Attenuate Neurodegeneration in Mouse Models of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Mol Ther.* 25:1889-1899.
- Groh, J., T.G. Kuhl, C.W. Ip, H.R. Nelvagal, S. Sri, S. Duckett, M. Mirza, T. Langmann, J.D. Cooper, and R. Martini. 2013. Immune cells perturb axons and impair neuronal survival in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain.* 136:1083-1101.
- Groh, J., E. Ribechini, D. Stadler, T. Schilling, M.B. Lutz, and R. Martini. 2016. Sialoadhesin promotes neuroinflammation-related disease progression in two mouse models of CLN disease. *Glia.* 64:792-809.
- Guevar, J., P. Hug, F. Giebels, A. Durand, V. Jagannathan, and T. Leeb. 2020. A major facilitator superfamily domain 8 frameshift variant in a cat with suspected neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Vet Intern Med.* 34:289-293.

- Guo, J., D.P. O'Brien, T. Mhlanga-Mutangadura, N.J. Olby, J.F. Taylor, R.D. Schnabel, M.L. Katz, and G.S. Johnson. 2015. A rare homozygous MFSD8 single-base-pair deletion and frameshift in the whole genome sequence of a Chinese Crested dog with neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Vet Res.* 10:960.
- Hers, H.G. 1963. alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *Biochem J.* 86:11-16.
- Heybrock, S., K. Kanerva, Y. Meng, C. Ing, A. Liang, Z.J. Xiong, X. Weng, Y. Ah Kim, R. Collins, W. Trimble, R. Pomes, G.G. Prive, W. Annaert, M. Schwake, J. Heeren, R. Lullmann-Rauch, S. Grinstein, E. Ikonen, P. Saftig, and D. Neculai. 2019. Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export. *Nat Commun.* 10:3521.
- Honey, K., and A.Y. Rudensky. 2003. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 3:472-482.
- Hosseini Bereshneh, A., and M. Garshasbi. 2018. Novel in-frame deletion in MFSD8 gene revealed by trio whole exome sequencing in an Iranian affected with neuronal ceroid lipofuscinosis type 7: a case report. *J Med Case Rep.* 12:281.
- Hrebicek, M., L. Mrazova, V. Seyrantepe, S. Durand, N.M. Roslin, L. Noskova, H. Hartmannova, R. Ivanek, A. Cizkova, H. Poupetova, J. Sikora, J. Urinovska, V. Stranecky, J. Zeman, P. Lepage, D. Roquis, A. Verner, J. Ausseil, C.E. Beesley, I. Maire, B.J. Poorthuis, J. van de Kamp, O.P. van Diggelen, R.A. Wevers, T.J. Hudson, T.M. Fujiwara, J. Majewski, K. Morgan, S. Kmoch, and A.V. Pshezhetsky. 2006. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Am J Hum Genet.* 79:807-819.
- Huber, R.J., and S. Mathavarajah. 2018. Cln5 is secreted and functions as a glycoside hydrolase in Dictyostelium. *Cell Signal.* 42:236-248.
- Huizing, M., and W.A. Gahl. 2020. Inherited disorders of lysosomal membrane transporters. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 183336.
- Hunziker, W., and H.J. Geuze. 1996. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays.* 18:379-389.
- Huttlin, E.L., R.J. Bruckner, J. Navarrete-Perea, J.R. Cannon, K. Baltier, F. Gebreab, M.P. Gygi, A. Thornock, G. Zarraga, S. Tam, J. Szpyt, A. Panov, H. Parzen, S. Fu, A. Golbazi, E. Maenpaa, K. Stricker, S.G. Thakurta, R. Rad, J. Pan, D.P. Nusinow, J.A. Paulo, D.K. Schweppe, L.P. Vaites, J.W. Harper, and S.P. Gygi. 2020. Dual Proteome-scale Networks Reveal Cell-specific Remodeling of the Human Interactome. *bioRxiv:2020.2001.2019.905109.*
- Huttlin, E.L., R.J. Bruckner, J.A. Paulo, J.R. Cannon, L. Ting, K. Baltier, G. Colby, F. Gebreab, M.P. Gygi, H. Parzen, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, L. Pontano-Vaites, S. Swarup, A.E. White, D.K. Schweppe, R. Rad, B.K. Erickson, R.A. Obar, K.G. Guruharsha, K. Li, S. Artavanis-Tsakonas, S.P. Gygi, and J.W. Harper. 2017. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature.* 545:505-509.
- Huttlin, E.L., L. Ting, R.J. Bruckner, F. Gebreab, M.P. Gygi, J. Szpyt, S. Tam, G. Zarraga, G. Colby, K. Baltier, R. Dong, V. Guarani, L.P. Vaites, A. Ordureau, R. Rad, B.K. Erickson, M. Wühr, J.

- Chick, B. Zhai, D. Kolippakkam, J. Mintseris, R.A. Obar, T. Harris, S. Artavanis-Tsakonas, M.E. Sowa, P. De Camilli, J.A. Paulo, J.W. Harper, und S.P. Gygi. 2015. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell*. 162:425-440.
- Huynh, K.K., E.L. Eskelinen, C.C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig, und S. Grinstein. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J*. 26:313-324.
- Jankowiak, W., L. Brandenstein, S. Dulz, C. Hagel, S. Storch, und U. Bartsch. 2016. Retinal Degeneration in Mice Deficient in the Lysosomal Membrane Protein CLN7. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 57:4989-4998.
- Järvelä, I., M. Lehtovirta, R. Tikkanen, A. Kyttala, und A. Jalanko. 1999. Defective intracellular transport of CLN3 is the molecular basis of Batten disease (JNCL). *Hum Mol Genet*. 8:1091-1098.
- Johnson, T.B., J.T. Cain, K.A. White, D. Ramirez-Montealegre, D.A. Pearce, und J.M. Weimer. 2019. Therapeutic landscape for Batten disease: current treatments and future prospects. *Nat Rev Neurol*. 15:161-178.
- Jules, F., E. Sauvageau, K. Dumaresq-Doiron, J. Mazzaferri, M. Haug-Kröper, R. Fluhrer, S. Costantino, und S. Lefrancois. 2017. CLN5 is cleaved by members of the SPP/SPPL family to produce a mature soluble protein. *Exp Cell Res*. 357:40-50.
- Kasper, D., R. Planells-Cases, J.C. Fuhrmann, O. Scheel, O. Zeitz, K. Ruether, A. Schmitt, M. Poet, R. Steinfeld, M. Schweizer, U. Kornak, und T.J. Jentsch. 2005. Loss of the chloride channel ClC-7 leads to lysosomal storage disease and neurodegeneration. *EMBO J*. 24:1079-1091.
- Kim, J., C. Hu, C. Moufawad El Achkar, L.E. Black, J. Douville, A. Larson, M.K. Pendergast, S.F. Goldkind, E.A. Lee, A. Kuniholm, A. Soucy, J. Vaze, N.R. Belur, K. Fredriksen, I. Stojkowska, A. Tsytsykova, M. Armant, R.L. DiDonato, J. Choi, L. Cornelissen, L.M. Pereira, E.F. Augustine, C.A. Genetti, K. Dies, B. Barton, L. Williams, B.D. Goodlett, B.L. Riley, A. Pasternak, E.R. Berry, K.A. Pflöck, S. Chu, C. Reed, K. Tyndall, P.B. Agrawal, A.H. Beggs, P.E. Grant, D.K. Urion, R.O. Snyder, S.E. Waisbren, A. Poduri, P.J. Park, A. Patterson, A. Biffi, J.R. Mazzulli, O. Bodamer, C.B. Berde, und T.W. Yu. 2019. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *N Engl J Med*. 381:1644-1652.
- Kohlschütter, A., und H. Goebel. 1997. Die Neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen: Neurodegenerative Krankheiten des Kindesalters auf dem Weg zur Aufklärung. *Dtsch Arztebl International*. 94.
- Kohlschütter, A., A. Schulz, U. Bartsch, und S. Storch. 2019. Current and Emerging Treatment Strategies for Neuronal Ceroid Lipofuscinoses. *CNS Drugs*. 33:315-325.
- Kollmann, K., K. Uusi-Rauva, E. Scifo, J. Tyynelä, A. Jalanko, und T. Bräulke. 2013. Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins. *Bba-Mol Basis Dis*. 1832:1866-1881.
- Kopra, O., J. Vesa, C. von Schantz, T. Manninen, H. Minye, A.L. Fabritius, J. Rapola, O.P. van Diggelen, J. Saarela, A. Jalanko, und L. Peltonen. 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.

- Kornak, U., D. Kasper, M.R. Bosl, E. Kaiser, M. Schweizer, A. Schulz, W. Friedrich, G. Delling, and T.J. Jentsch. 2001. Loss of the CLC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*. 104:205-215.
- Kornfeld, S., and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*. 5:483-525.
- Kousi, M., A.E. Lehesjoki, and S.E. Mole. 2012. Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Hum Mutat*. 33:42-63.
- Kousi, M., E. Siintola, L. Dvorakova, H. Vlaskova, J. Turnbull, M. Topcu, D. Yuksel, S. Gokben, B.A. Minassian, M. Elleder, S.E. Mole, and A.E. Lehesjoki. 2009. Mutations in CLN7/MFSD8 are a common cause of variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain*. 132:810-819.
- Kozina, A.A., E.G. Okuneva, N.V. Baryshnikova, A.Y. Krasnenko, K.Y. Tsukanov, O.I. Klimchuk, O.B. Kondakova, A.N. Larionova, T.T. Batysheva, E.I. Surkova, P.A. Shatalov, and V.V. Ilinsky. 2018. A novel MFSD8 mutation in a Russian patient with neuronal ceroid lipofuscinosis type 7: a case report. *BMC Med Genet*. 19:151.
- Lefrancois, S., J. Zeng, A.J. Hassan, M. Canuel, and C.R. Morales. 2003. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo j*. 22:6430-6437.
- Lemere, C.A., J.S. Munger, G.P. Shi, L. Natkin, C. Haass, H.A. Chapman, and D.J. Selkoe. 1995. The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. *Am J Pathol*. 146:848-860.
- Lerner, T.J. 1995. Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium. *Cell*. 82:949-957.
- Li, Q., and B.A. Barres. 2018. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 18:225-242.
- Lim, C.Y., and R. Zoncu. 2016. The lysosome as a command-and-control center for cellular metabolism. *J Cell Biol*. 214:653-664.
- Liu, J., S. Halene, M. Yang, J. Iqbal, R. Yang, W.Z. Mehal, W.L. Chuang, D. Jain, T. Yuen, L. Sun, M. Zaidi, and P.K. Mistry. 2012. Gaucher disease gene GBA functions in immune regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:10018-10023.
- Liuzzo, J.P., S.S. Petanceska, D. Moscatelli, and L.A. Devi. 1999. Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol Med*. 5:320-333.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-408.
- Löffler, G. 1998. Biochemie und Pathobiochemie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Lübke, T., P. Lobel, and D.E. Sleat. 2009. Proteomics of the lysosome. *Biochim Biophys Acta*. 1793:625-635.

- Lyly, A., C. von Schantz, C. Heine, M.L. Schmiedt, T. Sipila, A. Jalanko, und A. Kyttala. 2009. Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biol.* 10:83.
- Mamo, A., F. Jules, K. Dumaresq-Doiron, S. Costantino, und S. Lefrancois. 2012. The role of ceroid lipofuscinosis neuronal protein 5 (CLN5) in endosomal sorting. *Mol Cell Biol.* 32:1855-1866.
- Mandel, H., K. Cohen Katsanelson, M. Khayat, I. Chervinsky, E. Vladovski, T.C. Iancu, M. Indelman, Y. Horovitz, E. Sprecher, S.A. Shalev, und R. Spiegel. 2014. Clinico-pathological manifestations of variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (vLINCL) caused by a novel mutation in MFSD8 gene. *Eur J Med Genet.* 57:607-612.
- Markham, A. 2017. Cerliponase Alfa: First Global Approval. *Drugs.* 77:1247-1249.
- Markmann, S., M. Thelen, K. Cornils, M. Schweizer, N. Brocke-Ahmadinejad, T. Willnow, J. Heeren, V. Gieselmann, T. Braulke, und K. Kollmann. 2015. Lrp1/LDL Receptor Play Critical Roles in Mannose 6-Phosphate-Independent Lysosomal Enzyme Targeting. *Traffic.* 16:743-759.
- Marques, A.R.A., und P. Saftig. 2019. Lysosomal storage disorders - challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases. *J Cell Sci.* 132.
- Matsui, H., F. Sato, S. Sato, M. Koike, Y. Taruno, S. Saiki, M. Funayama, H. Ito, Y. Taniguchi, N. Uemura, A. Toyoda, Y. Sakaki, S. Takeda, Y. Uchiyama, N. Hattori, und R. Takahashi. 2013. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett.* 587:1316-1325.
- McBride, J.L., M. Neuringer, B. Ferguson, S.G. Kohama, I.J. Tagge, R.C. Zweig, L.M. Renner, T.J. McGill, J. Stoddard, S. Peterson, W. Su, L.S. Sherman, J.S. Domire, R.M. Ducore, L.M. Colgin, und A.D. Lewis. 2018. Discovery of a CLN7 model of Batten disease in non-human primates. *Neurobiol Dis.* 119:65-78.
- McCauliff, L.A., A. Langan, R. Li, O. Ilnytska, D. Bose, M. Waghalter, K. Lai, P.C. Kahn, und J. Storch. 2019. Intracellular cholesterol trafficking is dependent upon NPC2 interaction with lysobisphosphatidic acid. *Elife.* 8.
- Mehta, A.B., und B. Winchester. 2013. Lysosomal storage disorders : a practical guide. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex.
- Mellman, I. 1992. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *The Journal of Experimental Biology.* 172:39-45.
- Meng, Y., S. Heybrock, D. Neculai, und P. Saftig. 2020. Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond. *Trends Cell Biol.* 30:452-466.
- Mole, S.E., G. Anderson, H.A. Band, S.F. Berkovic, J.D. Cooper, S.M. Kleine Holthaus, T.R. McKay, D.L. Medina, A.A. Rahim, A. Schulz, und A.J. Smith. 2019. Clinical challenges and future therapeutic approaches for neuronal ceroid lipofuscinosis. *Lancet Neurol.* 18:107-116.
- Mole, S.E., und S.L. Cotman. 2015. Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochim Biophys Acta.* 1852:2237-2241.

- Mole, S.E., R.E. Williams, und H.H. Goebel. 2011. The neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). Oxford University Press, Oxford.
- Morgan, A.J., F.M. Platt, E. Lloyd-Evans, und A. Galione. 2011. Molecular mechanisms of endolysosomal Ca²⁺ signalling in health and disease. *Biochem J.* 439:349-374.
- Morin, P., C. Sagné, und B. Gasnier. 2004. Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *Embo j.* 23:4560-4570.
- Mukherjee, A.B., A.P. Appu, T. Sadhukhan, S. Casey, A. Mondal, Z. Zhang, und M.B. Bagh. 2019. Emerging new roles of the lysosome and neuronal ceroid lipofuscinoses. *Mol Neurodegener.* 14:4.
- Ni, X., und C.R. Morales. 2006. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic.* 7:889-902.
- Nishi, T., und M. Forgac. 2002. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:94-103.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J.E. Riggs, S.J. Oh, Y. Koga, C.M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro, und M. Hirano. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature.* 406:906-910.
- Noskova, L., V. Stranecky, H. Hartmannova, A. Pristoupilova, V. Baresova, R. Ivanek, H. Hulkova, H. Jahnova, J. van der Zee, J.F. Staropoli, K.B. Sims, J. Tyynelä, C. Van Broeckhoven, P.C. Nijssen, S.E. Mole, M. Elleder, und S. Kmoch. 2011. Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet.* 89:241-252.
- Odaka, C., T. Mizuochi, J. Yang, und A. Ding. 2003. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *J Immunol.* 171:1507-1514.
- Palmer, D.N. 2015. The relevance of the storage of subunit c of ATP synthase in different forms and models of Batten disease (NCLs). *Biochim Biophys Acta.* 1852:2287-2291.
- Palmer, D.N., I.M. Fearnley, J.E. Walker, N.A. Hall, B.D. Lake, L.S. Wolfe, M. Haltia, R.D. Martinus, und R.D. Jolly. 1992. Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Med Genet.* 42:561-567.
- Pao, S.S., I.T. Paulsen, und M.H. Saier, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1-34.
- Patino, L.C., R. Battu, O. Ortega-Recalde, J. Nallathambi, V.R. Anandula, U. Renukaradhya, und P. Laissue. 2014. Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS One.* 9:e109576.
- Perland, E., S. Bagchi, A. Klaesson, und R. Fredriksson. 2017. Characteristics of 29 novel atypical solute carriers of major facilitator superfamily type: evolutionary conservation, predicted structure and neuronal co-expression. *Open Biol.* 7.

- Pislar, A., und J. Kos. 2014. Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol.* 49:1017-1030.
- Prinz, W.A., A. Toulmay, und T. Balla. 2020. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 21:7-24.
- Quistgaard, E.M., C. Low, F. Guettou, und P. Nordlund. 2016. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17:123-132.
- Radke, J., W. Stenzel, und H.H. Goebel. 2015. Human NCL Neuropathology. *Biochim Biophys Acta.* 1852:2262-2266.
- Rahman, P., D.D. Gladman, J. Wither, und M.D. Silver. 1998. Coexistence of Fabry's disease and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 16:475-478.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, und P. Saftig. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* 131:770-783.
- Reddy, V.S., M.A. Shlykov, R. Castillo, E.I. Sun, und M.H. Saier, Jr. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *Febs j.* 279:2022-2035.
- Rehm, H. 2016. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Springer Spektrum, Berlin.
- Ren, X.T., X.H. Wang, C.H. Ding, X. Shen, H. Zhang, W.H. Zhang, J.W. Li, C.H. Ren, und F. Fang. 2019. Next-Generation Sequencing Analysis Reveals Novel Pathogenic Variants in Four Chinese Siblings With Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Front Genet.* 10:370.
- Riese, R.J., P.R. Wolf, D. Bromme, L.R. Natkin, J.A. Villadangos, H.L. Ploegh, und H.A. Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity.* 4:357-366.
- Roosing, S., L.I. van den Born, R. Sangermano, S. Banfi, R.K. Koenekoop, M.N. Zonneveld-Vrieling, C.C. Klaver, J.J. van Lith-Verhoeven, F.P. Cremers, A.I. den Hollander, und C.B. Hoyng. 2015. Mutations in MFSD8, encoding a lysosomal membrane protein, are associated with nonsyndromic autosomal recessive macular dystrophy. *Ophthalmology.* 122:170-179.
- Ruivo, R., C. Anne, C. Sagne, und B. Gasnier. 2009. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* 1793:636-649.
- Rutsch, F., S. Gailus, I.R. Miousse, T. Suormala, C. Sagne, M.R. Toliat, G. Nürnberg, T. Wittkamp, I. Buers, A. Sharifi, M. Stucki, C. Becker, M. Baumgartner, H. Robenek, T. Marquardt, W. Höhne, B. Gasnier, D.S. Rosenblatt, B. Fowler, und P. Nürnberg. 2009. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet.* 41:234-239.
- Santavuori, P., S.L. Vanhanen, und T. Autti. 2001. Clinical and neuroradiological diagnostic aspects of neuronal ceroid lipofuscinoses disorders. *Eur J Paediatr Neurol.* 5 Suppl A:157-161.

- Sardiello, M., M. Palmieri, A. di Ronza, D.L. Medina, M. Valenza, V.A. Gennarino, C. Di Malta, F. Donaudy, V. Embrione, R.S. Polishchuk, S. Banfi, G. Parenti, E. Cattaneo, und A. Ballabio. 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 325:473-477.
- Saxena, S., C. Bucci, J. Weis, und A. Kruttgen. 2005. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci*. 25:10930-10940.
- Schmidtke, C., S. Tiede, M. Thelen, R. Käkälä, S. Jabs, G. Makrypidi, M. Sylvester, M. Schweizer, I. Braren, N. Brocke-Ahmadinejad, S.L. Cotman, A. Schulz, V. Gieselmann, und T. Bräulke. 2019. Lysosomal proteome analysis reveals that CLN3-defective cells have multiple enzyme deficiencies associated with changes in intracellular trafficking. *J Biol Chem*. 294:9592-9604.
- Schmiedt, M.L., T. Blom, T. Blom, O. Kopra, A. Wong, C. von Schantz-Fant, E. Ikonen, M. Kuronen, M. Jauhiainen, J.D. Cooper, und A. Jalanko. 2012. Cln5-deficiency in mice leads to microglial activation, defective myelination and changes in lipid metabolism. *Neurobiol Dis*. 46:19-29.
- Schneede, A., C.K. Schmidt, M. Holttä-Vuori, J. Heeren, M. Willenborg, J. Blanz, M. Domansky, B. Breiden, S. Brodesser, J. Landgrebe, K. Sandhoff, E. Ikonen, P. Saftig, und E.L. Eskelinen. 2011. Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport. *J Cell Mol Med*. 15:280-295.
- Schneppenheim, J., R. Dressel, S. Hüttl, R. Lüllmann-Rauch, M. Engelke, K. Dittmann, J. Wienands, E.L. Eskelinen, I. Hermans-Borgmeyer, R. Fluhrer, P. Saftig, und B. Schröder. 2013. The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J Exp Med*. 210:41-58.
- Schröder, B. 2016. The multifaceted roles of the invariant chain CD74--More than just a chaperone. *Biochim Biophys Acta*. 1863:1269-1281.
- Schröder, B.A., C. Wrocklage, A. Hasilik, und P. Saftig. 2010. The proteome of lysosomes. *Proteomics*. 10:4053-4076.
- Schultz, M.L., L. Tecedor, M. Chang, und B.L. Davidson. 2011. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci*. 34:401-410.
- Schulz, A., T. Ajayi, N. Specchio, E. de Los Reyes, P. Gissen, D. Ballon, J.P. Dyke, H. Cahan, P. Slasor, D. Jacoby, A. Kohlschütter, und C.L.N.S. Group. 2018. Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease. *N Engl J Med*. 378:1898-1907.
- Schulz, A., A. Kohlschütter, J. Mink, A. Simonati, und R. Williams. 2013. NCL diseases - clinical perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 1832:1801-1806.
- Schwake, M., B. Schröder, und P. Saftig. 2013. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic*. 14:739-748.
- Seehafer, S.S., D. Ramirez-Montealegre, A.M. Wong, C.H. Chan, J. Castaneda, M. Horak, S.M. Ahmadi, M.J. Lim, J.D. Cooper, und D.A. Pearce. 2011. Immunosuppression alters disease severity in juvenile Batten disease mice. *J Neuroimmunol*. 230:169-172.
- Seo, Y., H.-S. Kim, I. Kang, S.W. Choi, T.-H. Shin, J.-H. Shin, B.-C. Lee, J.Y. Lee, J.-J. Kim, M.G. Kook, und K.-S. Kang. 2016. Cathepsin S contributes to microglia-mediated olfactory

- dysfunction through the regulation of Cx3cl1–Cx3cr1 axis in a Niemann–Pick disease type C1 model. *Glia*. 64:2291-2305.
- Settembre, C., A. Fraldi, D.L. Medina, and A. Ballabio. 2013. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:283-296.
- Sharifi, A., M. Kousi, C. Sagne, G.C. Bellenchi, L. Morel, M. Darmon, H. Hulkova, R. Ruivo, C. Debacker, S. El Mestikawy, M. Elleder, A.E. Lehesjoki, A. Jalanko, B. Gasnier, and A. Kytöala. 2010. Expression and lysosomal targeting of CLN7, a major facilitator superfamily transporter associated with variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet*. 19:4497-4514.
- Siintola, E., M. Topcu, N. Aula, H. Lohi, B.A. Minassian, A.D. Paterson, X.Q. Liu, C. Wilson, U. Lahtinen, A.K. Anttonen, and A.E. Lehesjoki. 2007. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *Am J Hum Genet*. 81:136-146.
- Singh, Y., H. Leinonen, F. Fazaludeen, M. Jaronen, D. Guest, N. Buckley, N. Byts, P. Oksa, K. Jalkanen, I. Iqbal, M. Huuskonen, E. Savchenko, V. Keksa-Goldsteine, S. Chew, J. Myllyharju, H. Tanila, L. Ooi, J. Koistinaho, K.M. Kanninen, and T. Malm. 2019. Loss of Cln5 leads to altered Gad1 expression and deficits in interneuron development in mice. *Hum Mol Genet*.
- Speak, A.O., D. Te Vruchte, L.C. Davis, A.J. Morgan, D.A. Smith, N.M. Yanjanin, L. Simmons, R. Hartung, H. Runz, E. Mengel, M. Beck, J. Imrie, E. Jacklin, J.E. Wraith, C. Hendriksz, R. Lachmann, C. Cognet, R. Sidhu, H. Fujiwara, D.S. Ory, A. Galione, F.D. Porter, E. Vivier, and F.M. Platt. 2014. Altered distribution and function of natural killer cells in murine and human Niemann–Pick disease type C1. *Blood*. 123:51-60.
- Steenhuis, P., J. Froemming, T. Reinheckel, and S. Storch. 2012. Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7. *Biochim Biophys Acta*. 1822:1617-1628.
- Steenhuis, P., S. Herder, S. Gelis, T. Bräulke, and S. Storch. 2010. Lysosomal targeting of the CLN7 membrane glycoprotein and transport via the plasma membrane require a dileucine motif. *Traffic*. 11:987-1000.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:513-525.
- Stevenson, R.E., M. Lubinsky, H.A. Taylor, D.A. Wenger, R.J. Schroer, and P.M. Olmstead. 1983. Sialic acid storage disease with sialuria: clinical and biochemical features in the severe infantile type. *Pediatrics*. 72:441-449.
- Stogmann, E., S. El Tawil, J. Wagenstaller, A. Gaber, S. Edris, A. Abdelhady, E. Assem-Hilger, F. Leutmezer, S. Bonelli, C. Baumgartner, F. Zimprich, T.M. Strom, and A. Zimprich. 2009. A novel mutation in the MFSD8 gene in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurogenetics*. 10:73-77.
- Stoka, V., V. Turk, and B. Turk. 2016. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*. 32:22-37.
- Stroupe, C. 2018. This Is the End: Regulation of Rab7 Nucleotide Binding in Endolysosomal Trafficking and Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 6:129.

- Sun, M., E. Goldin, S. Stahl, J.L. Falardeau, J.C. Kennedy, J.S. Acierno, Jr., C. Bove, C.R. Kaneski, J. Nagle, M.C. Bromley, M. Colman, R. Schiffmann, and S.A. Slaugenhaupt. 2000. Mucopolysaccharidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet.* 9:2471-2478.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E.L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P.M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, and P. Saftig. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 406:902-906.
- Thelen, M., D. Winter, T. Bräulke, and V. Gieselmann. 2017. SILAC-Based Comparative Proteomic Analysis of Lysosomes from Mammalian Cells Using LC-MS/MS. *Methods Mol Biol.* 1594:1-18.
- Tiede, S., S. Storch, T. Lubke, B. Henrissat, R. Bargal, A. Raas-Rothschild, and T. Bräulke. 2005. Mucopolysaccharidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nat Med.* 11:1109-1112.
- Town, M., G. Jean, S. Cherqui, M. Attard, L. Forestier, S.A. Whitmore, D.F. Callen, O. Gribouval, M. Broyer, G.P. Bates, W. van't Hoff, and C. Antignac. 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet.* 18:319-324.
- Tylki-Szymanska, A. 2014. Mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Pediatr Endocrinol Rev.* 12 Suppl 1:107-113.
- Unanue, E.R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol.* 2:395-428.
- Uusi-Rauva, K., A. Kytälä, R. van der Kant, J. Vesa, K. Tanhuanpää, J. Neefjes, V.M. Olkkonen, and A. Jalanko. 2012. Neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN3 interacts with motor proteins and modifies location of late endosomal compartments. *Cell Mol Life Sci.* 69:2075-2089.
- Verheijen, F.W., E. Verbeek, N. Aula, C.E. Beerens, A.C. Havelaar, M. Joosse, L. Peltonen, P. Aula, H. Galjaard, P.J. van der Spek, and G.M. Mancini. 1999. A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet.* 23:462-465.
- Vesa, J., M.H. Chin, K. Oelgeschläger, J. Isosomppi, E.C. DellAngelica, A. Jalanko, and L. Peltonen. 2002. Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol Biol Cell.* 13:2410-2420.
- Vidak, E., U. Javorek, M. Vizovisek, and B. Turk. 2019. Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells.* 8.
- Vitner, E.B., H. Dekel, H. Zigdon, T. Shachar, T. Farfel-Becker, R. Eilam, S. Karlsson, and A.H. Futerman. 2010. Altered expression and distribution of cathepsins in neuronopathic forms of Gaucher disease and in other sphingolipidoses. *Hum Mol Genet.* 19:3583-3590.
- von Bernhardi, R., L. Eugenin-von Bernhardi, and J. Eugenin. 2015. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 7:124.
- von Kleist, L., K. Ariunbat, I. Braren, T. Stauber, S. Storch, and T. Danyukova. 2019. A newly generated neuronal cell model of CLN7 disease reveals aberrant lysosome motility and impaired cell survival. *Mol Genet Metab.* 126:196-205.

- Vuillemenot, B.R., D. Kennedy, J.D. Cooper, A.M. Wong, S. Sri, T. Doeleman, M.L. Katz, J.R. Coates, G.C. Johnson, R.P. Reed, E.L. Adams, M.T. Butt, D.G. Musson, J. Henshaw, S. Keve, R. Cahayag, L.S. Tsuruda, and C.A. O'Neill. 2015. Nonclinical evaluation of CNS-administered TPP1 enzyme replacement in canine CLN2 neuronal ceroid lipofuscinosis. *Mol Genet Metab.* 114:281-293.
- Wendt, W., H. Lubbert, and C.C. Stichel. 2008. Upregulation of cathepsin S in the aging and pathological nervous system of mice. *Brain Res.* 1232:7-20.
- Wilke, S., J. Krausze, and K. Bussow. 2012. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycocalyx. *BMC Biol.* 10:62.
- Wilkinson, R.D., R. Williams, C.J. Scott, and R.E. Burden. 2015. Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biol Chem.* 396:867-882.
- Williams, R.E., and S.E. Mole. 2012. New nomenclature and classification scheme for the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurology.* 79:183-191.
- Wong, Y.C., D. Ysselstein, and D. Krainc. 2018. Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis. *Nature.* 554:382-386.
- Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 496:445-455.
- Xu, H., and D. Ren. 2015. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol.* 77:57-80.
- Yamayoshi, S., Y. Yamashita, J. Li, N. Hanagata, T. Minowa, T. Takemura, and S. Koike. 2009. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 15:798-801.
- Yasa, S., G. Modica, E. Sauvageau, A. Kaleem, G. Hermey, and S. Lefrancois. 2020. CLN3 regulates endosomal function by modulating Rab7A-effector interactions. *J Cell Sci.* 133.
- Zare-Abdollahi, D., A. Bushehri, A. Alavi, A. Dehghani, M. Mousavi-Mirkala, J. Effati, S.A.M. Miratashi, M. Dehani, P. Jamali, and H.R. Khorram Khorshid. 2019. MFSD8 gene mutations; evidence for phenotypic heterogeneity. *Ophthalmic Genet.* 40:141-145.
- Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:107-117.
- Zhao, H. 2012. Membrane trafficking in osteoblasts and osteoclasts: new avenues for understanding and treating skeletal diseases. *Traffic.* 13:1307-1314.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung ausgewählter lysosomaler Membranproteine.....	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung des CLN7 Proteins.....	22
Abbildung 3: Lokalisation der identifizierten CLN7-Patientenmutationen im CLN7-Protein.....	25
Abbildung 4: SILAC-basierte, vergleichende quantitative Analyse des löslichen lysosomalen Proteoms in WT und <i>Cln7 ko</i> MEF.....	56
Abbildung 5: Depletion löslicher lysosomaler Proteine in immortalisierten <i>Cln7 ko</i> MEF.....	57
Abbildung 6: Quantitative <i>real-time</i> PCR Analyse der mRNA-Expression dysregulierter Proteine in <i>Cln7 ko</i> MEF.....	59
Abbildung 7: Depletion der D und G-Untereinheiten der V1-Domäne des V-Typ- H ⁺ -ATPase-Komplexes in <i>Cln7 ko</i> Lysosomen.....	60
Abbildung 8: Depletion von Cln5 in humanen haploiden <i>CLN7 ko</i> HAP1-Zellen, in murinen <i>Cln7 ko</i> Makrophagen und in murinem <i>Cln7 ko</i> Hirngewebe.....	61
Abbildung 9: Unveränderter intrazellulärer Transport von Cln5 in <i>Cln7 ko</i> MEF.....	63
Abbildung 10: Depletion von Cln5 durch Cysteinprotease-vermittelten Abbau in <i>Cln7 ko</i> Lysosomen.....	64
Abbildung 11: Charakterisierung kultivierter primärer <i>Cln7 ko</i> Makrophagen.....	65
Abbildung 12: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von CD74 durch Cathepsin S.....	66
Abbildung 13: Erhöhte Cathepsin S-Expression und Analyse der mRNA-Konzentrationen von Cathepsin S Substraten in <i>Cln7 ko</i> Makrophagen.....	67
Abbildung 14: Verminderte Cathepsin D Proteinexpression in primären <i>Cln7 ko</i> Makrophagen.....	69
Abbildung 15: Akkumulation von SCMAS in primären <i>Cln7 ko</i> Makrophagen.....	70
Abbildung 16: Immunpräzipitation von GFP-CLN7 und Identifizierung potenzieller Interaktionspartner.....	72
Abbildung 17: Screening nach einem geeigneten Kontrollprotein für GFP-CLN7-Kopräzipitationsanalysen.....	73
Abbildung 18: GFP-CLN7 und GFP-Sialin Expressionsanalyse und subzelluläre Verteilung identifizierter CLN7-Interaktionspartner.....	75
Abbildung 19: Interaktion von Rab7 mit CLN7.....	76
Abbildung 20: Lokalisation von Cysteinresten im CLN7-Protein für potenzielle intra- und intermolekulare Ausbildung von Disulfidbrücken.....	77
Abbildung 21: Analyse der Dimerisierung von CLN7 durch Disulfidbrücken.....	79
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Lokalisation und Funktion bekannter Cathepsin S-Substrate.....	88

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durch LMP-Defekte verursachte LSDs (modifiziert nach (Schwake et al. 2013)).....	17
Tabelle 2: Übersicht über die NCL-Erkrankungen (modifiziert nach Mukherjee et al. 2019).....	19
Tabelle 3: Lösliche lysosomale Proteine.....	99
Tabelle 4: Lysosomale Membranproteine.....	101

12 Anhang

12.1 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12.2 Publikationen und Kongressbeitrag

Publikationen

Danyukova T, Ariunbat K, Thelen M, Brocke-Ahmadinejad N, Mole SE, Storch S (2018) Loss of CLN7 results in depletion of soluble lysosomal proteins and impaired mTOR reactivation. Hum Mol Genet. 27(10): 1711-1722.

Kleist L, Ariunbat K, Braren I, Stauber T, Storch S, Danyukova T (2019) A newly generated neuronal cell model of CLN7 disease reveals aberrant lysosome motility and impaired cell survival. Mol Genet Metab. Feb; 126(2):196-205.

Kongressbeitrag (Posterpräsentation)

Ariunbat K, Thelen M, Brandenstein L, Gieselmann V, Storch S. SILAC-based comparative proteomics reveals dysregulation of soluble lysosomal proteins in a cell-based model for CLN7 disease.

- 10/2016 15th International Congress on Neuronal Ceroid Lipofuscinoses, Boston

13 Danksagung

PD Dr. Stephan Storch danke ich für die Bereitstellung eines spannenden Projektes, für die Betreuung und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Dem Graduiertenkolleg 1459 und Prof. Thomas Braulke danke ich für die finanzielle Unterstützung und exzellente wissenschaftliche Ausbildung über Symposien, Seminare sowie Austausch mit inspirierenden Wissenschaftlern und anderen Doktoranden und den damit verbundenen Möglichkeiten der geistigen und persönlichen Weiterbildung. Dr. Dorthé Labonté bin ich darüber hinaus für die Organisation des GRKs dankbar.

PD Dr. Sandra Pohl danke ich neben der Begutachtung dieser Arbeit für ihr offenes Ohr und die zahlreichen Anregungen.

Dr. Laura Brandenstein danke ich für die Einführung in die Thematik und die experimentelle Arbeit im Labor. Dr. Renata Voltiglini Velho danke ich für die Einweisung in die *real-time*-PCR, Dr. Melanie Thelen für die Analyse der proteomischen Daten.

Dr. Carolin Schmidtke, Johannes Brand und Dr. Tatyana Danyukova bin ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung in jeglicher Fragestellung im Labor zutiefst dankbar, die sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Virgilio Failla danke ich für die Einführung in das Mikroskopieren.

Ludwig van Beethoven danke ich seiner inspirierenden Musik.

Mein besonderer Dank gilt Alessia, Julia, Johannes, Carolin, Tatyana, Virgilio und Sneha für die harmonische Zeit im Labor und gleichermaßen für die wunderbare Zeit außerhalb des Labors.

Nina und Sebastian danke ich herzlichst für die hilfreiche Durchsicht dieser Arbeit.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für Ihr Vertrauen in mich, insbesondere meiner Großmutter für ihre grenzenlose Liebe.

14 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den

.....
Khandsuren Ariunbat