

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie

Leiter Prof. Dr. med. Heimo Ehmke

Analyse des Einflusses von UCH-L1 auf den Proteinumsatz in Neuronen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Michael Walden
aus Lübeck

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.04.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:
Prof. Dr. Aymelt Itzen**

**Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin:
Prof. Dr. Cathrine Meyer-Schwesinger**

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	I
2. Einleitung	1
2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	1
2.2 Die Bedeutung von UCH-L1 für das UPS und neurodegenerative Erkrankungen	2
2.3 mTOR	5
2.4 UCH-L1 und mTOR	10
3. Material und Methoden	12
3.1 Antikörper	12
3.2 Gängige Puffer und Lösungen	12
3.3 UCH-L1-KO-Mäuse	13
3.4 Tierexperimente	16
3.5 Neuronenkultur	17
3.6 Western Blot	17
3.6.1 Protokoll für Gewebe	18
3.6.2 Protokoll für Zellen	18
3.7 qRT-PCR (auch qPCR)	20
3.8 Auswertung der Daten	22
4. Ergebnisse	22
4.1 UCH-L1-KO-Mäuse und <i>nm3419</i> -Mäuse zeigen Unterschiede im mTORC-Signaling	22
4.2 UCH-L1-KO-Mäuse zeigen eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Transkription mTORC1-abhängiger Gene	27
4.3 Die Proteinsynthese in UCH-L1-defizienten Hirnen ist erhöht	30
4.4 <i>Uch-11^{d/d}</i> -Mäusen zeigen eine geringere Aktivität von ULK	31
4.5 <i>Uch-11^{d/d}</i> -Mäuse zeigen ein verändertes Ubiquitin-Verhalten	32
4.6 Rapamycin senkt die mTORC1-Aktivität und hebt die Unterschiede zwischen Genotypen auf	34
4.7 UCH-L1-defiziente-Neuron weisen eine höhere Phosphorylierung von mTOR auf	37
5. Diskussion	38
5.1 UCH-L1-KO, <i>gad</i> und <i>nm3419</i> sind im Wesentlichen vergleichbar	38
5.2 <i>Uch-11^{d/d}</i> -Tiere weisen im Wesentlichen kein verändertes mono- Ubiquitin-Level auf	43
5.3 UCH-L1 beeinflusst mTORC1-abhängige Gene in 3 Wochen alten UCH-L1-KO-Mäusen	43
5.4 Postnatale <i>Uch-11^{d/d}</i> -Mäuse weisen eine gesteigerte Proteinbiosynthese auf	45
5.5 UCH-L1-Defizienz führt zu einer zunehmenden Überlastung des UPS 47	
5.6 Der mTORC1-Inhibitor Rapamycin verbessert den neurodegenerativen Phänotyp.	48
6. Zusammenfassung	50
7. Abkürzungsverzeichnis	53
8. Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen	54

9. Literaturverzeichnis.....	55
10. Danksagung.....	63
11. Lebenslauf	64
12. Eidesstattliche Versicherung.....	65

2. Einleitung

2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein, welches in allen Zellen des Körpers vorkommt. Durch die Ubiquitinierung von Proteinen kann sowohl deren Funktion, Lokalisation als auch deren Abbau gesteuert werden (1). Der Abbau von Proteinen kann sehr gezielt gesteuert werden. So kann eine poly-Ubiquitin-Kette von mindestens 4 aneinander geketteten Ubiquitin-Einheiten, welche an ein Lysin eines Zielproteins gebunden sind oder eine Multiubiquitinierung vieler Lysine eines Zielproteins dazu führen, dass es dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Hierzu wird Ubiquitin zunächst durch ein E1-Ubiquitin-aktivierendes Enzym in einer ATP-verbrauchenden Reaktion aktiviert und anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 übertragen. Abschließend wird mithilfe der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase das (Poly-) Ubiquitin auf das abzubauen Protein übertragen. Das so markierte Protein wird entweder direkt an die regulatorische 19S Untereinheit des 26S Proteasom gebunden oder es wird durch E3 Ligasen als Adapterprotein dem Proteasom zugeführt. Dem entgegen stehen deubiquitinierende Enzyme (DUBs), welche diese Ketten verkürzen oder abtrennen und so den Abbau verhindern. Dieses komplexe System wird Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) genannt (2). Eine Ubiquitinierung eines Proteins kann jedoch auch dazu führen, dass es dem lysosomalen Abbau zugeführt wird. Es werden Ubiquitinierungen an Lysin 48 (K48), welche dem proteasomalen Abbau zugeführt werden, von denen an Lysin 63 (K63) unterschieden, welche dem lysosomalen Abbau durchlaufen(3). Hier spielt der endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) eine wichtige Rolle, indem er ein entsprechend markiertes Protein innerhalb eines Endosoms einem Lysosom zuführt (4). Neben dieser Bedeutung für abbauende Prozesse wird aber auch immer deutlicher, dass eine Markierung mit Ubiquitin oder mit einem „Ubiquitin-ähnlichen Protein“ auch Teil von Signaltransduktionskaskaden sein kann, die in ihrer Komplexität dem der Phosphorylierungen nahekommt (5).

2.2 Die Bedeutung von UCH-L1 für das UPS und neurodegenerative Erkrankungen

Im menschlichen Genom wurden über 90 deubiquitinierenden Enzyme (DUBs) identifiziert. Eine Unterklasse dieser Proteine sind die „Ubiquitin C-terminalen Hydrolasen“ (UCH). Diese Gruppe zeichnet sich durch eine N-terminal gelegene C12 Peptidase sowie durch eine C-terminale Erweiterung aus, die den Zugang eines Substrats zum katalytischen Zentrum kontrolliert. Zu dieser Untergruppe gehört neben UCH-L1 noch UCH-L3, UCH-L5 und BAP1 (6).

Larsen et al. (1998) vermuteten noch, dass UCH-L1 nicht dazu dient, um Ubiquitin von einem Protein abzuspalten und so dessen Abbau zu verhindern bzw. Funktionalität zu ändern. Stattdessen ging man davon aus, dass UCH-L1 freie Ubiquitin-Monomere aus Vorstufen abspaltet und so einen stabilen zellulären Gehalt an Monoubiquitin sicherstellt (7). *In vitro* Experimente legen allerdings nahe, dass Enzyme der UCH-Familie sowohl N- als auch C-terminal Ubiquitin von Proteinen abtrennen können (8). Weiterhin können kleine Nucleophile wie Glutathion oder Polyamine deubiquitiniert werden (9). Neue Experimente konnten zeigen, dass ein Auftrennen von Ubiquitin Dimeren jedoch nicht möglich ist (10). Widersprüchlich erscheint daher zunächst, dass der Verlust von UCH-L1 in Mäusen zu einer Reduktion des Monoubiquitin-Gehaltes und bei Überexpression zu einer Erhöhung der Menge an Monoubiquitin führt. Hierzu wurden eine spontane Knockout-Maus (*gad*) sowie eine transgene, UCH-L1 überexprimierende Maus genutzt und (unter anderem) deren Hirngewebe aufgearbeitet (11). Weitere Versuche in neuronalen Zellkulturen ergaben, dass nicht die katalytische Domäne von UCH-L1, sondern die Ubiquitin-bindende Domäne für den höheren Gehalt an Mono-Ubiquitin verantwortlich ist. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass UCH-L1 lediglich durch das Binden von Mono-Ubiquitin dessen Halbwertszeit verlängert, selbst aber keine neuen Monomere bereitstellt (12).

Neben der *in vitro* nachgewiesenen DUB-Aktivität scheint UCH-L1 auch eine Ligase-Aktivität zu haben, um Lys63 Polyubiquitinketten auf α -Synuclein zu verlängern und so dessen proteasomalen Abbau zu verhindern (13). Dies ist insofern interessant, als dass UCH-L1 somit zwei enzymatische Funktionen hätte und zudem die Akkumulation von α -Synuclein eine große Rolle bei Morbus Parkinson und der Lewy-Körperchen-Demenz spielt (14). Letztere

Ligaseaktivität konnte allerdings bisher nicht experimentell reproduziert werden (15).

Trotz der umfangreichen *in vitro* Experimente konnte bisher kein Substrat von UCH-L1 *in vivo* nachgewiesen werden (6). Die Funktion von UCH-L1 bleibt somit weitestgehend unklar.

Anders als das Isoenzym UCH-L3 ist UCH-L1 nicht in allen Zellen des Körpers zu finden. So macht es bis zu 5% des gesamtlöslichen Proteins im Hirn aus und findet sich, wenn auch in deutlich geringerem Maße, physiologisch nur noch in neuroendokrinen Zellen (16). Pathophysiologisch ist UCH-L1 auch in menschlichen Fibroblasten während der Wundheilung sowie in unterschiedlichen Tumorgeweben wie z.B. im Kolorektalem-Karzinom, Oesophagus-Karzinom, Pankreas-Karzinom, Schilddrüsen-Tumoren oder dem Brustkrebs nachweisbar (17, 18). Außerdem kommt es bei speziellen Erkrankungen der Niere, bei denen es zu Schäden am Glomerulum mit Einbeziehung der Podozyten kommt, zu einer Expression von UCH-L1 in erkrankten Podozyten, obwohl UCH-L1 sonst nicht in Podozyten zu finden ist (19).

UCH-L1 ist für die richtige Entwicklung und Funktion des Nervensystems entscheidend. In Mäusen führen UCH-L1 Mutationen mit Verlust der Funktion zur spinalen „gracile axonal dystrophy“ (*gad*). Hierbei handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die sich zunächst durch eine sensorische Ataxie mit später aufsteigender, an den Hinterläufen beginnender Lähmung auszeichnet und zu einem verfrühten Tod führt. Dabei bilden sich „spheroid bodies“ an den Nervenendigungen, welche aus Amyloid und ubiquitinierten Ablagerungen bestehen (20). Neben der „*gad*-Maus“ existiert noch ein weiteres spontanes UCH-L1 Knockout-Modell, die *nm3419*-Maus (21). Für diese konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von UCH-L1 zu einem erhöhten ER-Stress in kortiko-spinalen Motoneuronen führt, welcher von einer Degeneration der Zellen begleitet wird. Auch dies führt zu einem der *gad*-Maus ähnlichem Phänotyp (22). Vor Kurzem veröffentlichten Hussain et al. die *TgC90A*-Maus, welche ein katalytisch inaktives UCH-L1 ubiquitär überexprimiert. Die Arbeitsgruppe verglich isolierte B-Lymphozyten aus dieser Maus mit B-Lymphozyten aus einer Maus welche ein normales UCH-L1 überexprimiert.

Beide Mäusen wurden mit einem Wildtypen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass eine Überexpression von katalytisch aktivem UCH-L1 zu einer erhöhten Aktivität von mTORC2 (gemessen an p-Akt (S473)) bei gleichzeitiger Unterdrückung von mTORC2 (gemessen an p-4E-BP1 und p-S6) führt. B-Lymphozyten mit Überexpression von katalytisch inaktivem UCH-L1 zeigten hingegen keine Veränderung der mTORC1- oder mTORC2-Aktivität (23).

Auch beim Menschen sind Mutationen des UCH-L1-Gens bekannt. So konnte in drei Geschwisterkindern eine E7A Punktmutation von UCH-L1 beschrieben werden. Dadurch kam es bei den Kindern im Alter von fünf Jahren zur Erblindung und im Alter von 30 Jahren zum Verlust der Gehfähigkeit (15).

Über diese Beobachtungen hinaus wird UCH-L1 mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. So wurde es bereits recht früh in intrazellulären Ablagerungen entdeckt, welche „Lewy bodies“ genannt werden und neben UCH-L1 auch α -Synuclein, Ubiquitin und Neurofilamente enthalten. Diese Lewy bodies sind beispielsweise pathognomonisch für die Lewy-Körperchen-Demenz, werden aber auch bei anderen Erkrankungen gefunden (24). Außerdem konnte beobachtet werden, dass UCH-L1 bei Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer oxidativ modifiziert wird. Dies führte zu einer verringerten Löslichkeit mit Ausfällen ungelösten UCH-L1 und Funktionsverlust des Enzymes. Diese Ergebnisse brachten Choi et al. 2004 zu dem Schluss, dass der durch oxidativen Stress verursachte Schaden am Ubiquitin-System die Ursache von nicht genetisch bedingtem M. Alzheimer bzw. M. Parkinson sein könnte (25).

Andere Forscher wiederum halten diese oxidative Modifizierung nicht für pathologisch und postulieren, dass UCH-L1 in der Zelle und insbesondere in Neuronen physiologisch die Funktion eines Antioxidans haben könnte. So konnte gezeigt werden, dass *gad*-Mäuse eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber Lipid-Peroxidation, also der oxidativen Degradation von Lipiden, haben. Dies wurde durch eine Vitamin-E-arme Ernährung, also durch Wegfall eines wichtigen Antioxidans noch verstärkt (26).

Zur Erklärung des Zusammenhangs von UCH-L1 und neurodegenerativen Erkrankungen wird also bisher hauptsächlich die Beeinflussung des UPS sowie

die eben beschriebene antioxidative Funktion herangezogen. Ein genauer Mechanismus wurde noch nicht gefunden.

Hussain et al. entdeckten 2010 in HeLa-Zellen, welche vorher mit UCH-L1-tragenden Lentiviren infiziert wurden, dass dies zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und zu einer verringerten Phosphorylierung von Akt an Serin 473 führt. Akt, auch bekannt als Proteinkinase B, ist ein wichtiger Mitspieler in der mTOR-Signalkaskade. Dabei ist eine Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 als erhöhte mTORC1-Aktivität zu deuten, während eine Phosphorylierung an Serin 473 für eine gesteigerte mTORC2-Aktivität spricht. Die Autoren schlussfolgerten, dass UCH-L1 einen Einfluss auf diese Signalkaskade haben muss (27). Eine weitere Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe konnte dann zeigen, dass vor allem der mTOR-1 Komplex beeinflusst wird (28). *Hussain et al.* haben damit eine völlig neue Rolle von UCH-L1 entdeckt, die in dieser Arbeit weiter beleuchtet werden soll. Zunächst ist jedoch notwendig, dass mTOR-System grundlegend zu erläutern.

2.3 mTOR

Das mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) hat einen irreführenden Namen, da die wichtigste Funktion von mTOR eben nicht die ist, Rapamycin zu binden. Der Grund für die Namensgebung ist der, dass Rapamycin weit vor mTOR entdeckt wurde und aufgrund seiner vielfältigen Wirkungsweise näher untersucht wurde. So zeigt Rapamycin eine potente immunsuppressive und antiproliferative Wirkung und weckte so das Interesse vieler Forscher an der Wirkungsweise. Bereits früh entdeckte man, dass Rapamycin an FKBP12 bindet und dadurch eine hemmende Wirkung auf die Serin/Threonin-Kinase S6K (S6-Kinase) ausübt (29, 30). Erst später wurde das eigentliche Ziel des Rapamycin/FKBP12-Komplexes isoliert und nachdem es bereits in der Hefe bekannt war mammalian Target of Rapamycin genannt (31). Heute ist die serin/threonin Proteinkinase mTOR als zentrale Untereinheit des mTOR-Komplexes bekannt. Es werden zwei unterschiedliche Konformationen dieses Komplexes differenziert: mTORC1 und mTORC2, die sich in ihrer Zusammensetzung und Funktion unterscheiden. mTORC1 wird neben dem zentralen mTOR aus Raptor (regulatory protein associated with mTOR) und

mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8) gebildet. Während Raptor dafür zuständig ist, die Substrate des Komplexes zu erkennen und dem katalytischen Zentrum zuzuführen, dient mLST8 dazu, die katalytische Domäne zu stabilisieren (32-34). Zusätzlich zu diesen drei Untereinheiten enthält mTORC1 noch die zwei inhibitorischen Einheiten PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) und DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein) (35, 36). mTORC2 besteht prinzipiell aus den gleichen drei Kerneinheiten wie mTORC1 mit dem Unterschied, dass Raptor hier durch das Rapamycin nicht-sensitive Rictor (rapamycin insensitive companion of mTOR) ersetzt ist. Die Funktion von Rictor entspricht darüber hinaus vermutlich der von Raptor (37). Obwohl mTORC2 den Rapamycin-FKBP12-

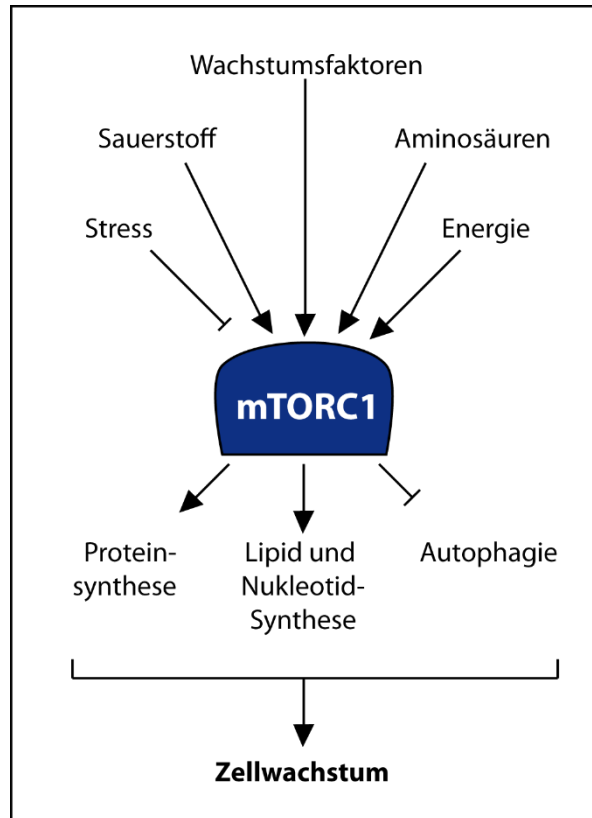


Abbildung 1: Funktion von mTORC1 (Schema)

Komplex nicht bindet und infolgedessen nicht von ihm inhibiert wird, führt eine lange Therapie mit Rapamycin auch zu einer Unterdrückung von mTORC2. Vermutlich liegt dies daran, dass auf lange Sicht viel mTOR in mTORC1 gebunden (und dort inhibiert wird) und so nicht mehr zur Bildung eines neuen mTORC2-Komplexes zur Verfügung steht (38).

Die Funktion beider Komplexe ist unterschiedlich: mTORC1 ist vor allem an der Regulation von Zellwachstum und Zellstoffwechsel beteiligt, während mTORC2 ein Förderer der Zellteilung ist und die Apoptose verhindern kann (39). Das wohl wichtigste Substrat von mTORC2 ist die Proteinkinase B, welche auch Akt genannt wird. Über die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung an Serin 473 werden zahlreiche Stoffwechselwege aktiviert die zu Zellteilung, Wachstum und Zellüberleben führen (40). Wie genau das Aktivitätsverhältnis beider Komplexe gesteuert wird, ist bisher nicht vollständig geklärt. Abbildung 1 zeigt schematisch die Funktion von mTORC1 (nach (39)). Der Komplex erkennt

zahlreiche für das Zellwachstum wichtige Parameter. Dazu gehören auf der einen Seite die Verfügbarkeit von Sauerstoff, Aminosäuren, Energie und entsprechenden Wachstumsfaktoren und auf der anderen Seite das Fehlen von Stress (wie ATP-Mangel, DNA-Schäden oder Sauerstoffmangel). Ist diese Situation gegeben, reagiert die Zelle mit der Neusynthese von Proteinen, Lipiden und Nukleotiden sowie mit der Drosselung der Autophagozytose (41). Zusammenfassend kontrolliert mTORC1 also das Gleichgewicht von katabolen und anabolen Zellprozessen.

Abbildung 2 (abgewandelt nach (39)) zeigt die mTORC1-abhängige Signalkaskade, wobei die Signalwege für die drei wichtigen Teilbereich mRNA-Translation, Metabolismus und Proteinverwertung dargestellt sind.

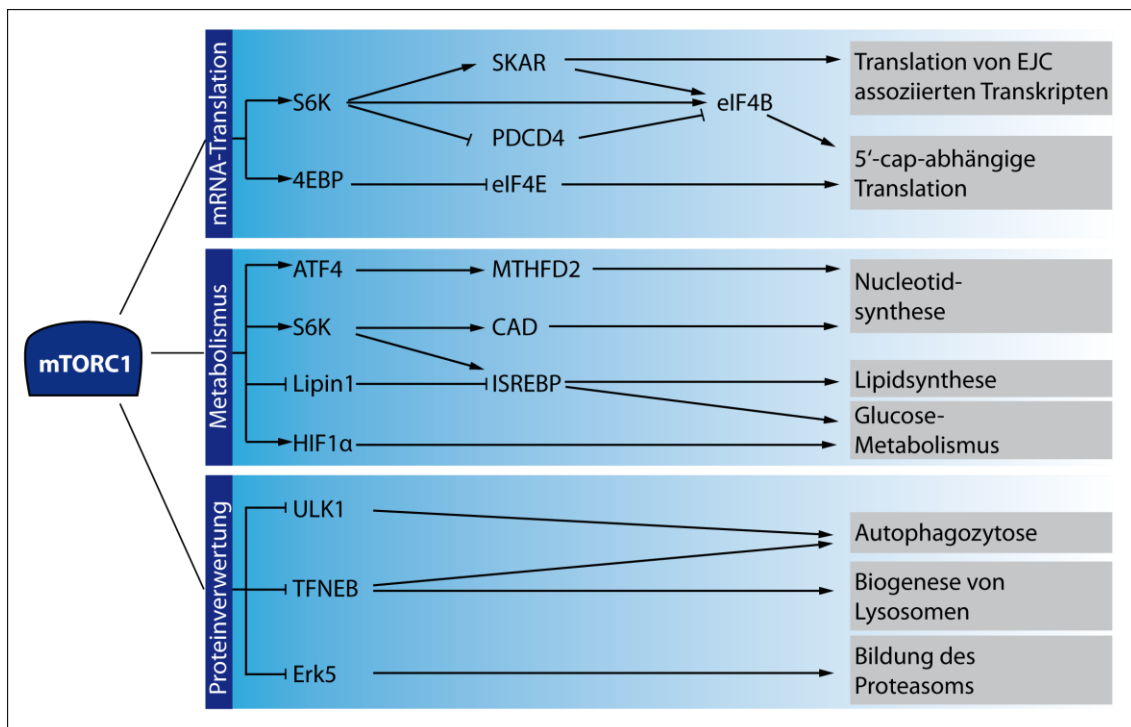


Abbildung 2: Signalkaskade von mTORC1

Proteinsynthese: mTORC1 steuert die Proteinsynthese maßgeblich über zwei Effektorproteine. Diese sind die p70-S6-Kinase (S6K) und das 4E-bindende-Protein (4E-BP). Gut erforscht ist der Einfluss auf die Bildung des Translations-Prä-Initiations-Komplexes (PIC): Im Normalzustand, also ohne eine vermehrte mTORC1-Aktivität, sind eIF4E, 4E-BP1, eIF3 und S6K zu einem Komplex zusammengelagert. eIF4E dient in diesem Komplex dazu die 5'-cap-Struktur einer mRNA zu binden. Unter anderem durch die Bindung von eIF4E durch das 4E-BP ist dieser Komplex jedoch inaktiviert. Sind jedoch ausreichend

Wachstumsfaktoren und Nährstoffe vorhanden, so wird unter Einbeziehung von mTORC1 ein Aktivierungskomplex gebildet. In diesem phosphoryliert mTOR/Raptor in einem ersten Schritt S6K an Threonin 389 (T389), welche sich dadurch vom Komplex löst. Diese Phosphorylierung erlaubt nun die Bindung von PDK1 an S6K, wodurch S6K noch an einer zweiten Stelle (T229) phosphoryliert wird. Dies kann durch mTOR weiter gefördert werden, indem S6K zusätzlich an Serin 371 (S371) phosphoryliert wird (42). Die voll aktivierte S6K kann nun unter anderem S6 und den eIF-4B aktivieren. Gleichzeitig phosphoryliert mTOR/Raptor das inhibitorische Bindeprotein 4E-BP, wodurch es sich vom eIF4E löst und so erst den Zusammenschluss des Translations-Prä-Initiations-Komplexes ermöglicht (43). Die voll aktivierte S6K kann zusätzlich den Abbau von PDCD4 erhöhen, einem Inhibitor von eIF4B. Hierdurch kann die Translation zusätzlich gesteigert werden (44). Abschließend hat mTORC1 auch einen Einfluss auf die Effektivität der Translation gespleißter mRNA. Hierzu wird mTOR durch SKAR (S6K1 Aly/REF-like substrate) einem Exon-Junction-Complex (EJC) zugeführt, wodurch die Effektivität der Translation gespleißter mRNA erhöht wird (45). Dieser Mechanismus ist jedoch bisher nicht vollständig verstanden.

Metabolismus: mTORC1 hat im Rahmen seiner Funktion als zentrales Steuerorgan der Zelle auch die Aufgabe, die Voraussetzungen für Zellwachstum zu schaffen. Das bedeutet, dass neben Nährstoffen und Wachstumsfaktoren auch ausreichend Lipide, Nukleotide und Intermediärmetabolite wie NADPH vorhanden sein müssen. mTORC1 reagiert auf eine niedrige Konzentration von Sterolen mit deren Neusynthese indem es das sterol responsive element binding protein (SREBP) aktiviert. Dies geschieht über zwei Wege: Nicht phosphoryliertes Lipin1 ist im Zellkern lokalisiert und kann dort die Aktivität von SREBP inhibieren. mTORC1 kann über eine Phosphorylierung die Translokation aus dem Zellplasma in den Kern verhindern (46). Düvel et al. (2009) haben gezeigt, dass mTORC1 SREBP auch über S6K positiv beeinflusst, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist. Die Gruppe konnte außerdem die bereits bestehende Vermutung bestätigen, dass mTORC1 (über die Inhibition von 4E-BP) die Aktivität des Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 α) steigert und so den Glucose-Metabolismus fördert. Der

Energiestoffwechsel wird zusätzlich durch SREBP gesteigert, indem es die Aktivität des Pentose-Phosphatstoffwechsels erhöht und so mehr Intermediärmetabolite wie NADPH zur Verfügung stehen (47). Abschließend fördert mTORC1 auch die Biosynthese von Nukleotiden: Zum einen kann mTORC1 über S6K den Pyrimidin-Stoffwechsel steigern in dem es die Carbamoyl-Phosphat Synthetase (CAD) phosphoryliert und dadurch aktiviert (48). Zum anderen führt mTORC1 zur Akkumulation des activating transcription factor 4 (ATF4), welcher die Expression des Enzyms Methylenetetrahydrofolat Dehydrogenase 2 (MTHFD2) steigert. MTHFD2 ist ein wichtiges Enzym im mitochondrialen Tetrahydrofolat-Kreislauf, wodurch letztlich die Produktion von Purin-Nukleotiden gesteigert wird (49).

Proteinverwertung: mTORC1 hat neben der Steuerung von anabolen Prozessen auch die Aufgabe, katabole Stoffwechselprozesse zu inhibieren. Es sind zwei wichtige Stoffwechselwege bekannt: Die Inhibition der Autophagozytose sowie des proteasomalen Abbaus. Unter Nährstoffmangel beginnen Zellen einen Prozess bei dem mittels Lysosomen beschädigte Proteine aber auch ganze Organellen durch Hydrolyse abgebaut werden. Hierzu wird das abzubauen Protein oder Organell zunächst von einem Autophagosom umschlossen. In einem zweiten Schritt fusioniert dieses Autophagosom mit einem Lysosom, welches verschiedene Hydrolasen enthält. Dieser Autophagozytose genannte Prozess dient dazu, die Zelle in Hungerperioden mit essentiellen Nährstoffen (Aminosäuren) zu versorgen (50). Der genaue Stoffwechselweg funktioniert dabei wie folgt: In der Zelle drückt sich ein Energiemangel durch eine hohe Konzentration von Adenosinmonophosphat (AMP) bei geringer Menge von Adenosintriphosphat (ATP) aus. Die AMP activated protein kinase (AMPK) erkennt diesen Energiemangel und phosphoryliert die UNC-51-like kinase 1 (ULK1) an Serin 317 und 777. Hierdurch wird ULK1 aktiviert und ermöglicht die Bildung von Autophagosomen. Ist hingegen ausreichend Energie vorhanden, phosphoryliert mTORC1 ULK1 an Serin 757 und stört so die Interaktion von AMPK und ULK1. Hierdurch wird die Autophagozytose inhibiert (51). Zusätzlich beeinflusst mTORC1 die Autophagozytose durch den Transkriptionsfaktor EB (TFEB).

Dieser fördert die Bildung von Lysosomen. mTORC1 verhindert die Translokation von TFEB in den Zellkern (52).

Als zweiten wichtigen katabolen Stoffwechselweg beeinflusst mTORC1 auch das UPS (siehe Kapitel 3.1 und 3.2). Eine Inhibition von mTORC1 (unter anderem mittels Rapamycin) führt zu einer sehr schnellen Steigerung der Proteolyse. Dies kann sowohl über eine generelle Steigerung der Ubiquitinierung abzubauenender Proteine geschehen (53), als auch über eine gesteigerte zytoplasmatische Konzentration von Proteasomen (54). Zunächst widersprüchlich erscheint, dass auch eine genetische Überaktivierung von mTORC1 zu einer Aktivierung des UPS führt. Dieser Fund könnte dadurch erklärt werden, dass die Zelle auf die unnatürlich gesteigerten anabolen Prozesse auf lange Sicht reagieren muss. Die gesteigerte Aktivität des UPS könnte also eine Anpassung der katabolen an die anabolen Prozesse sein (55).

2.4 UCH-L1 und mTOR

Erste Hinweise auf den Einfluss von UCH-L1 auf die mTOR-Signalkaskade wurden bereits 2010 von Hussain et. al. beschrieben. Sie fanden in transgenen Mäusen, welche UCH-L1 übermäßig exprimieren eine verstärkte Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von Akt an Serin 473 (27). In einer weiteren Arbeit zeigte dieselbe Gruppe, dass UCH-L1 das Gleichgewicht von mTORC1 zu mTORC2 beeinflusst. So führte eine Überexpression von UCH-L1 zu einer verringerten mTORC1-Aktivität bei gesteigerter mTORC2-Aktivität sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Ein Knockout von UCH-L1 führte zum umgekehrten Ergebnis *in vivo*. Hussain et al. gehen außerdem davon aus, dass der dahinterstehende Mechanismus eine destabilisierende Wirkung von UCH-L1 auf mTORC1 ist (28). Die Grundlage dafür ist eine Arbeit, die zeigte, dass für die mTORC1-Signalkaskade sowohl die korrekte Funktion des Proteasoms wichtig ist, als auch das Mitwirken der Ubiquitin-E3-Ligase CUL4-DDB1. Gosh et al. zeigen, dass CUL4-DDB1 mit Raptor einen Komplex bilden, welcher erst die normale Funktion von mTORC1 ermöglicht. Ein Fehlen von CUL4A (Cullin-4A) oder DDB1 (DNA damage-binding protein 1) blockt die Phosphorylierung von S6 an Threonin 389 und 4E-BP1 an Serin 65 sowie Threonin 37 und 46. Das Fehlen von CUL4B allein führt hingegen zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT an Serin 473 (56). Die Phosphorylierung an dieser

Stelle spricht für eine vermehrte Aktivierung von mTORC2 (40). Eine erst kürzlich erschienene Arbeit von Hussain et al. zeigt darüber hinaus, dass UCH-L1 sogar die Proteinbiosynthese unter Umgehung von mTOR in B-Zell-Lymphomen steigern kann. Hierzu fördert UCH-L1 die Bildung des Initiationskomplexes eIF4F (23).

Als wichtige Limitation ist jedoch wieder zu nennen, dass ein Großteil der Experimente in Zellkulturen erfolgt ist. *In vivo* haben Hussain et al. bisher folgendes zeigen können: Eine Überexpression von UCH-L1 führt in Milzgewebe von Mäusen zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt an Serin 473 und verringerter Phosphorylierung an Threonin 389. Ein Knockout von UCH-L1 führt hingegen zu einer verringerten Phosphorylierung von Akt an Serin 473 in Hirnen von *nm3419*-Mäusen, sodass Hussain et al. von einem proportionalen Zusammenhang von UCH-L1-Expression und mTORC2-Aktivität ausgehen. Als Marker für mTORC1-Aktivität wurde (im selben Versuchsaufbau) die Phosphorylierung von S6K und 4E-BP-1 gemessen. Dies werteten die Autoren entsprechend als antiproportionalen Zusammenhang von UCH-L1-Expression und mTORC1-Aktivität (27, 28).

Diese Arbeit analysiert den Einfluss von UCH-L1 auf den Proteinumsatz in Neuronen in einem neuen, erst kürzlich veröffentlichten Mausmodell, der UCH-L1-KO-Maus (57). Diese Mäuse wurden mithilfe eines Cre/loxP-Systems erzeugt, bei dem es zu einer Entfernung der Promotorregion bis zum Exon 3 kommt und so kein Transkript oder Protein mehr exprimiert wird (Für Details siehe Methoden). Die UCH-L1-KO-Maus unterscheidet sich von den bestehenden, indem bei der *gad*-Maus (in frame Deletion Exon 7/8) und der *nm3419* (Deletion Exon6/Intron6) noch trunkierte UCH-L1-Transkripte nachweisbar sind (20, 21).

Ziel dieser Arbeit war es, die Experimente von Hussain et al (2013) in unserem Mausmodell zu reproduzieren um anschließend weiter zu untersuchen, welchen Einfluss UCH-L1 auf den mTOR-Signaltransduktionsweg hat und inwieweit der Ubiquitin-Stoffwechsel beeinflusst wird.

3. Material und Methoden

3.1 Antikörper

Die folgenden Tabellen geben die für diese Arbeit verwendeten Antikörper wieder. Sie werden bei den jeweiligen Methoden daher nicht mehr im Detail beschrieben

Primärantikörper	Hersteller-ID	Verdünnung	Lösung in	Ursprungstier
4E-BP1	CS 9452	1:1000	SB	Kaninchen
p-4E-BP1 (T37/46)	CS 2855	1:1000	SB	Kaninchen
beta-Aktin	Sigma-Aldrich A5441	1:15000	SB	Maus
mTOR	CS 2983	1:1000	SB	Kaninchen
p-mTOR (S2448)	CS 5536	1:1000	SB	Kaninchen
S6K	CS 2708	1:1000	SB	Kaninchen
p-S6K (S371)	CS 9208	1:1000	SB	Kaninchen
p-S6K (T389)	CS 9234	1:1000	SB	Kaninchen
S6	CS 2217	1:1000	SB	Kaninchen
p-S6 (S235/236)	CS 2211	1:1000	SB	Kaninchen
Ubiquitin	Millipore MAB 1510	1:250	3% MMP	Maus
UCH-L1 (U104)	Labor Meyer- Schwesinger	1:250	3% MMP	Ratte
ULK1	CS 8054	1:1000	SB	Kaninchen
p-ULK1 (S757)	CS 6888	1:1000	SB	Kaninchen

Tabelle 1: Primärantikörper (SB = Superblock, Thermo Scientific; 3% MMP = 3% Magermilchpulver gelöst in TBST (siehe Tabelle 3 "Gängige Puffer und Ansätze"))

Sek. Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Lösung in	Ursprungstier
anti Kaninchen HRP	Dianova	1:10000	3% MMP	Esel
anti Maus HRP	Dianova	1:40000	3% MMP	Esel
anti Ratte HRP	Dianova	1:10000	3% MMP	Ziege

Tabelle 2: Sekundärantikörper (3% MMP = 3% Magermilchpulver gelöst in TBST)

3.2 Gängige Puffer und Lösungen

Die folgende Tabelle gibt die gängigen und in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Ansätze wieder. Des Weiteren finden sich spezielle Ansätze auch bei den jeweiligen Methoden.

Name	Zusammensetzung			Hersteller
Transferpuffer	192	mM	Glycin	Carl Roth GmbH
	25	mM	Trisamoniummethan (Tris)	Sigma
	10	%	Methanol	J.T.Baker
	90	%	dm H ₂ O	
Ladepuffer Western Blot (4x LDS)	NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)			Invitrogen
Lysepuffer Westernblot Gewebe	0,4	M	DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
	10	µM	NEM (gelöst in Ethanol)	Sigma
Lysepuffer Western Blot Zellen	1	x	PhosSTOP	Roche
	1	x	Complete Mini EDTA-free	Roche
	2	mM	Epoxomycoin	Calbiochem
	1	x	T-PER	Thermo Scientific
MES Puffer 20x	1	x	PhosSTOP	Roche
	1	x	Complete Mini EDTA-free	Roche
	1	x	Cell Lysis Buffer	Cell Signaling Technology
Tris Buffered Saline + Tween (TBST)	50	mM	MES	Serva
	50	mM	Tris Base	Sigma
	0,1	%	Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
	1	mM	EDTA	Sigma
Tris Buffered Saline + Tween (TBST)	10	mM	Tris (pH 7,4)	Sigma
	100	mM	NaCl	Carl Roth GmbH
	0,05	%	Tween-20	Sigma

Tabelle 3: Gängige Puffer und Ansätze

3.3 UCH-L1-KO-Mäuse

Die UCH-L1-defizienten Mäuse wurden mit Hilfe eines Cre/loxP-Systems erzeugt (58). Abbildung 3 zeigt die Erzeugung der Mäuse im Detail. Durch das Gentechnologieunternehmen Genoway wurden Mäusen spezielle Gensequenzen in das Erbgut eingebracht. Diese loxP-Site genannten Sequenzen wurden vor der Promotorregion des UCH-L1-Gens sowie innerhalb von Intron 3 eingebracht. Somit wurden die Exons 1-3 „gefloxed“. (A) Das Enzym „Cre“ schneidet diesen Teil heraus und hinterlässt die herausgeschnittene, zirkuläre DNA sowie den gewünschten DNA-Strang. (B) UCH-L1-defiziente Mäuse wurden nun dadurch erreicht, dass die *Uch-1^{fl/fl}*-Mäuse mit konstitutiv Cre-exprimierenden Tieren gekreuzt wurden. (C) Die so

entstandenen konstitutiven Knock-out-Mäuse wurden über 12 Generation auf einen *C57BL/6*-Hintergrund zurückgekreuzt.

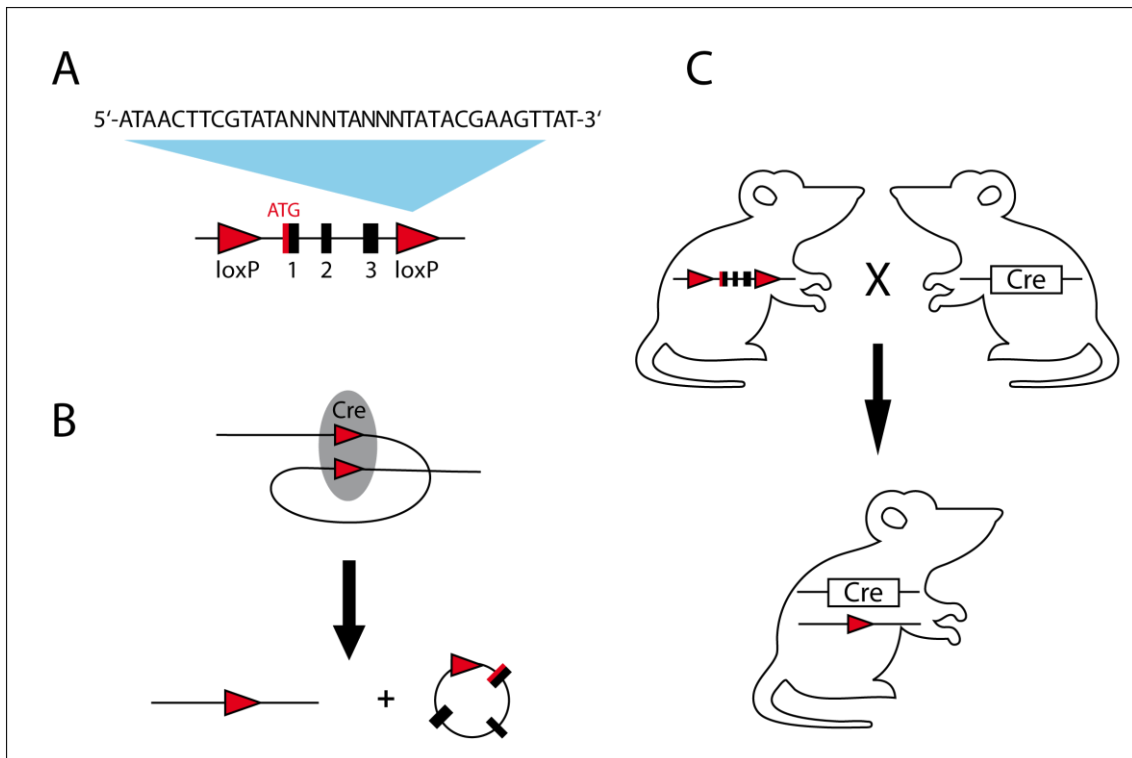


Abbildung 3: Cre/loxP-System und Erzeugung von UCH-L1-KO-Mäusen (abgewandelt nach (58))

Die Würfe heterozygoter Eltern wurden genotypisiert. Hierzu wurde das DirectPCR-Tail Kit (PeqLab) verwendet. Ein Reaktionsansatz von 20 μ L bestand aus:

- 1 μ L Schwanz-DNA
- 10 mM dNTPs
- 0,3 μ L DreamTaq (Thermo Scientific)
- 10X buffer (Thermo Scientific)
- UCH-L1-fw (5' ATG GAC CCT TCC AGC CTC AATT TAC C 3')
- UCH-L1-rev (5' TGC CTC CAA GTT TTA CCA ATG TCA TCC 3').

Der Ansatz wurde in einen Thermocycler (Biometra) gegeben mit folgendem Programm:

- 1x Denaturieren (95°C für 120 Sekunden)
 - o 35 Zyklen:
 - Denaturieren (95°C für 60 Sekunden)
 - Aneinanderlagern (71°C für 60 Sekunden)
 - Verlängerung (72°C für 240 Sekunden)

- Abschluss (72°C für 480 Sekunden)

Die fertige DNA wurde in einem mit Ethidiumbrombid versetzten 1,5% Agarosegel analysiert. Die oben beschriebenen Arbeiten wurden durch Genoway bzw. die technische Assistenz der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Neben den bereits beschriebenen UCH-L1-KO Mäusen wurden auch *gad* und *nm3419*-Tiere verwendet. Die UCH-L1-KO-Maus exprimiert keinerlei UCH-L1 mehr, da durch die oben beschriebene Technik die gesamte Promotorregion des Gens entfernt wurde (57) (siehe Abb 3). Die *nm3419*-Maus ist hingegen eine spontane Mutante, bei der es zu einer 795 Basenpaaren (Bp) langen Deletion in Exon und Intron 6 kommt, welche zur Entfernung der letzten 24 Bp von Exon 6 sowie der 771 ersten Bp von Intron 6 führt. Als Folge dessen werden 99 Bp aus Intron 6 in die fertige mRNA integriert und eine neue Splice-Stelle in Intron 6 dazu genutzt, die mRNA zu Exon 7 zu splicen. Hierdurch gelangt eine Sequenz an das Ende von Exon 6 welches für 13 neue Aminosäuren kodiert bevor ein Stop-Codon erreicht wird und somit die letzten 78 Aminosäuren des UCH-L1-Proteins fehlen (21). Die *gad*-Mutante weist eine Inframe-Deletion von Exon 7 und 8 auf, wodurch ein trunkiertes UCH-L1 exprimiert wird. Diesem fehlt ein 42 Aminosäuren langes Stück inklusive des katalytisch aktiven Histidin¹⁶¹ (20). Abbildung 4 bietet eine Übersicht der verschiedenen Knockout-Strategien.

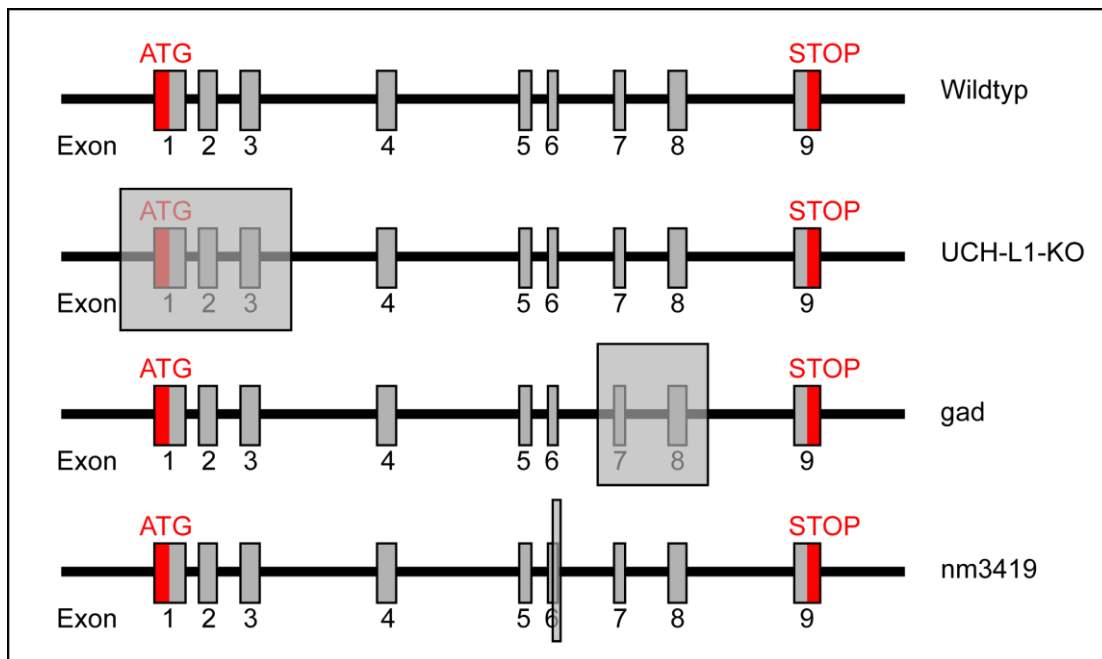


Abbildung 4: Verschiedene UCH-L1-Mutationen im Vergleich (nach (20, 21, 57))

3.4 Tierexperimente

Die beschriebenen Tiere wurden in einer standardisierten Tierhaltung gehalten und erhielten Trinkwasser und Tierfutter nach Bedarf. Die Experimente wurden entsprechend der Europäischen Richtlinie 86/609/EEC durchgeführt. Dem Tierversuchsantrag der Nummer 75/14 an die Stadt Hamburg wurde zugestimmt. Für einige Experimente wurden die Mäuse mit Rapamycin behandelt. Hierzu wurden neugeborene Junge täglich mit Rapamycin (0,1 mg/Kg) an den Tagen 1-8 zwischen 9:00 und 10:00 morgens behandelt. Das Rapamycin (ApexBio Technology LLC, Houston, USA) wurde in Ethanol (10 mg / 200 µl) gelöst, sonifiziert und mit Natriumchloridlösung (0,9%) (NaCl) verdünnt. Den Vergleichstieren (Vehicle) wurde eine entsprechende Ethanol/NaCl-Lösung injiziert. Alle Arbeiten an lebenden Tieren sowie deren Tötung vor der Organentnahme wurden durch entsprechend geschulte Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt. Experimente wurden generell als „Littermate-Experimente“ geplant und durchgeführt. Es wurden also stets Mäuse aus einem Wurf miteinander verglichen, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Einzige Ausnahme bilden die Experimente an *gad*-Mäusen. Hier konnten der Arbeitsgruppe keine Wildtypen aus selbem Wurf zur Verfügung gestellt werden.

3.5 Neuronenkultur

Zur Untersuchung von UCH-L1-defizienten Neuronen *in vitro* wurden embryonale Neuronenkulturen angelegt. Die Isolation der Neuronen wurde von Frau Marlies Sachs und Frau Karoline Laban durchgeführt. Dazu wurden einer tragenden, heterozygoten Maus zum Zeitpunkt E15.5-E16.5 Embryonen entnommen. Die Hirne der Embryonen wurden isoliert, in Dissektionsmedium (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), 5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure (HEPES), 25 µg/ml Gentamycin (Gibco, ThermoFisher Scientific) wurden Kleinhirn, Hirnstamm und Meningen entfernt und der verbleibende Rest weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde anschließend in 2 ml Dissektionsmedium mit Trypsin (1 mg/ml, Sigma-Aldrich), jedoch ohne Kalzium und Magnesium, für 6 Minuten bei 37°C angedaut. Der Prozess wurde gestoppt durch das Entfernen von 2 ml Dissektionsmedium und Hinzufügen von 2 ml 37°C warmen Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml, Sigma-Aldrich), gelöst in Neurobasalmedium (Gibco). Der Trypsin-Inhibitor wurde sofort wieder entfernt und das Gewebe durch vorsichtiges Pipettieren weiter aufgeschlossen. Es wurde anschließend 5 Minuten gewartet, damit die Zellen sich absetzen können. Anschließend wurden die Zellen gesammelt und mit Hilfe von 1:10 Trypanblau (Gibco) gezählt. Jeweils 750.000 Zellen pro Well wurden in eine 6-Well-Platte gegeben und mit Neurobasalmedium versetzt, welches zusätzlich 1x B-27, 1,25 mM L-Glutamin, 5 mM HEPES und 25 µg/ml Gentamycin enthielt (alles von Gibco). Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ in einen Brutschrank gegeben. Das Medium wurde 24 Stunden nach der Isolation gewechselt. Vor der Ernte der Zellen durch Abkratzen auf Eis für den Western Blot, wurden die Zellen für 7 Tage im Brutschrank belassen. Die geernteten Zellen wurden in Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben, vorsichtig zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Proben wurden bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.6 Western Blot

Die Western Blot Methode wurde entwickelt zur qualitativen und semi-quantitativen Analyse von Proteinlysaten auf spezifische Proteine. Hierzu wird

zunächst ein Gewebe aufgelöst, die enthaltenen Proteine werden denaturiert und anschließend in einer Gelmatrix durch Anlegen einer Spannung der Größe nach aufgetrennt. Die so aufgetrennten Proteine aus dem Gel werden anschließend auf eine spezielle Membran übertragen und das gewünschte Zielantigen per Antikörperreaktion angefärbt (59).

Im folgenden Abschnitt werden zur besseren Übersicht alle Schritte, beginnend mit der Lyse von Gewebe bzw. Zellen bis zum fertigen Western Blot, beschrieben. Die Protokolle unterscheiden sich nur hinsichtlich der anfänglichen Lyse.

3.6.1 Protokoll für Gewebe

Den Mäusen wurden direkt nach der Tötung die Hirne entnommen. Auf Eis wurde jedes entlang der Fissura longitudinalis cerebri in gleich große Hälften geteilt. Die Hälften wurden gewogen und in je einem vorgekühlten 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Verarbeitung gelagert.

Die folgenden Schritte fanden auf Eis statt: Für jede Probe wurde ein 2 ml Eppi mit gekühltem Lysepuffer für Gewebe (siehe Tabelle 3) vorbereitet (10 µl/mg Probengewicht abzüglich 300 µl). Anschließend wurden die Proben-Eppis aus dem Stickstoff entnommen, mit 300 µl Lysepuffer versetzt und im Eppi gemörsert. Die Proben wurden für 10 Sekunden bei 40% Power sonifiziert, um enthaltene DNA aufzuspalten. Anschließend wurde die Lyse für 30 Minuten unter ständiger leichter Bewegung bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Zum Abtrennen nicht löslicher Zellbestandteile wurden die Lysate bei 16,1 rpm für 30 Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein vorbereitetes Eppi überführt und sofort denaturiert und auf die Gele übertragen. (Details siehe unten)

3.6.2 Protokoll für Zellen

Die vorbereiteten Proben-Eppis wurden auf Eis mit 75 µl Lysepuffer für Zellen (für alle Puffer siehe Tabelle 3) versetzt. Anschließend wurden auch diese Proben für 10 Sekunden bei 40% Power sonifiziert und für 30 Minuten unter

ständiger leichter Bewegung bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Das Abtrennen nicht löslicher Zellbestandteile erfolgte auch hier bei 16,1 rpm für 30 Minuten in der Kühlzentrifuge. Der Überstand wurde sofort in ein vorbereitetes Eppi überführt und wie folgt weiterverarbeitet (der weitere Verlauf ist für Zellen und Gewebe identisch):

Jedes Lysat wurde mit 4x Ladepuffer für Western Blot versetzt, per Vortex gemischt und bei 72°C im Heizblock für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben in die bereits vorbereiteten bis-tris-Polyacrylamid-Gele (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan, Firma Invitrogen) geladen. Als Standard wurde zusätzlich ein Größenstandard (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa, Thermo Scientific) geladen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Novex Mini Cell (Invitrogen). Tabelle 4 gibt die Spezifikationen der Gele bzw. der Elektrophorese wieder:

Gel#	Konzentration	Puffer	Beladung	E-Phorese	Transfer	Blockung
1-4	4-12%	MES	8 µl	60 mA/Gel 1h	Semi-Dry	3%MMP 1h RT
5-6	16%	Tris/Glycin	16 µl	125 mV 1,5h	Semi-Dry	3%MMP 1h RT
7-8	7%	TG-SDS	6 µl	90 mV 1,5h	Semi-Dry	3%MMP 1h RT

Tabelle 4: Spezifikationen der Gele für Western Blot

Nach Abschluss der Auftrennung der Proteine in der Elektrophorese erfolgte der Übertrag der Proteine auf PVDF-Membranen (Millipore). Dies erfolgte mit dem oben angegebenen Blot-Puffer in einem Semi-Dry-Blotter (Trans-Blot® Turbo™, Bio-Rad). Die Membranen wurden im Anschluss für eine Stunde bei Raumtemperatur in 3% Mager Milch Pulver (MMP) geblockt und abschließend für 4x 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgt entsprechend Tabelle 5. Primärantikörper wurden entsprechend Tabelle 1 angesetzt und über Nacht bei 4°C im Kühlraum auf die Membranen gegeben. Der Antikörper wurde am nächsten Morgen entfernt und die Membran mit frisch angesetztem, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 2) für eine Stunde bei Raumtemperatur versetzt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde 4 Mal mit TBST für 5 Minuten gewaschen. Der Sekundärantikörper wurden nach der Inkubation verworfen. Hiernach wurde abschließend gewaschen. Die

Proteinexpression wurde durch Zugabe von Chemilumineszenz-Substrat (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) visualisiert und durch einen Amersham Imager 600 (GE Healthcare) dokumentiert.

M.	1	2	3	4	5	6	7	8
1. AK	pULK	ULK	pS6K T389	Ubiquitin	p4E-BP	4E-BP	pmTOR	mTOR
	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)	1:10000 in SB (Novus)	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)
sek AK	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP
	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST
2. AK	pp70S6 K S473	p70S6K	U104	Aktin	S6	pS6	Aktin	Aktin
	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)	1:250 in 3%MMP	1:15000 in SB	1:1000 in SB(CS)	1:1000 in SB(CS)	1:15000 in SB	1:15000 in SB
sek AK	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti rat-HRP	anti ms-HRP	anti rb-HRP	anti rb-HRP	anti ms-HRP	anti ms-HRP
	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:15000 in TBST	1:40000 in TBST	1:10000 in TBST	1:10000 in TBST	1:40000 in TBST	1:40000 in TBST
3. AK	Aktin	Aktin	Aktin	Aktin	Aktin	Aktin		
	1:15000 in SB	1:15000 in SB	1:15000 in SB		1:15000 in SB	1:15000 in SB		
sek AK	anti ms-HRP	anti ms-HRP	anti ms-HRP		anti ms-HRP	anti ms-HRP		
	1:40000 in TBST	1:40000 in TBST	1:40000 in TBST		1:40000 in TBST	1:40000 in TBST		

Tabelle 5: Inkubationsplan für Western Blot (M. = Membran)

3.7 qRT-PCR (auch qPCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR auch qPCR) ist eine Variante der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Eine PCR vervielfältigt in einer Reihe von Reaktionszyklen eine vorgegebene Nukleinsäure. Die qPCR zeichnet sich dadurch aus, dass sie anders als andere PCR-Methoden nicht erst nach Ablauf der gesamten Reaktion ausgewertet wird, sondern in Echtzeit. Hierzu werden Fluoreszenzfarbstoffe genutzt, die unspezifisch PCR-Produkte anfärben. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, wodurch eine Quantifizierung möglich wird. Ihre Spezifität erlangt die qPCR dadurch, dass spezifische Primer genutzt werden, um nur bestimmte Sequenzen zu vervielfältigen. Als Ausgangsnukleinsäure wird dabei die messenger-RNA (mRNA) des zu untersuchenden Gewebes genutzt. Auf diese Weise kann man später auf den Expressionsgehalt bestimmter Gene schließen. Für die qPCR muss die mRNA allerdings in DNA „umgeschrieben“ werden. Daher wird eine zunächst eine Reverse Transkriptase-Reaktion durchgeführt um sogenannte copy-DNA (cDNA) zu erhalten (60).

Die Isolation von messenger RNA aus halben Hirnen wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA-Kits (Macherey-Nagel) durchgeführt und folgte dem Protokoll des Herstellers (61). Die RNA Konzentration wurde spektrometrisch in einem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) bestimmt, um später gleiche Mengen miteinander zu vergleichen. Zur Herstellung von cDNA enthielt jeder Ansatz (12,5 µl) 200 ng Probe, 1 µl dNTPs (Invitrogen), 1 µl Random Hexamer Primer (Invitrogen) und eine entsprechende Menge Aqua ad injectabilia (Braun) zum Auffüllen. Nachdem die Proben 5 Minuten bei 65°C inkubiert worden waren, wurden 5,5 µl Mastermix (5x Reverse Transkriptase Puffer (Thermo Scientific), Revert Aid Reverse Transkriptase (Thermo Scientific) und RNase Out (Invitrogen)) hinzugegeben und der fertige Ansatz in den Thermocycler gestellt (10 Minuten 25°C, 60 Minuten 42°C, 15 Minuten 70°C, 4°C bis zur Realtime-Analyse).

Für die die qPCR wurde das StepOnePlus™ Real Time System mit einem SYBR™ Green Mastermix (das gesamte System von Applied Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben genutzt (62). Als interne Kontrolle wurde GapDH verwendet. Die genutzten Primer sind Tabelle 6 zu entnehmen:

Primer	Sequenz
Q-ms-ATP5G1-fw	CAG GAA GGC TGC TTA GAT GG
Q-ms-ATP5G1-rev	CAC TGC TCA TTT CTC CAG CTC
Q-ms-Cox5A-fw	TCC TTA TGA GGT CCT GCT TTG T
Q-ms-Cox5A-rev	GAG CCC AAA ATC ATT GAT GC
Q-ms-CYCS-fw	TGG GCA CAC TTC TGA ACA AA
Q-ms-CYCS-rev	GGA CGT CTG TCT TCG AGT CC
Q-ms-IDH3A-fw	TGG TCC TTG AAT TGC TGT GA
Q-ms-IDH3A-rev	CCC AGA AAT TTC AGC CTC AG
Q-ms-SREBF1-fw	TGG TTG TTG ATG AGC TGG AG
Q-ms-SREBF1-rev	GGC TCT GGA ACA GAC ACT GG
Q-ms-FASN-fw	GTT GGC CCA GAA CTC CTG TA
Q-ms-FASN-rev	GTC GTC TGC CTC CAG AGC
Q-ms-HIF1a-fw	AAA CTT CAG ACT CTT TGC TTC G
Q-ms-HIF1a-rev	CGG CGA GAA CGA GAA GAA
Q-ms-VEGFA-fw	AAT GCT TTC TCC GCT CTG AA
Q-ms-VEGFA-rev	GCT TCC TAC AGC ACA GCA GA
Q-PGP9.5-fw	AGC TGG AAT TTG AGG ATG GA
Q-PGP9.5-rev	GGC CTC GTT CTT CTC GAA A
Q-ms-UCH-L1-Ex3a-fw	TGT CTG GCT TTT TCG GTC TG
Q-ms-UCH-L1-Ex4-rev	CCG ATG GTA CCA CAG GAG TT
Q-ms-GAPDH-fw	GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC T
Q-ms-GAPDH-rev	GCC GGG CCA TCC ACA GTC TT

Tabelle 6: Primer für qPCR

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der StepOne Software (Version 2.3) des Herstellers. Außerdem wurde MS Excel genutzt, um die Daten weiter mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode auszuwerten. Mit dieser Methode ist es möglich relative Veränderungen der Genexpression auf Grundlage von real-time-PCR-Experimenten zu berechnen (63).

3.8 Auswertung der Daten

Die Daten aller Western Blot Experimente wurden zunächst mit ImageJ quantifiziert, indem die Bilder erst invertiert und anschließend die mittlere Signalstärke in einem definierten Bereich um das Signal gemessen wurde (64). In Excel wurde anschließend dieser Wert mit dem jeweiligen Vergleichswert ins Verhältnis gesetzt. Dies war zunächst beta-Aktin als interne Ladekontrolle und im Fall der phosphorylierten Proteine auch deren nicht phosphorylierte Form. Die primäre Analyse der qPCR-Daten erfolgte wie oben beschrieben.

Die weitere Analyse und finale Darstellung der Daten erfolgte in GraphPad Prism 6 (Version 6.01). Alle Werte wurden als Mittelwert +/- den Standard Error of Mean (SEM) angegeben. Zur Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Da nicht zu allen untersuchten Zeitpunkten gleich viele Mäuse zur Verfügung standen und somit einzelne Messwerte fehlten, konnte kein Two-Way-Anova mit wiederholten Messungen genutzt werden. Stattdessen wurde ein Mixed-Effects-Model genutzt. Es wurde davon ausgegangen, dass die einzelnen Messwerte rein zufällig fehlten. Im Anschluss wurde nach Bonferroni die Alphafehler-Kumulierung korrigiert. Effekte wurden als signifikant angesehen ab $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 UCH-L1-KO-Mäuse und *nm3419*-Mäuse zeigen Unterschiede im mTORC-Signaling

Zu Beginn unserer mechanistischen Untersuchungen stand die Reproduktion der durch Hussain et al. publizierten Daten. Die Arbeitsgruppe wies in Hirnen von *nm3419*-Mäusen eine mTORC1-Aktivierung bei gleichzeitiger mTORC2-Unterdrückung nach. Dies leiteten die Autoren von der Phosphorylierung von Akt an Serin 473 bzw. Threonin 308 ab (28). Da das Alter der verwendeten

Mäuse durch Hussain et al. nicht angegeben wurde, verwendeten wir zunächst die Hirne drei Wochen alter Tiere und probten auf p-AKT T308 bzw. S473. Überraschenderweise konnten wir hier in unseren Tieren keinen signifikanten Unterschied feststellen (Abb. 5). Auch durch deutliche Erweiterung der Stichprobe sowie Anpassung des Versuchsprotokolls waren keine signifikanten Unterschiede zu messen. Wir sahen somit gemessen an Akt keine veränderte mTORC1 oder 2-Aktivität in unseren drei Wochen alten Tieren.

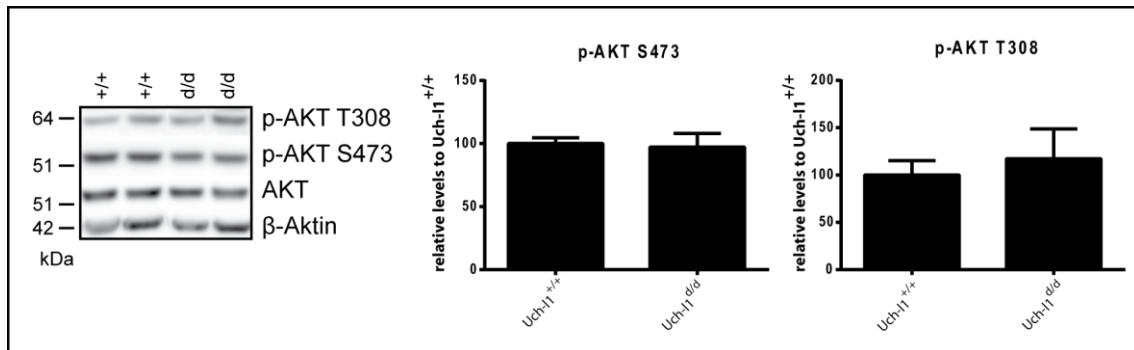


Abbildung 5: 3 Wochen alte Uch-11^{d/d}-Mäuse zeigen keine Unterschiede in Hirngewebe hinsichtlich der Akt-Aktivität gegenüber Wildtyp Geschwistertieren. Halbe Hirne von 3 Wochen alten UCH-L1-KO Tieren wurden wie oben beschrieben entnommen, lysiert und die Lysate auf Gele aufgetragen (pro Genotyp n >11). Im anschließenden Western Blot wurde Akt auf die Phosphorylierung an Serin 473 (S473) bzw. Threonin 308 (T308) sowie auf das Gesamt-Akt hin untersucht. Dargestellt sind Ausschnitte eines repräsentativen Western Blots. Als interne Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die Ergebnisse wurden densitometriert und als Grafik abgebildet.

Wir baten daher Dr. Hussain um das genaue Versuchsprotokoll sowie um Vergleichsproben der *nm3419*-Tiere, welcher dieser uns freundlicherweise zur Verfügung stellte. Proben der *gad*-Maus standen der Arbeitsgruppe (wenn auch ohne „Littermate-Kontrollen“) in geringer Menge zur Verfügung. Alle Tiere waren auf einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt und konnten daher für den direkten Vergleich zu unseren UCH-L1 KO-Mäusen genutzt werden (27). Für die *gad*- sowie die *nm3419*-Maus ist bekannt, dass sie eine trunkierte mRNA exprimiert die jeweils für ein trunkiertes UCH-L1-Protein ohne aktives Histidin¹⁶¹ kodiert. Die UCH-L1-KO-Maus hingegen kann keine mRNA und damit auch kein Protein exprimieren (20, 21, 57). Wir überprüften zunächst mit Hilfe eines Western Blots, ob die vorliegenden Knockout-Tiere tatsächlich kein (intaktes) UCH-L1 exprimierten. Der verwendete UCH-L1-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, welcher sowohl denaturiertes als auch nicht denaturiertes UCH-L1 erkennt. Bei diesem nicht kommerziellen Antikörper ist jedoch nicht vollständig klar, an welchem Peptid er bindet und ob er daher auch ein dieses Peptid enthaltendes Fragment erkennen könnte. Diese Limitation

berücksichtigend konnten wir jedoch nur in Wildtyptieren UCH-L1 nachweisen.

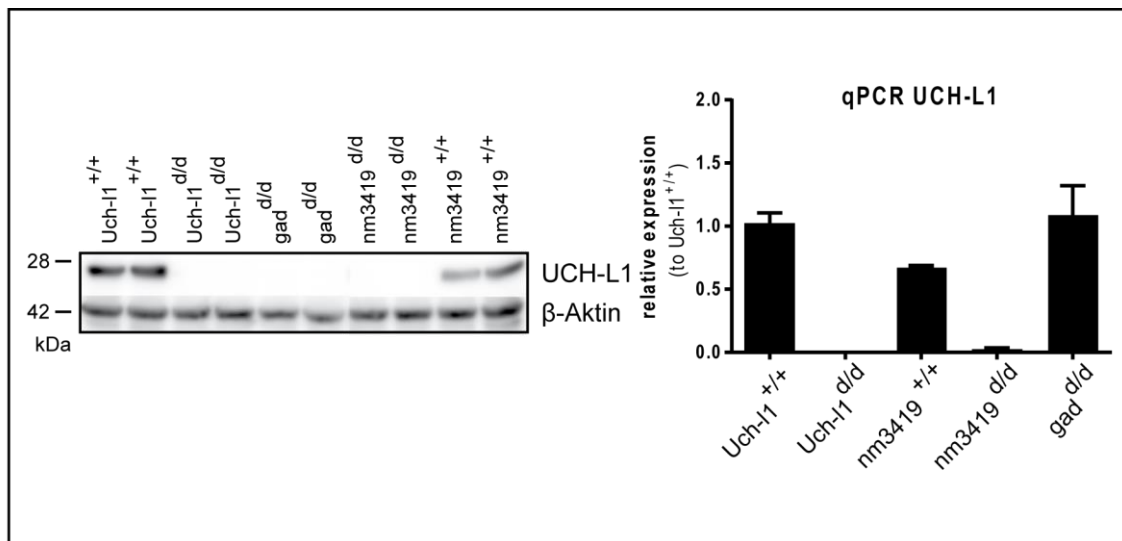
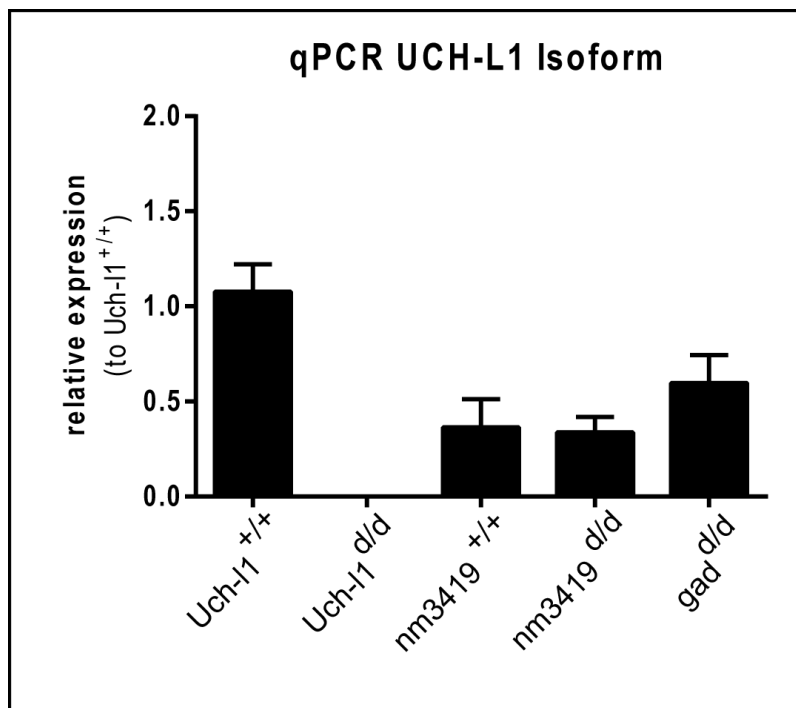


Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Expression von UCH-L1 in unterschiedlichen Mausmodellen. 3 Wochen alten UCH-L1-KO-, UCH^{nm3419}- und gad-Mäusen wurden halbe Hirne entnommen und diese wie oben beschrieben für Western Blot bzw. qPCR Analysen aufgearbeitet. **Linke Seite:** Western Blot auf UCH-L1. Als interne Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Der Arbeitsgruppe standen keine Wildtypen aus der Zucht der gad-Mäuse zur Verfügung. **Rechte Seite:** qPCR auf UCH-L1. Als Housekeeper diente GAPDH. Die Primer umfassen das UCH-L1-Transkript von Exon 5/5 bis Exon 5/6. Aufgrund teils zu geringer Stichproben der nicht von uns gezüchteten gad- (n=2) bzw. UCH^{nm3419}-Tiere (n=2), wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

Mit der Limitation von je nur zwei Tieren pro Gruppe schienen jedoch *nm3419* Wildtyp-Hirne weniger UCH-L1 zu enthalten als UCH-L1-KO Littermate Kontrollen (siehe Abb. 6). In einem zweiten Schritt überprüften wir die UCH-L1-Expression auch auf mRNA-Ebene per qPCR. Hierzu wurde ein Primerpaar gewählt, welches das UCH-L1-Transkript von Exon 4/5 bis Exon 5/6 erfasst. Die Darstellung der Daten erfolgte hier als relative Expression bezogen auf *Uch-11*^{+/+}, da alle Tiere auf C57BL/6 rückgekreuzt waren und für die *gad*-Tiere keine Wildtypen aus selber Züchtung zur Verfügung standen. Wie erwartet zeigten *Uch-11*^{d/d}-Mäuse keinerlei Transkript mehr. Da in der *gad*-Maus die Mutation außerhalb der untersuchten Sequenz war, sahen wir wie erwartet keinen Unterschied in der Menge des Transkriptes zwischen Wildtyp und Knockout. In *nm3419*^{d/d}-Tieren hingegen war eine kleine Restexpression an mRNA (relative Expression ≈ 0,0345) nachweisbar. Auffällig war, dass die relative Expression an UCH-L1 mRNA in *nm3419*^{+/+} kohärent mit den Western Blot Ergebnissen gegenüber *Uch-11*^{+/+} verringert zu sein scheint.

Wir konnten auf mRNA-Ebene einen weiteren Unterschied feststellen: Bei der Erzeugung der UCH-L1-KO Maus wurde durch die Arbeitsgruppe die mRNA einer bisher nicht veröffentlichten UCH-L1-Isoform entdeckt, dessen vollständige Sequenz noch Gegenstand aktueller Forschung ist. Diese mRNA konnte in zahlreichen Geweben gefunden werden, das Protein ließ sich jedoch bisher nicht nachweisen. Die Knockout-Strategie der UCH-L1-KO-Mäuse wurde deshalb so gewählt, dass auch die Transkription der Isoform nicht mehr möglich ist. (Persönliche Mitteilung Prof. Dr. med Meyer-Schwesinger, 01/2020) In einer vergleichenden qPCR war entsprechend für *Uch-l1^{d/d}*-Tiere in deren Hirnen auch keine Isoform mehr nachweisbar. Sowohl *gad-* als auch *nm3419*-Mäuse hingegen transkribieren reichlich mRNA der Isoform. Für *nm3419* scheint sogar kein relevanter Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout zu bestehen.



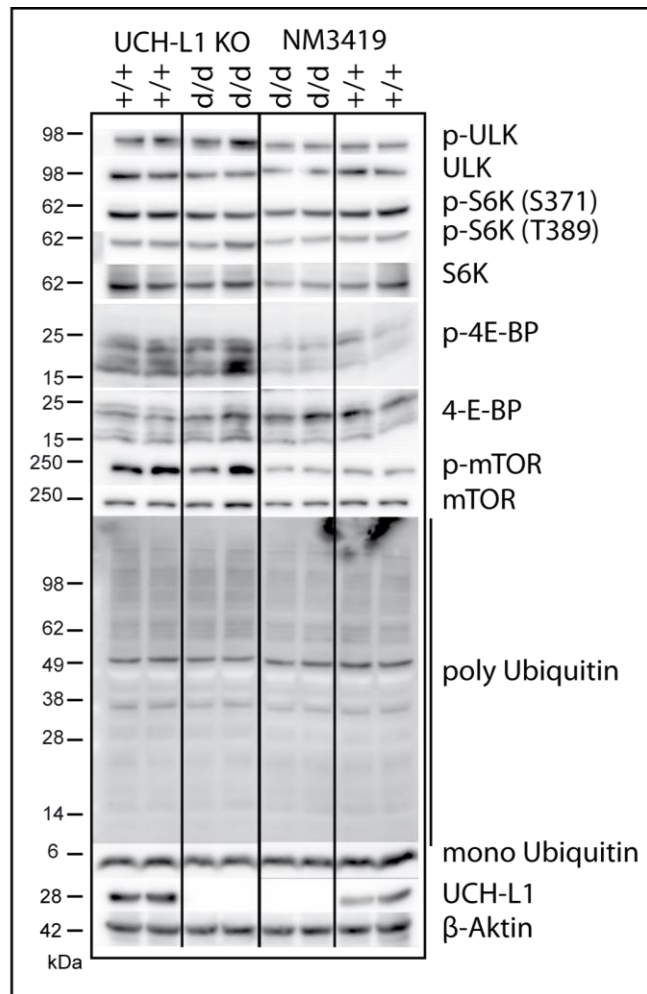
Insgesamt war jedoch die größte Menge mRNA der Isoform in *Uch-l1^{+/+}*-Tieren

Abbildung 7: nm3419- und gad-Mäuse exprimieren eine UCH-L1-Isoform. 3 Wochen alten UCH-L1-KO-, nm3419- und gad-Mäusen wurde halbe Hirne entnommen und diese für qPCR auf die UCH-L1-Isoform aufgearbeitet. Als Kontrolle diente GAPDH. Aufgrund teils zu geringer Stichproben der nicht von uns gezüchteten *gad-* bzw. *UCH^{nm3419}*-Tiere, fand keine statistische Analyse statt.

nachzuweisen (Siehe Abb. 7).

Nachdem wir anhand der Phosphorylierung von Akt keine signifikanten Unterschiede in 3 Wochen alten UCH-L1-KO-Mäusen feststellen konnten wandten wir uns zunächst den anderen von Hussain et al. untersuchten Markern zu. So untersuchten diese auch die downstream von mTORC1 gelegenen Marker p-S6K(T389) und p-4E-BP. Beide können als Marker für den anabolen Metabolismus gesehen werden, indem sie unter anderem die Proteintranslation sowie Nukleotid- und Lipid-Synthese unterstützen. Selbst

ergänzten wir noch einige Marker. So untersuchten wir auch die Phosphorylierung von mTOR sowie die mTOR abhängige Phosphorylierung von ULK, welches bei Phosphorylierung die Autophagozytose hemmt. Da für den Verlust von UCH-L1 bekannt ist, dass dieser zu einer Reduktion von Mono-Ubiquitin führt, interessierte uns zudem, ob ein UCH-L1-Knockout zu einer Störung im Ubiquitin-Stoffwechsel in den UCH-L1-KO und *Nm3419*-Mäusen führen würde. Als globalen Marker sahen wir uns



daher sowohl das Polyubiquitin (pUbi) als auch das Monoubiquitin (mUbi) an. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Western Blots zum Vergleich beider Knockout-Linien. Zur Messung der mTOR-abhängigen Aktivierung bestimmter Enzyme maßen wir deren phosphorylierte Form und verglichen diese mit

Abbildung 8: UCH-L1-KO-Tiere und nm3419-Mäuse zeigen ein unterschiedliches Verhalten mTOR-abhängiger Marker im Alter von 3 Wochen. Halbe Hirne von 3 Wochen alten Tieren wurden wie oben beschrieben entnommen, lysiert und die Lysate auf Gele aufgetragen. Im anschließenden Western Blot wurde die Phosphorylierung wichtiger Kinasen der Proteinbiosynthese untersucht (p70 ribosomal S6 kinases (S6K) und eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins (4E-BP)). Hierzu wurden auf jeweils unterschiedlichen Membranen sowohl auf die phosphorylierte Form als auch die nicht phosphorylierte Form getestet. Gleiches wurde auch für UNC-51-like kinase 1 (ULK) durchgeführt, welche nach Phosphorylierung zu einer verminderten Autophagozytose führt. Zusätzlich wurde die Aktivität des mechanistic target of rapamycin (mTOR) untersucht und der Gehalt an Monoubiquitin und poly-ubiquitinierten Proteinen gemessen. Abschließend wurde zur Kontrolle des Genotyps UCH-L1 dargestellt und als interne Ladekontrolle β-Aktin verwendet.

dem nicht phosphorylierten Protein. Die Autophagozytose schien in beiden Mausmodellen (gemessen an der Ratio pULK/ULK) leicht verändert zu sein. So beobachteten wir eine leicht verstärktes Signal für pULK bei gleichem ULK als Hinweis auf eine verringerte Autophagozytose. Dies entspräche auch einer gesteigerten mTORC1-Aktivität und würde die Ergebnisse von Hussain et al

unterstreichen. Für die S6-Kinase konnten wir weder für die Phosphorylierung an Serin 371 noch an Threonin 389 relevante Unterschiede zwischen den Mäusen beider Linien und Genotypen nachweisen. Unterschiede bezüglich des Ubiquitin-Stoffwechsels schienen entgegen der bestehenden Literatur ebenfalls nicht zu bestehen. Auffällig waren hingegen die Banden bei p-4E-BP und p-mTOR. Hier schien ein Knockout innerhalb der beiden Mauslinien zwar keine Auswirkung zu haben, die Mauslinien selbst jedoch einen großen Unterschied zu zeigen. Die Vergleichbarkeit beider Modelle war somit zu bezweifeln. Für das Western Blot Experiment standen nur 2 Tiere der *nm3419* Linie pro Gruppe zur Verfügung. Es wurde daher keine statistische Analyse durchgeführt. Zusammenfassend war die von Hussain et al. festgestellte mTORC1-Aktivierung in UCH-L1-defizienten Mäusen der Linie *nm3419* im Alter von 3 Wochen nicht sicher zu reproduzieren. Dies galt auch für UCH-L1-KO-Mäuse in diesem Alter. Darüber hinaus verhielten sich Wildtypen beider Züchtungen nicht gleich, was vermuten lässt, dass der genetische Hintergrund (beide Mauslinien im C57BL/6 Hintergrund) Unterschiede aufwies.

4.2 UCH-L1-KO-Mäuse zeigen eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Transkription mTORC1-abhängiger Gene

Nachdem wir, entgegen unserer auf der Literatur basierten Erwartungen, zunächst keine Erhöhung des mTORC1-Signalweges in 3 Wochen alten UCH-L1-KO-Mäusen auf Protein-Ebene beobachten konnten, führten wir weitere Experimente auf mRNA-Ebene durch. Aus anderen Studien ist bekannt, dass eine erhöhte mTORC1 Aktivität mit einer Steigerung des mitochondrialen Energiestoffwechsel (65) als auch mit einer Steigerung des Fettstoffwechsels und einer vermehrten Transkription von Wachstumsfaktoren in Zusammenhang steht (66). Wir untersuchten zunächst in Hirngewebe von drei Wochen alten UCH-L1-KO-Mäusen, (*Uch-11^{+/+}*, *Uch-11^{+/d}*, *Uch-11^{d/d}*), ob die Expression von verschiedenen von mTORC1 beeinflussten Teilen des mitochondrialen Energiestoffwechsels in Abhängigkeit zum Genotyp per qPCR verändert ist (Abb. 9). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression der Cytochrome c oxidase subunit 5a (*Cox5a*) sowie des mitochondrialen ATP synthase lipid-binding protein (*Atp5g1*) in Hirngewebe von *Uch-11^{d/d}*-Mäusen. Auch Zytochrom C war tendenziell (aber nicht signifikant) in den Knockout-

Tieren erhöht. Lediglich die Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha (*Idh3a*) zeigte in UCH-L1-defizienten Tieren eine signifikant niedrigere relative Expression im Vergleich zum Wildtyp. Die Unterschiede zwischen wildtyp- und heterozygoten Tieren waren aufgrund einer höheren Wertestreuung der heterozygoten Tiere jeweils nicht signifikant, der Trend einer niedrigeren relativen Expression in heterozygoten Tieren gegenüber dem Wildtyp war jedoch deutlich zu erkennen (siehe Abb. 9). Man kann somit festhalten, dass in Hirnen von *Uch-11^{d/d}*-Tieren die Transkription von den meisten für den mitochondrialen Energiestoffwechsel wichtigen Enzymen (mit Ausnahme von *Idh3a*) erhöht ist.

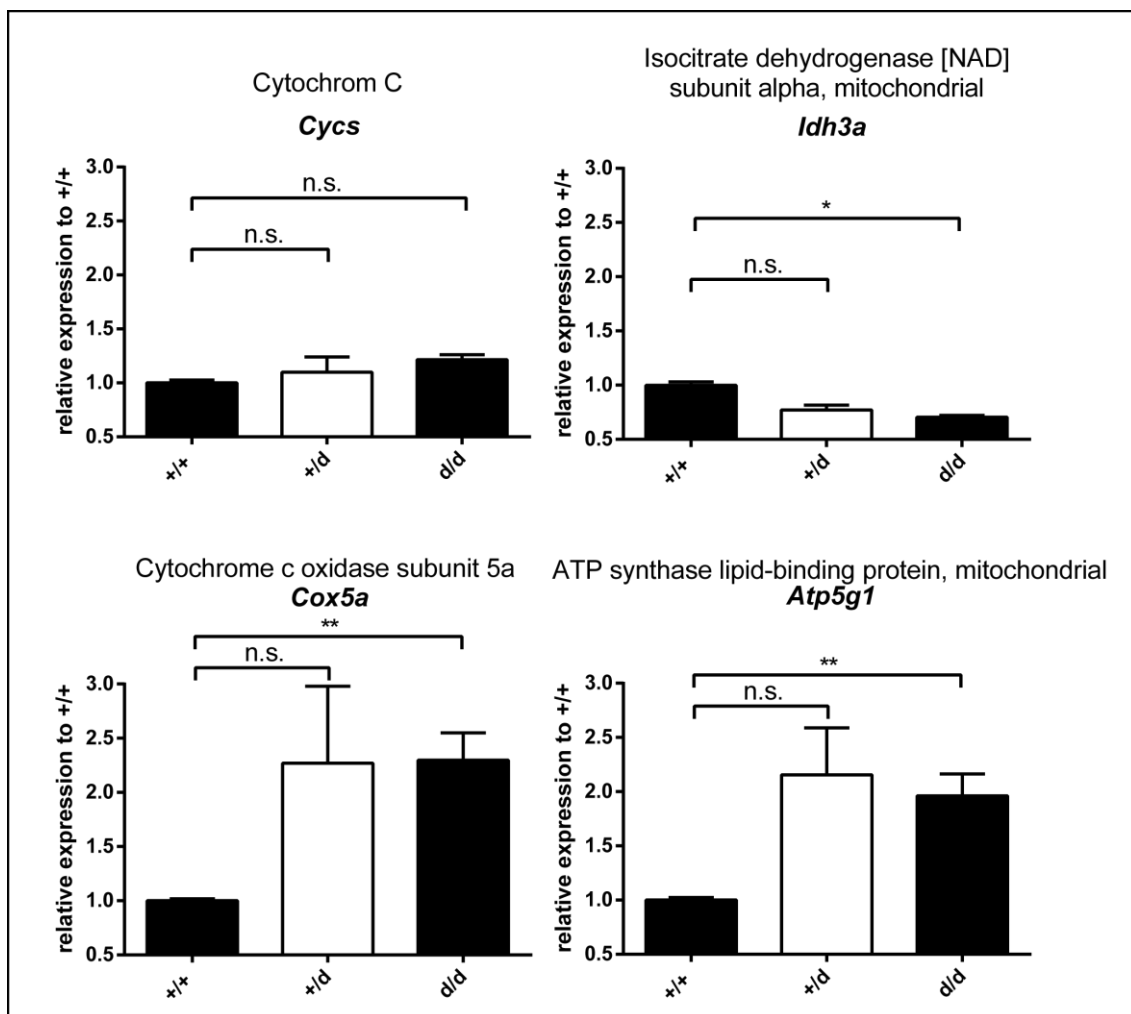


Abbildung 9: Uch-11^{d/d} -Tiere weisen gegenüber Wildtyptieren einen gesteigerten mitochondrialen Energiestoffwechsel auf. Drei Wochen alten Mäusen der Linien UCH-L1-KO (n=4 (+/+), n=3 (+/-), n=8 (d/d)) wurden halbe Hirne entnommen, diese lysiert und die mRNA isoliert. Diese wurden per qPCR auf die Enzyme bzw. Untereinheiten von Enzymkomplexen des mitochondrialen Energiestoffwechsels Cytochrom C (CYCS), Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (IDH3A), Cytochrome C oxidase subunit 5a (COX5A) und ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial (ATP5G1) untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte per Mann-Whitney-U-Test. (*p<0.05, **p<0.01, n.s.= nicht signifikant zu Uch-11^{+/+}.)

Unter den zahlreichen von mTORC1 beeinflussten Genen sind auch wichtige Bestandteile des Fettstoffwechsels. Zwei bekannte, von mTORC1 hochregulierte Transkripte, sind der Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (*Srebf1*), sowie die Fatty Acid Synthase (*Fasn*). Sowohl für *Srebf1* als auch für *Fasn* konnte ein signifikanter Unterschied zwischen wildtyp-Tieren und Knock-out Tieren gezeigt werden (Abbildung 10 A). Während *Srebf1* in *Uch-11^{d/d}*-Tieren weniger exprimiert wurde, zeigte *Fasn* eine deutlich höhere relative Expression. Es wurden außerdem die Wachstumsfaktoren *Hif1a* (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) und *Vegfa* (Vascular Endothelial Growth Factor A) untersucht. *Vegfa* war in *Uch-11^{d/d}*-Tieren deutlich stärker exprimiert als in den Kontrolltieren, während für *Hif1a* kein Unterschied festgestellt werden konnte (Abbildung 10 B).

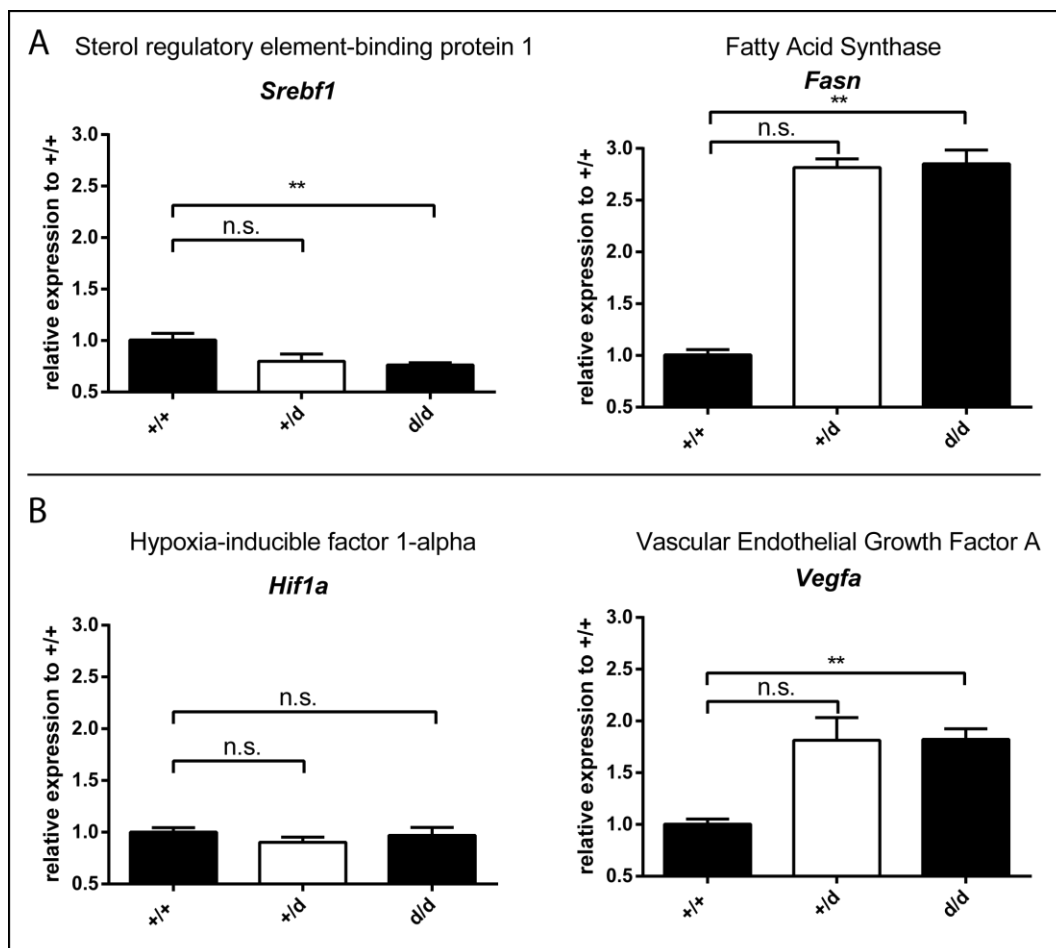


Abbildung 10: *Uch-11^{d/d}*-Tiere weisen gegenüber Wildtyp-Tieren einen veränderten Fett-Stoffwechsel und Wachstumsfaktor Transkript Gehalt auf. Drei Wochen alten Mäusen der Linien UCH-L1-KO ($n=4$ (+/+), $n=3$ (+/d), $n=8$ (d/d)) wurden halbe Hirne entnommen, diese lysiert und die RNA isoliert. Diese wurden per qPCR auf den mRNA Gehalt von Sterol regulatory element-binding transcription factor 1 (*Srebf1*) und Fatty Acid Synthase (*Fasn*) des Fettstoffwechsels untersucht. Zusätzlich wurde der Transkriptgehalt der Wachstumsfaktoren Hypoxia-inducible factor 1-alpha (*Hif1a*) und Vascular Endothelial Growth Factor A (*Vegfa*) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte per Mann-Whitney-U-Test. (** $p<0.01$; n.s.= nicht signifikant zu *Uch-11^{+/+}*.)

Wie bereits oben erwähnt, konnte wir auch in dieser Auswahl von mTORC1 regulierten Genen eine selektive Steigerung der relativen Expression in *Uch-11^{d/d}*-Tieren beobachten. Dies galt allerdings nur für *Fasn* sowie den *Vegfa*. Das *Scrbf1*, für das wir ebenfalls eine Steigerung erwartet hätten, wurde jedoch signifikant weniger exprimiert, während der Wachstumsfaktor *Hif1a* keine Unterschiede in den Genotypen zeigte. Bereits zu diesem Zeitpunkt war somit nicht von einer globalen Steigerung der mTORC1-Aktivität in *Uch-11^{d/d}*-Tieren auszugehen, sondern von einem deutlich komplexeren System.

4.3 Die Proteinsynthese in UCH-L1-defizienten Hirnen ist erhöht

Wir konnten die von Husain et al. veröffentlichten Daten zur mTORC1-Aktivierung in 3 Wochen alten *nm3419^{d/d}*-Tieren auf Proteinebene weder in *nm3419^{d/d}*-Mäusen noch UCH-L1-KO-Tieren sicher reproduzieren. Die von uns auf mRNA-Ebene durchgeführten Experimente in UCH-L1-KO-Mäusen zeigten jedoch deutlich, dass UCH-L1 einen Einfluss auf das mTORC1-Signaling hat. Wir vermuteten daher, dass dies auch auf Proteinebene durch Anpassung der Methode nachweisbar sein müsste. Für alle hier besprochenen UCH-L1-Knockout Mauslinien gilt, dass der Phänotyp erst mit der 5-6. Lebenswoche beginnt apparent zu werden (20, 21, 57). Wir gingen daher von einem altersabhängigen Einfluss des UCH-L1-Knockouts auf den mTORC1 Signalweges aus. Hierzu untersuchten wir Mäuse aus drei verschiedenen Altersgruppen. Die Gruppen wurden so eingeteilt, dass eine Gruppe Mäuse vor Beginn der neurologischen Symptomatik enthielt, welche zwischen 5 und 9 Tage alt waren (P5-9), eine zweite Gruppe die Zeit mit dem Beginn der Symptome umfasste (Woche 3 bis Woche 5 (W3-5)), sowie eine letzte Gruppe von über 12 Wochen alten, symptomatischen Mäusen (W12+). Wir untersuchten zunächst wichtige mTOR-abhängige Mediatoren der Proteinsynthese und verglichen *Uch-11^{d/d}*-Tiere mit *Uch-11^{+/+}* Littermates. Hierbei wurde jeweils die phosphorylierte, aktive Form in Verhältnis zur inaktiven Form gesetzt und abschließend auf die Ladekontrolle β -Aktin korrigiert. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse repräsentativer Western Blots. Die Analyse erfolgte per Densitometrie und mixed-effects-model und ist grafisch ebenfalls in Abbildung 11 zu finden. Die p70S6-Kinase sowie dessen Substrat S6 zeigen eine präsymptomatisch erhöhte Aktivität, welche mit zunehmendem Alter (und damit

zunehmender Stärke der Symptome) abnimmt. Insbesondere die Ratio p-S6/S6 war signifikant erhöht. Die Ratio p-4E-BP/4E-BP war in *Uch-11^{d/d}* hingegen unabhängig vom Alter erhöht. Dies ist insofern interessant, als dass 4E-BP im Gegensatz zur S6-Kinase hauptsächlich die 5'-cap-abhängige mRNA Translation steuert, während die S6-Kinase auch an der Nucleotid- und Lipidsynthese sowie am Glucosemetabolismus beteiligt ist.

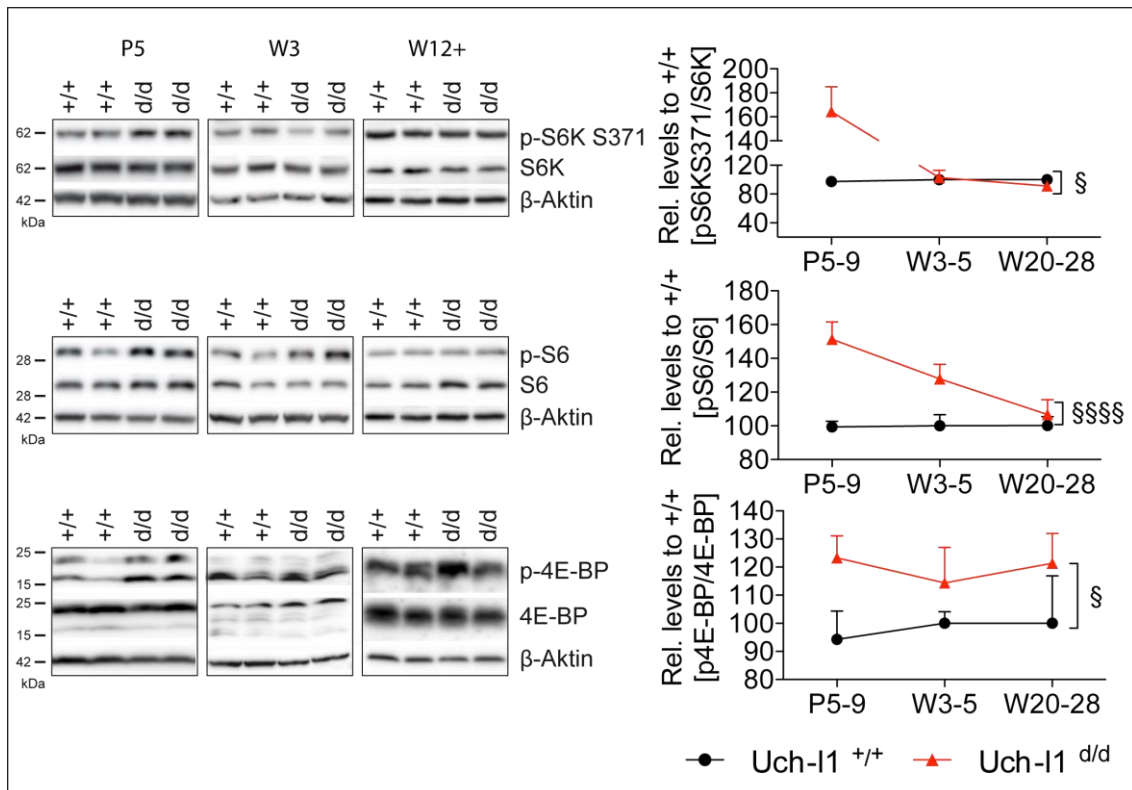


Abbildung 11: Die Aktivierung von Schlüsselenzymen, die die Proteinsynthese aktivieren, ist in Hirnen UCH-L1-defizienter Mäuse postnatal erhöht.: Links: *Uch-11^{d/d}* und *Uch-11^{+/+}* Mäusen wurden Hirne im Alter von 5 Tagen (P5), 3 Wochen (W3) und über 12 Wochen (W12+) entnommen und diese für Western Blot aufbereitet. Anschließend wurde jeweils auf die aktivierte, phosphorylierte Form und auf die nicht phosphorylierte Form der für die Proteinbiosynthese wichtigen Kinasen p70 ribosomal S6 kinases (S6K) und ribosomal protein S6 (S6) sowie den eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins (4E-BP) gepopt. β-Aktin diente als interne Ladekontrolle. **Rechts:** Auswertung der Ergebnisse mit insgesamt 8-9 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt aus 2-3 unabhängigen Experimenten per Densitometrie. Die Signifikanz wurde per Mixed-Effects-Model berechnet, und nach Bonferroni korrigiert. (§ $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$; §§§§ $p < 0.001$ zu *UCH-L1^{+/+}*).

4.4 *Uch-11^{d/d}*-Mäusen zeigen eine geringere Aktivität von ULK

Nachdem wir für die durch mTORC1 vermittelten anabolen Prozesse (anhand von pS6K, S6 und 4E-BP) einen altersabhängigen Einfluss des UCH-L1-Knockouts nachweisen konnten, wollten wir die katabolen Prozesse ebenfalls betrachten. Hierzu diente zunächst ULK, eine Kinase, welche im aktiven

Zustand die Autophagozytose aktiviert (51). Wir konnten zeigen, dass phosphoryliertes ULK in 5 Tage alten UCH-L1-defizienten Tieren signifikant erhöht war gegenüber Wildtyptieren (Abbildung 12). Diese Phosphorylierung geht mit einer geringeren Aktivität von ULK einher und deutet daher auf eine verringerte Aktivierung der Autophagozytose hin. Wie auch die oben beschriebene Aktivität von S6, S6K und 4E-BP ist dieser Zusammenhang altersabhängig. 5 Tage alte UCH-L1-defiziente Tiere weisen in Hirngewebe die höchste Ratio p-ULK/ULK auf, während dies in älteren Tieren zusehends abnimmt. Abbildung 12 zeigt Ausschnitte repräsentativer Western Blots.

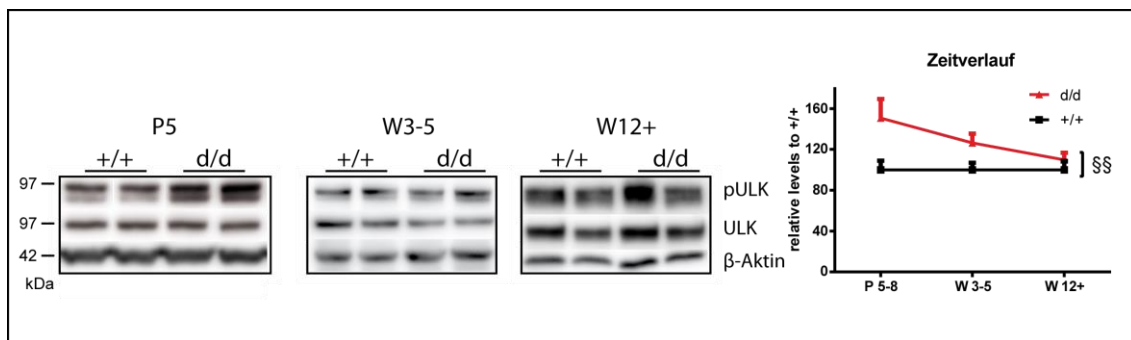


Abbildung 12: Postnatale Uch-11^{d/d} Hirne weisen eine erhöhte Phosphorylierung von ULK auf. Uch-11^{d/d} und Uch-11^{+/+} Mäusen wurden Hirne im Alter von 5 Tagen (P5), 3 Wochen (W3) und über 12 Wochen (W12+) entnommen und diese für Western Blot aufbereitet. Anschließend wurden diese auf UNC-51-like kinase 1 (ULK) und die phosphorylierte, inaktive Form gepoolt. β -Aktin diente als interne Ladekontrolle. Der rechte Graph zeigt die Auswertung aller Experimente mit insgesamt 8-15 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt aus 9 unabhängigen Experimenten per Densitometrie. Die Signifikanz wurde per Mixed-Effects-Model berechnet, und nach Bonferroni korrigiert, §§ $p < 0.01$ zu Uch-11^{+/+}.

Zusammengefasst zeigt insbesondere das Hirngewebe 5 Tage alter Uch-11^{d/d} Tiere eine starke Aktivierung anaboler Prozesse bei gleichzeitiger Inaktivierung der Autophagozytose-aktivierenden Kinase ULK.

4.5 Uch-11^{d/d}-Mäuse zeigen ein verändertes Ubiquitin-Verhalten

Nach Analyse von ULK erfolgte zur weiteren Differenzierung der katabolen Prozesse eine Untersuchung des Ubiquitinstoffwechsels als Teil des katabolen Ubiquitin-Proteasom-System (UPS, siehe Kapitel 3.1). Die Literatur beschreibt bei Verlust von UCH-L1 in Mäusen eine Reduktion des Monoubiquitin-Gehaltes und bei Überexpression eine Erhöhung der Menge an Monoubiquitin. Hierzu wurden eine spontane Knockout-Maus (*gad*) sowie eine transgene, UCH-L1 überexprimierende Maus genutzt und (unter anderem) deren Hirngewebe aufgearbeitet (11). Zur weiteren Analyse der UCH-L1-KO-Maus führten wir daher in den jeweiligen Altersgruppen eine Messung des Gehaltes an

polyubiquitinierten Proteinen bzw. von Monoubiquitin durch (Abbildung 13). Wir stellten fest, dass in jungen, präsymptomatischen Mäusen kein Effekt auf den Monoubiquitingehalt durch UCH-L1 Defizienz nachweisbar war. Mit zunehmendem Alter sank der Monoubiquitin Gehalt in *Uch-11^{d/d}*-Gehirnen jedoch und war postsymptomatisch erst im Alter von über 12 Wochen signifikant erniedrigt. Im Gegensatz dazu war der Gehalt an polyubiquitinierten Proteinen in präsymptomatischen *Uch-11^{d/d}*-Gehirnen erhöht und sank mit zunehmendem Alter ab, um bereits im Alter von 3-5 Wochen tendenziell (jedoch nicht signifikant) erniedrigt zu sein im Vergleich zu *Uch-11^{+/+}* Gehirnen.

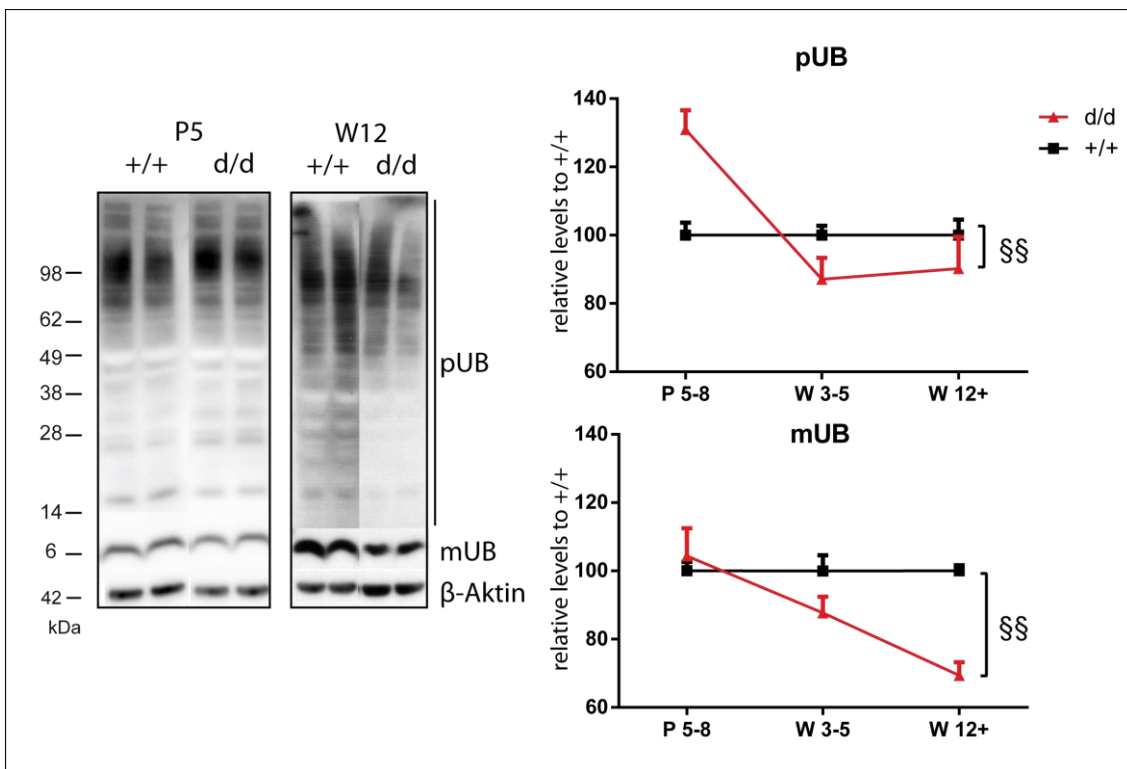


Abbildung 13: Der Monoubiquitin Gehalt ist zu post- aber nicht zu präsymptomatischen Zeitpunkten reduziert. Poly-ubiquitinierte Proteine verhalten sich umgekehrt. *Uch-11^{d/d}* und *Uch-11^{+/+}* Mäusen wurden Hirne im Alter von 5 Tagen (P5), 3 Wochen (W3) und über 12 Wochen (W12+) entnommen und diese für Western Blot Analysen aufbereitet. Anschließend wurden diese auf Monoubiquitin (mUB) und auf polyubiquitinierte Proteine (pUB) geprobt. β -Aktin diente als interne Ladekontrolle. Die daneben abgebildeten Graphen zeigen die Auswertung aller Experimente mit insgesamt 6-9 Tieren pro Gruppe und Zeitpunkt aus 7 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde per Mixed-Effects-Model berechnet, und nach Bonferroni korrigiert. (§§ $p < 0.01$ zu *Uch-11^{+/+}*) bzw. mittels Mann-Whitney-U-Test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. = nicht signifikant zu *Uch-11^{+/+}*) berechnet.

4.6 Rapamycin senkt die mTORC1-Aktivität und hebt die Unterschiede zwischen Genotypen auf

Wir interpretierten die oben beschriebenen Ergebnisse als mTORC1-abhängige Steigerung der Proteinsynthese bei gleichzeitig reduzierter Autophagozytose in *Uch-11^{d/d}*-Gehirnen gegenüber Wildtypen.

Der Frage folgend, ob diese Effekte tatsächlich über mTORC1 vermittelt werden, behandelten wir die neugeborenen Mäusen täglich mit Injektionen von Rapamycin (0,1 mg/Kg gelöst in Ethanol) oder Vehicle (NaCl gelöst in Ethanol) bis zur Organentnahme. Die Tiere wurden am 5. Lebenstag getötet und auf Proteinsyntheserate, Autophagie und auf den Ubiquitinstoffwechsel hin untersucht (Abbildungen 14 und 15). ULK, als Kinase die bei Aktivierung (unphosphorylierte Form) die Autophagozytose aktiviert, war in *Uch-11^{d/d}* Tieren signifikant vermehrt phosphoryliert. Die Behandlung mit Rapamycin führte in Wildtyp-Tieren überraschenderweise nicht zu einer signifikanten Senkung des Gehaltes an phosphoryliertem ULK. In Knockout-Tieren hingegen wurde die ULK-Phosphorylierung signifikant auf das Niveau der Wildtypiere gesenkt.

Ähnliche Effekte der Rapamycintherapie lassen sich auch bei den Proteinsynthesemarkern p-S6K T389 und p-S6 beobachten. Sowohl S6K als auch S6 lagen in den mit Vehicle behandelten, UCH-11-defizienten Tieren stärker phosphoryliert vor als in Wildtypieren. Bei diesen Markern führte die Therapie mit Rapamycin zu einer signifikanten Reduzierung der Aktivität in Wildtyp- und in UCH-L1-defizienten Tieren. Unterschiede zwischen den Genotypen konnten in der Rapamycin-Gruppe nicht mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich untersuchten wir, ob mTOR in *Uch-11^{d/d}*-Tieren stärker an Serin 2448 phosphoryliert ist, da diese Phosphorylierung positiv mit der mTORC1-Aktivität korreliert (67). Dies war jedoch in *Uch-11^{d/d}* überraschenderweise nicht der Fall. Hier sahen wir eine signifikante Reduktion der mTOR-phosphorylierung an S2448 gegenüber Wildtypen. Die Therapie mit Rapamycin erbrachte ein zu den anderen untersuchten Proteinen analoges Ergebnis ohne signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen.

Die gewählte Dosis an Rapamycin war für die meisten, aber nicht für alle mTORC1 Substrate gut angepasst. Für ULK und 4E-BP waren durch Rapamycin-Therapie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtypen messbar, während die für S6, S6K und mTOR der Fall war.

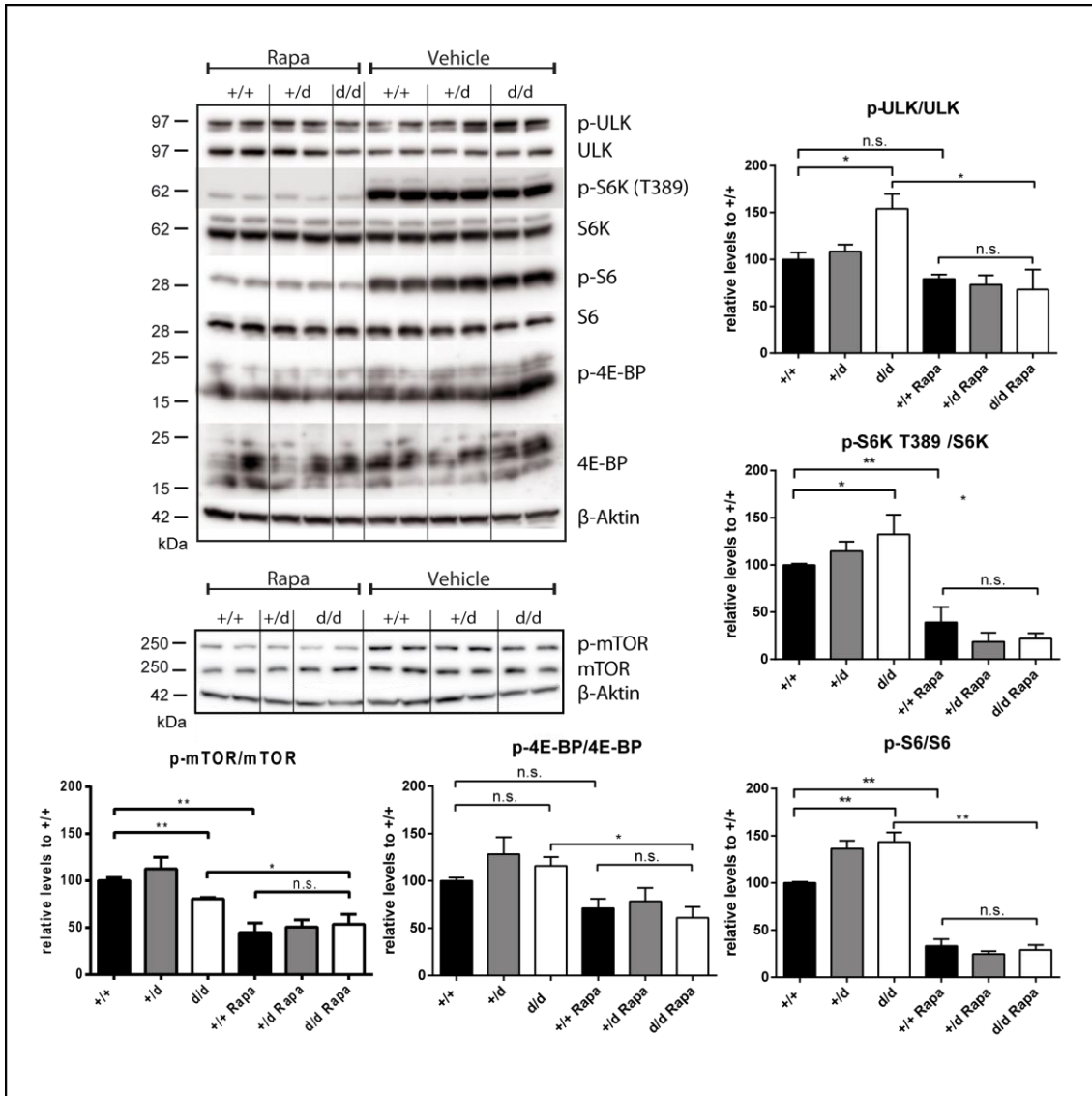


Abbildung 14: Rapamycin senkt die mTOR-Aktivität und hebt die Unterschiede zwischen den Genotypen auf. *Uch-11^{+d}* Mäuse wurden gekreuzt und deren Würfe ab Geburt täglich mit Injektionen von Rapamycin (Rapa; 0,1 mg/Kg gelöst in Ethanol) oder Vehicle (NaCl gelöst in Ethanol) bis zur Organentnahme an Tag 5 behandelt. Homozygoten-, heterozygoten bzw. Wildtypen wurden die Hirne entnommen und diese für Western Blot aufbereitet. Anschließend wurde jeweils auf die aktivierte, phosphorylierte Form und die nicht phosphorylierte Form der für die Proteinbiosynthese wichtigen Kinasen p70 ribosomal S6 kinases (S6K) und ribosomal protein S6 (S6), sowie den eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins (4E-BP) geprobt. Ebenso wurden die UNC-51-like kinase 1 (ULK) und dessen phosphorylierte, inaktive Form sowie das mechanistic target of rapamycin (mTOR) und dessen phosphorylierte Form (S2448) untersucht. β-Aktin diente als interne Ladekontrolle. Die Ergebnisse aller Experimente zeigen die entsprechenden Grafiken. Jede Grafik fasst die Experimente mit 5-6 Tieren pro Gruppe aus 3-4 unabhängigen Experimenten zusammen. Diese Angaben, sowie die Statistik beziehen sich nur auf Wildtypen und Knockout-Tiere. Die Signifikanz wurde per Mann-Whitney-U-Test ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s.= nicht signifikant.) berechnet.

Zhao et al. konnten 2015 zeigen, dass die Inhibition von mTOR mittels Rapamycin zu einem erhöhten Gehalt an polyubiquitinierten Proteinen in Mäuselebern führt (53). Wir stellten uns die Frage, ob dies auch in den Hirnen unserer Mäuse der Fall sein könnte. Es wurden daher zu dem eben beschriebenen Experiment analoge Experimente durchgeführt, bei denen die

Proben auf Polyubiquitin bzw. Monoubiquitin untersucht wurden (Abbildung 15). Im Experiment wurden jeweils *Uch-11^{d/d}* bzw. *Uch-11^{+/+}* im Alter von 5-9 Tagen sowie 12 Wochen untereinander verglichen, die entweder mit Rapamycin oder Vehicle behandelt wurden. Hierbei konnte in keiner Altersgruppe, weder für Mono- noch für Polyubiquitin, ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Auch die *Uch-11^{+/+}* wiesen hier keinen signifikanten Unterschied auf. Der Monoubiquitin Gehalt ist auch weiterhin zu post- aber nicht zu präsymptomatischen Zeitpunkten in Knockouttieren reduziert. Polyubiquitinierte Proteine sind auch unter Rapamycin zu prä- aber nicht postsymptomatischen Zeitpunkten signifikant erhöht. Anhand von p-S6 und S6 konnten wir die erfolgreiche Rapamycintherapie im Alter von 5-9 Tagen als auch für 12 Wochen alte, über das Trinkwasser behandelte Mäuse zeigen.

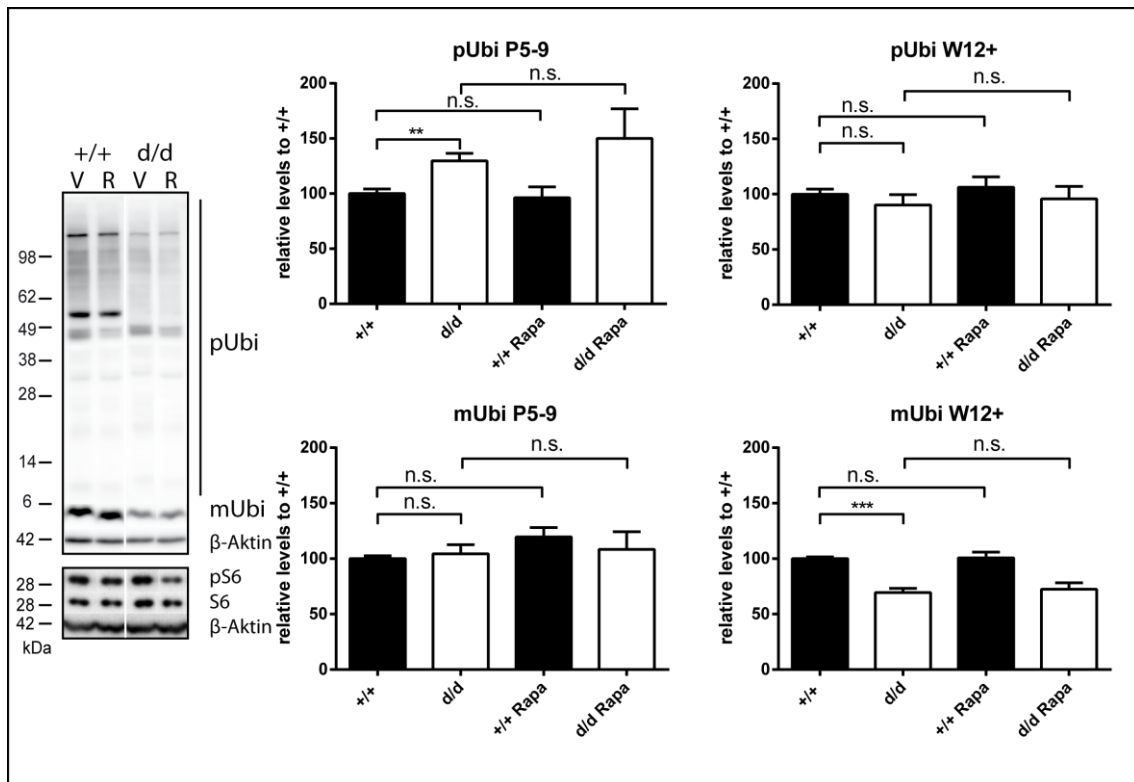


Abbildung 15: Rapamycin hat keine Auswirkung auf den Gehalt polyubiquitiniertes Proteine oder an Monoubiquitin. Heterozygote *UCH-L1-KO-Mäuse (Uch-11^{+/-})* wurden gekreuzt und deren Würfe ab Geburt täglich mit Injektionen von Rapamycin (R; 0,1 mg/Kg gelöst in Ethanol) oder Vehicle (V, NaCl gelöst in Ethanol) bis zur Organentnahme am 5.-9. Lebensstag behandelt (P5-9). 12 Wochen alte Mäuse (W12+) erhielten für 7 Tage vor der Organentnahme über das Trinkwasser Rapamycin (R) bzw. nur Wasser (V). Der dargestellte Western Blot zeigt die Untersuchung von Monoubiquitin bzw. polyubiquitinierten Proteinen bei 12 Wochen alten Tieren. β -Aktin diente als interne Ladekontrolle. Zusätzlich wurden p-S6 und S6 als Kontrolle der mTORC1-Unterdrückung eingefügt. Heterozygote Tiere wurden aus dem Blot herausgeschnitten. Der Schnitt ist mit einer weißen Linie markiert. Die rechts abgebildeten Diagramme zeigen die Auswertung aller Experimente dieser Art mit 4-5 (P5-9) bzw. 9-11 (W12+) Tieren pro Gruppe. Die Signifikanz wurde per Mann-Whitney-U-Test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s. = nicht signifikant.) berechnet.

4.7 UCH-L1-defiziente-Neuron weisen eine höhere Phosphorylierung von mTOR auf

Entgegen unserer Erwartungen hatten wir in 5 Tage alten *Uch-11^{d/d}*-Mäusen keine Steigerung der Phosphorylierung vom mTOR an Serin 2448 gemessen, sondern eine signifikante Reduktion. Wir versuchten daher die Messergebnisse aus dem Gewebe ganzer Mäusehirne in embryonalen Neuronenkulturen zu reproduzieren. Leider lag für dieses Experiment nur eine geringe Anzahl an Proben vor, wodurch eine statistische Analyse nicht angebracht war. Tendenziell scheinen jedoch UCH-L1-defiziente Neurone eine verstärkte Phosphorylierung von mTOR aufzuweisen. Dies stünde im klaren Gegensatz zu den Experimenten im Gewebe, in denen p-mTOR im Knockout gegenüber dem Wildtyp reduziert war. Die Marker für Proteinsynthese und ULK

waren ebenfalls erhöht in UCH-L1-defizienten Neuronen. Mit Ausnahme von S6 war jedoch jeweils auch die nicht phosphorylierte Form erhöht, sodass die Ratio vermutlich gleich bleibt. Leider existiert keine Verifizierung der UCH-L1 Expression in diesem spezifischen Experiment, so dass trotz vorheriger Genotypisierung nicht sicher der Genotyp abgebildet ist. Die Aussagekraft dieses Experiments ist somit eingeschränkt. (Abbildung 16).

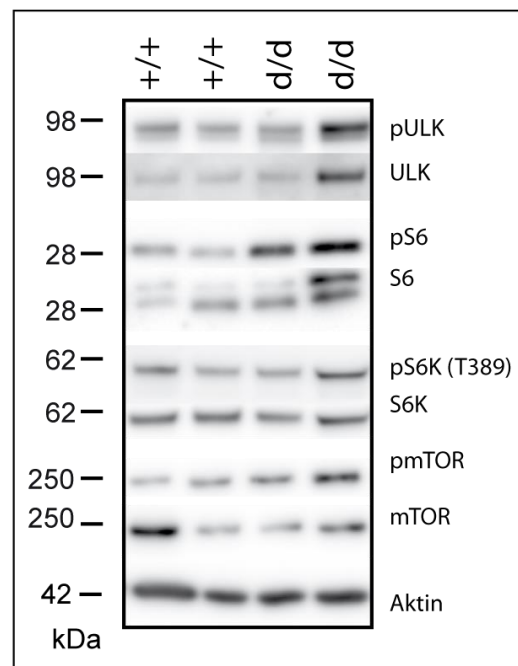


Abbildung 16: UCH-L1-defiziente Neuronen zeigen eine stärkere mTOR-abhängige Phosphorylierung downstream gelegener Targets. *Uch-11^{+/+} wurden gekreuzt, tragende Weibchen getötet und hippocampales Hirngewebe der Embryonen entnommen, die Neurone isoliert und kultiviert. Das angezüchteten Neurone wurde per Western Blot analysiert und auf p70 ribosomal S6 kinases (S6K) und ribosomal protein S6 (S6) sowie UNC-51-like kinase 1 (ULK) und das mechanistic target of rapamycin (mTOR) bzw. deren phosphorylierte Form hin untersucht. β -Aktin diente als interne Ladekontrolle.*

5. Diskussion

UCH-L1 ist ein deubiquitinierendes Enzym, welches einen wichtigen Bestandteil des neuronalen Ubiquitins-Systems darstellt und bis zu 5% des gesamtlöslichen Proteins im Hirn ausmacht (16). Hierbei wird davon ausgegangen, dass UCH-L1 für die Aufrechterhaltung der axonalen Funktion von essentieller Wichtigkeit ist, ohne jedoch für die neuronale Entwicklung notwendig zu sein (6). Zur Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus der durch UCH-L1-Defizienz hervorgerufenen Neurodegeneration generierte die Arbeitsgruppe die UCH-L1-KO-Maus, welche anders als die bisher veröffentlichten, spontanen Knockout-Tiere (*nm3419* und *gad*) einen kompletten Knockout ohne Transkription von trunkierter mRNA darstellt (20, 21, 57). Unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur, der hier vorliegenden Daten sowie weiterer Daten aus der Arbeitsgruppe ist nun von einer bisher nicht bekannten Rolle von UCH-L1 für die neuronale Entwicklung auszugehen. Die hier beschriebenen Daten zeigen zusammen mit den in Reinicke et al. 2019 dokumentierten Experimenten, dass UCH-L1-defizienz in den ersten Lebenswochen zu einer erhöhten neuronalen Proteinbiosynthese führt, welche ER-Stress mit Überlastung von katabolen Stoffwechselprozessen induziert und letztlich über eine Akkumulation von nicht abgebauten, poly-ubiquitinierten Proteinen zu Neurodegeneration führt. Hierbei sind vermutlich Motoneuronen aufgrund der Notwendigkeit einer hohen präsynaptischen Proteinsynthese besonders vulnerabel. Dies wird um die fünfte Lebenswoche durch messbare neuromuskuläre Symptome deutlich (57).

Wichtiger erster Schritt unserer Arbeit waren Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der UCH-L1-KO-Maus mit den bestehenden Knockout-Modellen *gad* und *nm3419*. In Hinblick auf das Ziel dieser Arbeit wurde hierzu zunächst das mTORC-Signaling betrachtet.

5.1 UCH-L1-KO, *gad* und *nm3419* sind im Wesentlichen vergleichbar

Hussain et al. beschrieben 2010, dass UCH-L1 das mTORC1-Signaling beeinflusst. Sie dokumentierten in UCH-L1-überexprimierenden HeLa-Zellen

eine verstärkte Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von Akt an T308 und S473. Umgekehrt konnte die Arbeitsgruppe in KMS-28-Zellen eine verringerte Phosphorylierung von Akt darstellen, indem sie deren physiologische UCH-L1-Expression unterdrückten. Dabei war der Effekt an Akt-T308 jeweils geringer als an Akt-S473. Die Phosphorylierung an Akt-S473 ist ein bekanntes Target des mTOR2-Komplexes und ein guter Marker für dessen Aktivität, während eine Phosphorylierung an Akt-T308 für eine geringe mTORC1-Aktivität spricht (27). In einer weiteren Arbeit zeigte dieselbe Gruppe, dass UCH-L1 mTORC1 und mTORC2 auch *in vivo* beeinflusst. Dabei führte eine Überexpression von UCH-L1 zu einer verringerten mTORC1-Aktivität bei gesteigerter mTORC2-Aktivität in Hirn- sowie Milzgewebe UCH-L1-überexprimierender transgener Mäuse als auch in UCH-L1 exprimierenden HELA-Zellen. Ein Knockout von UCH-L1 in *nm3419* führte hingegen zu einer erhöhten mTORC1-Aktivität bei verringerter mTORC2-Aktivität. Hussain et al. schlagen auf der Basis von *in vitro* mechanistischen Untersuchungen an transfizierten HEK-293T-Zellen eine destabilisierende Wirkung von UCH-L1 auf mTORC1 vor (28).

Wir versuchten zunächst die Ergebnisse von Hussain et al. zu reproduzieren. In der Arbeit von Hussain wurde kein besonderes Alter der Mäuse oder Geschlecht angegeben, sondern lediglich, dass die Altersverteilung in den verglichenen Gruppen jeweils gleich war. Wir begannen daher zunächst mit 3 Wochen alten Mäusen der Linie UCH-L1-KO und analysierten p-Akt an T308 bzw. an S473. Überraschenderweise konnten wir jedoch nicht die erwartete verringerte Phosphorylierung von Akt an T308 bei gleichzeitig gesteigerter Phosphorylierung an S473 in UCH-L1-defizienten Tieren beobachten. In den drei Wochen alten Tieren ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout. Wir erweiterten die Stichprobe und forderten das genaue Protokoll der Hussain-Arbeitsgruppe an. Auch auf diese Weise war jedoch kein Genotypen-abhängiger Unterschied in der Akt-Phosphorylierung messbar (Abb. 5), Gemessen an Akt zeigten 3 Wochen alte UCH-L1-KO-Mäuse demnach keine veränderte mTORC1 oder mTORC2-Aktivierung. Es boten sich hierfür vordringlich zwei mögliche Erklärungen an: Einerseits war das andersartige Mausmodell eine mögliche Erklärung, andererseits könnte das Alter der Tiere in Hinblick auf den altersabhängigen Phänotyp falsch gewählt worden sein.

Wir verglichen daher die bestehenden Mausmodelle in Experimenten direkt miteinander. Hierzu erhielten wir freundlicherweise durch Dr. Hussain Gehirnproben von n=2 seiner *nm3419* Mäuse zur weiteren Untersuchung und von Prof. K. Wada aus Japan von n=2 *gad* Mäusen, letztere allerdings ohne dazugehöriger Kontrollmäuse. Auf Proteinebene war für beide Mauslinien kein intaktes UCH-L1 in den Knockouttieren aller drei Linien nachweisbar. Es schien jedoch so, als wenn *nm3419*^{+/+}-Tiere weniger UCH-L1 exprimieren würden als Wildtypen unserer Züchtung. Auch auf mRNA-Ebene transkribierten *nm3419*^{+/+}-Tiere ebenfalls weniger UCH-L1 als UCH-L1^{+/+}. Am auffälligsten war jedoch, dass für *nm3419*^{d/d} eine geringe Restexpression von UCH-L1 mRNA nachweisbar war (Abbildung 6). Noch deutlicher war anhand unserer Methoden der Unterschied zwischen *Uch-l1*^{d/d} - und *gad*^{d/d}-Mäusen. Auch hier war zwar kein intaktes Protein im Western Blot nachweisbar, die Menge an UCH-L1-mRNA unterschied sich jedoch nicht zwischen Wildtyp und *gad*^{d/d}. Letzterer Befund ist dadurch zu erklären, dass der verwendete Primer für eine Amplifizierung der Sequenz von Exon 4 bis 6 konzipiert wurde und diese Sequenzen in *gad*^{d/d} intakt sind und somit auch amplifiziert werden. Anhand unserer Daten und der bestehenden Literatur ist davon auszugehen, dass sowohl *nm3419*^{d/d}- als auch *gad*^{d/d}-Tiere möglicherweise ein trunkiertes UCH-L1-Protein exprimieren könnten, welches nachfolgend möglicherweise vom proteasomalen System degradiert werden würde in einem Prozess, der ER-associated protein degradation (ERAD) genannt wird. Dies ist ein Prozess im ER nachdem synthetisierte Proteine zum weiteren Transport dorthin transferiert wurden. Hierzu ist es notwendig, die Proteine ungefaltet einzubringen und anschließend koordiniert erneut zu falten. Aus diesem Grund enthält das ER zahlreiche Chaperone, welche sehr spezifisch fehlgefaltete Proteine erkennen und für den proteasomalen Abbau nach Rücktransport ins Cytosol markieren (68, 69). Bisher liegen jedoch keine gesicherten Erkenntnisse vor, ob ein solches trunkiertes UCH-L1 existiert und wenn ja, ob es vielleicht sogar den Stoffwechsel beeinflusst.

Wie bereits erwähnt ergaben sich Unterschiede zwischen den Wildtypen der untersuchten Linien. Sowohl auf Proteinebene als auch in der qPCR

exprimieren die Wildtypen von UCH-L1-KO und *nm3419* unterschiedliche Mengen UCH-L1, obwohl diese Tiere als C57BL/6-Mäuse eigentlich vergleichbar sein sollten. Mekada et al. untersuchten systematisch C57BL/6-Mäuse aus unterschiedlichen Quellen auf ihre Vergleichbarkeit hin und konnten ebenfalls zeigen, dass teilweise starke Unterschiede zwischen Sublinien bestehen. Wissenschaftler müssten demnach die Sublinie eines genetischen Hintergrunds stärker berücksichtigen (70). Es ist somit möglich, dass der verwendete genetische Hintergrund relevante Unterschiede aufweist. Dies wurde durch uns jedoch nicht experimentell untersucht.

Weiterhin wuchsen die *nm3419*-Tiere unter möglicherweise anderen Haltungsbedingungen auf als unsere Mäuse. Auch Tötung, Organentnahme und Einfrieren der Proben wurden nicht komplett durch uns durchgeführt. Außerdem konnten uns durch Dr. Hussain (*nm3419*) und Prof. Wada (*gad*) leider nicht ausreichend Tiere für eine statistische Analyse überlassen werden.

Trotz dieser technischen Limitationen versuchten wir einen direkten Vergleich der mTORC1-Aktivität von UCH-L1-KO-Mäusen und *nm3419* und folgten weiter der von Hussain et al. aufgestellten Hypothese einer mTORC1-Überaktivierung durch UCH-L1-Knockout (28).

Dabei verwendeten wir im Folgenden nicht mehr die Phosphorylierung von Akt-T308 als Marker für die mTORC1-Aktivierung, da wir keinen relevanten Unterschied in den oben beschriebenen Vorexperimenten gesehen hatten. Wir verglichen per Western Blot Hirnlysate aus 3 Wochen alten UCH-L1-KO-Mäusen mit Hirnlysaten von ebenfalls 3 Wochen alten *nm3419* Mäusen (Abbildung 8). Dabei untersuchten wir drei verschiedene Targets von mTORC1 sowie auf Phospho-mTOR. Hussain et al. wiesen in ihren Tieren anhand von p-S6K und p-4E-BP eine gesteigerte mTORC1-Aktivität nach (28). Diese Ergebnisse waren von uns mit den von Dr. Hussain zur Verfügung gestellten Proben und unter sehr ähnlichen Versuchsbedingungen nicht zu reproduzieren. Wir konnten keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout der jeweiligen Linie hinsichtlich der Phosphorylierung von S6K und 4E-BP feststellen.

Überraschenderweise zeigten die Wildtypen beider Linien Unterschiede. So war die mTORC1-Aktivität gemessen an unseren Markern bei *nm3419*-Tieren deutlich reduziert gegenüber UCH-L1-KO. Die wahrscheinlichste Erklärung

hierfür sind die bereits diskutierten möglichen Unterschiede des genetischen Hintergrundes. Als wichtigste Limitation des beschriebenen Experimentes ist jedoch die geringe Anzahl an Proben zu nennen. So konnten lediglich je zwei Tiere pro Genotyp miteinander verglichen werden. Eine sichere Aussage oder eine statistische Analyse war somit nicht möglich; weitere Experimente zur Erweiterung der Stichprobe wären nötig.

Bei der Generierung unserer Mäuse wurde die mRNA einer bisher unveröffentlichten UCH-L1-Isoform entdeckt. Bisher ist es nicht gelungen das dazugehörige Protein zu identifizieren und es ist unklar, welche Funktion diese Isoform hätte. Uns interessierte, ob diese Isoform in den *gad*- und *nm3419*-Mäusen nachweisbar ist. In der qPCR war die Isoform in *Uch-11^{d/d}*-Tieren aufgrund der gewählten Knockout Strategie nicht mehr nachweisbar, wohingegen *nm3419*-Mäusen die Isoform unabhängig des Genotyps in starkem Maße exprimierten. Auch hier konnten wir beobachten, dass die Wildtypen von UCH-L1-KO deutlich mehr mRNA der Isoform exprimierten als die der Reihe *nm3419*. *gad^{d/d}* exprimierten die Isoform ebenso, jedoch in geringerer Menge als *Uch-11^{+/+}*-Tiere.

Zusammenfassend exprimieren *Uch-11^{d/d}*-Tiere weder eine UCH-L1 mRNA noch ein Protein. Der Knockout ist so geartet, dass er im Gegensatz zu anderen Linien keine UCH-L1-Isoform mehr exprimiert. Welche Bedeutung die trunkierte mRNA und damit das potenziell vorhandene, trunkierte UCH-L1 Protein in *gad*- und *nm3419*-Mäusen hat, ist unbekannt. Zusätzlich ist der genetische Hintergrund von UCH-L1-KO, *nm3419* und *gad* möglicherweise unterschiedlich. Unsere Experimente zeigten keine Unterschiede bezüglich der mTORC1-Aktivität in drei Wochen alten Hirnen aus UCH-L1-KO und *nm3419*. Eine strukturierte altersabhängige Analyse der mTORC1-Aktivität in *gad* und *nm3419*-Mäusen existiert jedoch bisher nicht und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Insgesamt gehen wir davon aus, dass die Erkenntnisse aus *gad* und *nm3419*-Mäusen unter Berücksichtigung der beschriebenen Limitationen auch auf UCH-L1-KO übertragbar sind.

5.2 *Uch-11^{d/d}*-Tiere weisen im Wesentlichen kein verändertes mono-Ubiquitin-Level auf

Analog zu den spontanen UCH-L1-Mutationen *gad* und *nm3419*, präsentieren *Uch-11^{d/d}*-Tiere ebenfalls einen neurodegenerativen Phänotyp. Wir beobachteten eine Erkrankung, die sich zunächst durch eine sensorische Ataxie mit später aufsteigender, an den Hinterläufen beginnender Lähmung auszeichnete und zu einem verfrühten Tod führte (20, 21, 57). Osaka et al. (2003) erklären diesen Zusammenhang durch ein verringertes Level an mono-Ubiquitin. Diesem folgt eine verringerte Ubiquitinierung, woraus eine erhöhte Menge von Proteinen resultiert, welche hätten abgebaut werden sollen. Solche Aggregate können in der *gad*-Maus in spheroid bodies beobachtet werden (11). *Uch-11^{d/d}*-Tiere zeigen jedoch in den relevanten Altersgruppen bis 5 Wochen keine signifikante Reduktion von mono-Ubiquitin gegenüber dem Wildtyp (Abb. 13). Aufgrund dieser Diskrepanz mit der Literatur untersuchten wir ebenfalls *nm3419* Mäuse, welche uns freundlicherweise durch Dr. Hussain zur Verfügung gestellt wurden. Im Alter von 3 Wochen zeigen auch diese Tiere (bei jedoch nur einem n=2) keinen genotypenabhängigen Unterschied des Monoubiquitin-Levels. (Abbildung. 8) Bisher erfolgte jedoch keine Analyse des Monoubiquitin-Levels über den Altersverlauf von *nm3419* Tieren. Somit können wir nur für Mäuse der Linie UCH-L1-KO davon ausgehen, dass UCH-L1 in jungen Mäusehirnen nicht für die Aufrechterhaltung eines stabilen Mono-Ubiquitin-Levels nötig ist. Erst im Alter von über 12 Wochen lässt sich eine signifikante Reduktion von mono-Ubiquitin in *Uch-11^{d/d}*-Tiere nachweisen. Da eine erste Symptomatik allerdings bereits mit 5-6 Wochen zu beobachten ist, scheint mono-Ubiquitin diesbezüglich keine relevante Rolle zu spielen und erst im Verlauf am ehesten als Folge von Kompensationsmechanismen reduziert zu sein.

5.3 UCH-L1 beeinflusst mTORC1-abhängige Gene in 3 Wochen alten UCH-L1-KO-Mäusen

In der Literatur wird der neurologische Phänotyp UCH-L1-defizienter Mäuse mit einer Dysbalance des Ubiquitin-Proteasomalen-Systems (UPS) als Folge eines alterierten Mono-Ubiquitinlevels erklärt (11, 20). Nachdem mono-Ubiquitin in

den relevanten Altersgruppen in *Uch-11^{d/d}* nicht verändert war, untersuchten wir andere Teile des UPS auf UCH-L1-abhängige Veränderungen. Aus der Literatur ist eine Überaktivierung mTORC1-abhängiger Signalkaskaden bekannt, welche eine Dysbalance des UPS zur Folge haben könnten (28). Wir untersuchten daher auf mRNA-Ebene den Einfluss von UCH-L1 auf bekannte mTORC1-Targets. Dazu wählten wir repräsentative Targets aus dem mitochondrialen Energiestoffwechsel, dem Fettstoffwechsel sowie die zwei Wachstumsfaktoren Hypoxia-inducible factor 1-alpha (*Hif1a*) und Vascular Endothelial Growth Factor A (*Vegfa*) (66). Mit wenigen Ausnahmen zeigte sich für die ausgewählten Targets eine signifikant höhere relative Expression in UCH-L1-defizienten Tieren als im Wildtyp (Abb. 9 und 10). Dies wurde in 3 Wochen alten Tieren gemessen, womit nun der Nachweis einer erhöhten mTORC1-Aktivität in UCH-L1-defizienten Tieren dieser Altersgruppe auf Transkriptebene gelang.

Anders verhielten sich das Sterol regulatory element-binding protein 1 (*Srebf1*) sowie die Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (*Idh3a*), für die wir eine signifikante Reduktion im Knockout beobachteten. Zahlreiche Arbeiten, die den Einfluss der Aktivität von mTORC1 (meist gehemmt durch Rapamycin) auf verschiedene Gene gemessen haben, sowie die Vorbefunde aus den Mäusen der Linie *gad* und *nm3419*, weisen auf eine erhöhte mTORC1-Aktivität bei UCH-L1-Defizienz hin, welche wiederum eine vermehrte Transkription der untersuchten Gene hätte ergeben sollen (47, 65, 66, 71-73).

In Bezug auf *Idh3a* ist dies besonders interessant. Isocitratdehydrogenasen sind seit langem Gegenstand der Forschung und sind sowohl mit Tumor- aber auch neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. So ist IDH3 in Motorneuronen bei Amyotropher Lateralsklerose erhöht, um zu einer verstärkten Verwendung von Fettsäuren zu führen, um den zellulären Energiebedarf zu decken (74). Homozygote Mutationen von *Idh3a* sind mit schwerer epileptischer Encephalopathie in Kindern assoziiert und ein Verlust von *Idh3a* in *Drosophila* führt zu einer eingeschränkten Signalübertragung in Photorezeptoren und neuromuskulären Endplatten (75, 76). Die von uns gemessene erniedrigte Transkription von *Idh3a* könnte somit den Phänotyp von *Uch-11^{d/d}* noch weiter verschlechtern.

Für *Srebf1* hingegen ist eine Assoziation mit Schizophrenie bekannt. So induzieren bestimmte antipsychotische Medikamente in menschlichen Gliazellkulturen eine verstärkte Expression von für die Cholesterol- und Fettsäure-Synthese wichtigen Genen nach Aktivierung durch SREBP, welches durch die Gene *Srebf1* und *Srebf2* kodiert wird (77). Eine weitere Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte bestimmte Polymorphismen von *Srebf1* und *Srebf2* in einer großen europäischen Kohorte mit Schizophrenie assoziieren (78). Ein Zusammenhang von UCH-L1-Defizienz mit neurodegenerativen Erkrankungen über *Idh3a*, *Srebf1* und folglich den Cholesterol- und Fettsäure-Stoffwechsel ist ein neuer Aspekt, der weiterer Forschung bedarf.

5.4 Postnatale *Uch-11^{d/d}*-Mäuse weisen eine gesteigerte Proteinbiosynthese auf

Die bisher diskutierten Experimente konnten zeigen, dass *Uch-11^{d/d}* mit *gad^{d/d}* und *nm3419^{d/d}* vergleichbar ist, einen im Alter von 6 Wochen beginnenden neurodegenerativen Phänotyp entwickeln, dabei keine Veränderung des mono-Ubiquitin-Levels in den relevanten Altersgruppen zeigen und schließlich im Alter von 3 Wochen Hinweise auf eine erhöhte mTORC1-Aktivität zeigen. Ein Mechanismus zur Erklärung des Phänotyps war jedoch noch nicht ausreichend gefunden worden. Chen et. al. (2010) beschrieben eine in 8 Wochen alten UCH-L1-defizienten Mäusen (*tm1Dgen*) eingeschränkte Signalübertragung an neuromuskulären Endplatten. Dabei war besonders die Präsynapse betroffen, welche weniger präsynaptische Vesikel bei gleichzeitiger Akkumulation von tubulovesikalen Strukturen aufwies (79). Die Präsynapse benötigt ein hohes Maß an Proteinbiosynthese zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion. Teile der mTOR-Signalkaskade sind hierbei involviert und kontrollieren die Größe präsynaptischer Endigungen, die Anzahl aktiver Zonen sowie letztlich die synaptische Funktion (80, 81). Wir nahmen daher an, dass es in Abhängigkeit der UCH-L1-Synthese zu einer Dysbalance im mTORC1-Signaling mit daraus folgender, fehlgesteuerter präsynaptischer Proteinsynthese kommen könnte.

Zur Untersuchung dieser Hypothese unterteilten wir die Tiere so, dass eine Gruppe Mäuse vor Beginn der neurologischen Symptomatik enthielt, welche

zwischen 5 und 9 Tage alt waren (P5-9), eine zweite Gruppe die Zeit mit dem Beginn der Symptome umfasste (W3-5), sowie eine letzte Gruppe von über 12 Wochen alten, symptomatischen Mäusen (W12+).

Die Analyse des Zellstoffwechsels von Hirngewebe auf Proteinebene zeigte für *Uch-11^{d/d}* postnatal sowie im Alter von drei Wochen eine erhöhte Proteinbiosynthese gemessen an S6, S6K und 4E-BP (Abb. 11). Diese Ergebnisse konnten in embryonalen Neuronenkulturen reproduziert werden (Abb. 16). *Uch-11^{d/d}* im Alter von über 12 Wochen zeigten hingegen keine relevanten Unterschiede mehr gemessen an S6, S6K und 4E-BP. Passend zu den gemessenen Werten zeigten postnatale *Uch-11^{d/d}*-Mäuse gesteigerte Reflexe, was auf eine UCH-L1-abhängige Beschleunigung der neuromuskulären Entwicklung hindeutet (57). Der neurodegenerative Phänotyp war hingegen nicht direkt hierdurch zu erklären. Wir vermuteten als hierfür ursächlich eine Überlastung kataboler Prozesse.

Aus älteren Studien ist bekannt, dass ein Übermaß von (fehlgefaltetem) Protein im Endoplasmatischen Retikulum (ER) die abbauenden Prozesse überlasten können. Dieser sogenannte „ER-Stress“ kann zur „unfolded protein response“ (UPR) führen, welche bei chronischem Bestehen zur Apoptose führt (82). Dieser Mechanismus ist beispielsweise auch in der pathophysiologischen Entwicklung der Parkinson Erkrankung beschrieben (83) und kann durch die Inhibition von UCH-L1 in SK-N-SH-Zellen (aus menschlichem Neuroblastom) noch verstärkt werden (84). Unsere Daten zeigen insbesondere postnatal eine gesteigerte Proteinbiosynthese in UCH-L1-defizienten Tieren gegenüber Wildtypen. Wir vermuteten daher, dass die Neuronen in *Uch-11^{d/d}*-Tieren einem Übermaß an Protein ausgesetzt sind und somit einem erhöhten ER-Stress. Wir fragten uns daher, ob die Autophagozytose, gemessen an ULK, erhöht sei, um so den erhöhten ER Stress zu kompensieren.

Unsere Experimente zeigten jedoch anhand von ULK eine Reduktion der Autophagozytose. Wir nehmen an, dass dies den vermuteten Mechanismus der UPR sogar noch verstärkt. Dieser Effekt ist ebenfalls altersabhängig und nimmt mit zunehmendem Alter ab (Abb. 12). Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass die Aktivität von ULK nicht nur durch mTORC1 gesteuert wird. So wird ULK im

Laufe der Autophagozythose durch die E3-Ligase NEDD4L spezifisch ubiquitiniert und anschließend über das Proteasom abgebaut. Bei länger andauernder Autophagozythose hingegen wird die ULK-RNA aktiv transkribiert, um anschließend durch mTOR wieder inhibiert zu werden. Auf diese Weise entsteht ein oszillierender Prozess welcher eine schnelle Antwort der Zelle auf wechselnde Stoffwechsellagen erlaubt (85). Die komplexe Regulation von ULK wurde durch uns nicht in Gänze untersucht und bedarf weiterer Experimente, um eine sichere Aussage zu erlauben.

5.5 UCH-L1-Defizienz führt zu einer zunehmenden Überlastung des UPS

Im Weiteren stellten wir uns die Frage, ob die proteasomale Aktivität als Reaktion auf die erhöhte Proteinsynthese verändert sein könnte. Auch wenn diese Methode nicht exakt ist, so wird von einigen Autoren der Gehalt an polyubiquitinierten Proteinen als Maß der Proteasom-Überlastung verwendet. So inhibierten Tan et al. (2008) in ihren Experimenten die Hydrolasefunktion von UCH-L1 mittels des reversiblen Hemmstoffes LDN-57444 und maßen anschließend die Menge an polyubiquitinierten Proteinen als Maß der proteasomalen Überlastung. Sie stellten dabei unter UCH-L1-Inhibition eine Erhöhung der polyubiquitinierten Proteinen in menschlichen Neuroblastom-Zellkulturen fest, was nach Meinung der Autoren darauf hinweist, dass ein erhöhtes Maß an Proteinen durch die Zelle zum Abbau markiert wurde ohne, dass diese abgebaut wurden (84). Dies kann entweder als eine verringerte proteasomale Aktivität interpretiert werden oder als Überlastung eines auf normalem Level arbeitenden proteasomalen Systems durch eine höhere Menge an abzubauenem Protein.

Auch in unseren Experimenten mit genetischem Knockout von UCH-L1 konnten wir für 5-9 Tage alte *Uch-11^{d/d}* zeigen, dass ein erhöhter Gehalt polyubiquitinerter Proteine vorliegt. Folgte man der Argumentation von Tan et al. müsste von einer Überlastung des Proteasoms im jungen Alter ausgegangen werden, welche sich im Alter normalisiert. Diese Interpretation ist jedoch sehr kritisch zu sehen, da sie der Komplexität des Ubiquitin-Systems nicht gerecht wird. Wir wissen, dass insbesondere an Lysin 48 verzweigte

Polyubiquitinketten aber auch Lys11-, Lys29-, und Lys63-verzweigte Ketten wichtige Rollen im Proteasomalen Abbau haben. Über die Topologie des Polyubiquitins hinaus haben aber auch die Umstände der ligierenden Reaktion, dessen Reversibilität oder die Lokalisation von Enzym und Substrat eine Rolle in der Festlegung der Funktion der Ubiquitinierung (86). Eine Ubiquitinierung steuert nicht nur abbauende Prozesse, sondern auch zahlreiche andere Signaltransduktionswege. Inzwischen wird angenommen, dass durch Ubiquitinierung gesteuerte Prozesse ein der Phosphorylierung ähnliches Maß an Komplexität aufweisen (5).

Aus diesem Grund wurden durch die Arbeitsgruppe weitere Experimente durchgeführt. So konnte über den „GFP degron mouse reporter“, einem System welches entwickelt wurde um die Funktionalität des UPS als Ganzes zu betrachten, ein gesteigerter proteasomaler Abbau in 3-5 Wochen alten *Uch-11^{ddl}* bei signifikant geringerem Abbau in 20 Wochen alten Tieren beobachtet werden. Diese Daten konnten mittels einer chymotypsin-like Aktivitätsmessung des Proteasoms noch weiter untermauert werden (57). Insgesamt gehen wir daher von einer mit dem Alter zunehmenden Überlastung des UPS aus.

Wir sahen insgesamt eine mit dem Alter zunehmende Reduktion der proteasomalen Aktivität mit Akkumulation polyubiquitinerter Proteine. Aufgrund der hohen Energieanforderungen sowohl der Proteinbiosynthese als auch der abbauenden Prozesse, ist von einer zunehmenden Energieschuld der Zelle auszugehen. Man kann vermuten, dass insbesondere Motoneuronen aufgrund ihres sehr energieaufwändigen Stoffwechsels besonders vulnerabel sind und daher zuerst betroffen sind.

5.6 Der mTORC1-Inhibitor Rapamycin verbessert den neurodegenerativen Phänotyp.

Um unsere These weiter zu unterstützen führten wir Rescue-Experimente durch, in denen wir UCH-L1-defizienten Mäuse die ersten 5 postnatalen Tage mit Rapamycin, einem mTORC1-Inhibitor, behandelten. Wir konnten sehen, dass sich die mTORC1-Aktivität gemessen an pS6K, S6, und ULK signifikant senken ließ und nach Gabe von Rapamycin kein Unterschied zwischen *Uch-*

I1^{d/d} und Wildtyp mehr messbar war. Homozygote UCH-L1-KO-Mäuse die für die ersten 5 Lebenstage mit Rapamycin behandelt wurden, zeigten in Experimenten unserer Arbeitsgruppe zudem nach Einsetzen der Symptome im Alter von 16 Wochen einen deutlich milderen neurologischen Phänotyp, während heterozygote Tiere keinen messbaren Unterschied gegenüber Wildtypen mehr aufwiesen. Dies wurde unter anderem mittels Rotarod-Leistungstest gemessen, einem Test bei dem sich die Mäuse auf einer beschleunigenden Rolle halten müssen und so bei eingeschränkter neuromotorischer Funktion schlechter abschneiden (57).

Wir sahen hier also durch Rapamycin-Therapie eine parallele Verbesserung des Phänotyps sowie der biochemischen Veränderungen auf Zellebene.

Wir vermuteten zusammen mit einer Verbesserung des Phänotyps und der Proteinsynthese auch einen entsprechenden Rückgang des Polyubiquitins in mit Rapamycin behandelten *Uch-11^{d/d}*. Diese These findet in der Literatur Unterstützung. Zhao et al. konnten 2015 zeigen, dass die Inhibition von mTOR mittels Rapamycin zu einem erhöhten Gehalt an polyubiquitinierten Proteinen in Mäuselebern führt (53). Eine weitere Studie an MEF-Zellen (mouse embryonic fibroblasts) erbrachte zusätzlich den Nachweis einer Überaktivierung des UPS durch eine genetische oder physiologische Aktivierung von mTORC1. In dieser Studie wurden allerdings nicht polyubiquitinierte Proteine gemessen, sondern die Expression von Bestandteilen des Proteasoms (55).

Überraschenderweise sahen wir jedoch keine Reduktion des Polyubiquitins durch Rapamycin. Vielmehr konnte für alle Altersgruppen und Genotypen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Rapamycintherapie gemessen werden. Die oben diskutierten genotypenabhängigen Effekte blieben erhalten (Abb. 15). In den Experimenten von Zhao et al. war die Rapamycin-Therapie für zwei Stunden vor Organentnahme durchgeführt worden, während wir 5 Tage therapiert hatten (53). Langzeiteffekte könnten somit eine unvorhergesehene Rolle gespielt haben. Es wurde daher in der Arbeitsgruppe erneut ein Chymotrypsin Assay direkt nach Beendigung der Rapamycin-Therapie durchgeführt. Dieser zeigte eine verringerte Aktivität des Proteasoms. Zusätzlich wurden immunhistochemisch Ubiquitin-Aggregate im Kleinhirn

gezählt. Diese waren in Uch-11^{d/d} zahlreich, in Uch-11^{d/+} etwa halb so viel und in Wildtyptieren nicht nachweisbar. Durch die Behandlung mit Rapamycin waren die Aggregate signifikant zu senken (57). Wir gingen daher auch von einer Reduktion der UPS-Überlastung durch Rapamycin aus. Poly-Ubiquitin alleine muss als zu ungenau angesehen werden, um die Funktion des UPS zu bewerten.

6. Zusammenfassung

Die Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1) ist ein deubiquitinierendes Enzym, welches einen wichtigen Bestandteil des neuronalen Ubiquitin-Systems darstellt und bis zu 5% des gesamtlöslichen Proteins im Hirn ausmacht (16). Des Weiteren spielt UCH-L1 eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen, bestimmten Nierenerkrankungen und ist mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson oder der Lewy-Körperchen-Demenz assoziiert (14, 17, 19). Bekannte UCH-L1-defiziente Mäuse entwickeln ab der 6. Lebenswoche eine neurodegenerative Erkrankung und versterben früh im Alter von ca. 25 Wochen. Die spontanen Mutanten „*gad*“ und „*nm3419*“ exprimieren im Hirn dabei trunkierte UCH-L1-Transkripte (20), (21). UCH-L1-defiziente Tiere zeigen einen reduzierten Gehalt an Monoubiquitin und eine Überaktivierung von mTORC1 bei Unterdrückung von mTORC2 (28). Der exakte Mechanismus hinter dieser Beeinflussung von mTORC 1 und 2 ist unbekannt. Für diese Arbeit wurden konstitutive Knock-out Mäuse verwendet (UCH-L1-KO), die durch Deletion der Promotorregion bis Exon 3 keinerlei UCH-L1 Transkript oder Protein mehr exprimieren. Die Arbeit sollte die Frage beantworten, auf welche Weise UCH-L1 den Proteinumsatz in Neuronen beeinflusst und welche Bedeutung dies für die Neurodegeneration im UCH-L1-Knockout hat.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine UCH-L1-Defizienz zu einer erhöhten mTORC1-abhängigen Proteinsynthese bei gleichzeitig reduzierter Autophagozytose und überlastetem Ubiquitin-Proteasomalen-System (UPS) führt. Diese Kombination führt zu ER-Stress, welcher nach einiger Zeit nicht mehr kompensiert werden kann und vermutlich eine „unfolded protein response“ (UPR) auslöst, welche letztlich zur klinischen Symptomatik führt. Veränderungen in der Proteinbiosynthese, dem Fettstoffwechsel sowie der

Autophagozytose und dem Ubiquitin-Proteasomalen System sind dabei bereits vor Beginn der Symptomatik messbar. Das Level an mono-Ubiquitin ist hingegen in präsymptomatischen *Uch-L1^{d/d}* nicht verändert. Dies deutet auf eine frühe Beeinflussung der neuronalen Entwicklung durch UCH-L1 hin, welche zum einen bei heterozygoten Tieren schwächer ausfällt und zum anderen durch Rapamycin behandelt werden kann. Letzteres bietet die Möglichkeit eines individuellen Heilversuchs der von Bilguvar et al. beschriebenen Familie mit Neurodegeneration und Punktmutation des UCH-L1-Gens (15). Möglichweise lassen sich jedoch auch spezifische Zeitfenster finden, in denen eine prophylaktische Therapie zur Vorbeugung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer möglich ist. Zusätzlich bietet die Bedeutung von UCH-L1 für den Fettstoffwechsel in neurodegenerativen Erkrankungen interessante Fragen für zukünftige Forschung.

Abstract

Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is a deubiquitinating enzyme which is predominantly expressed in the brain where it represents up to 5% of total soluble protein and takes a crucial part in the neuronal ubiquitin system (16). It is known for its role in tumour metabolism, specific kidney diseases and several neurodegenerative illnesses like Parkinson's disease or Lewy body dementia (14, 17, 19). The spontaneous UCH-L1 mutants *gad* and *nm3419* develop a neurodegenerative disease at the age of 6 weeks leading to death with approximately 25 weeks of age. Those mutants express a truncated UCH-L1 and show a reduced level of mono ubiquitin(20, 21).In *nm3419* UCH-L1 deficiency leads to an overactivated mTORC1 while mTORC2 is suppressed (28). The underlying mechanism is unknown. For this work we used a new mouse model of UCH-L1-deficiency deleting the promotor region up to exon 3 leading to a complete loss of any UCH-L1 transcript or protein. Our goal was to examine how UCH-L1 interacts with the protein metabolism in neurons and how this would affect the neurodegeneration.

The results show that UCH-L1-deficiency leads to an increased mTORC-1 dependent protein synthesis with impaired function of both autophagy and ubiquitin-proteasomal-system (UPS). This induces ER-stress leading to an unfolded protein response (UPR) ending in neurodegeneration. Markers of

protein-synthesis, autophagy and UPS are already changed in pre symptomatic *Uch-11^{d/d}* while there are no changes in the monoubiquitin level pointing towards an early importance of UCH-L1 for neuronal development. The impact of UCH-L1 on neurodegeneration is level-dependent since *Uch-11^{d/+}* showed less symptoms. Strikingly, treatment with rapamycin ameliorated the neurodegenerative phenotype in *Uch-11^{d/d}* and *Uch-11^{d/+}*. This could lead to a possible treatment of patients with neurodegeneration and mutation of UCH-L1. In addition, future research could determine specific time-points for preventive treatment of neurodegenerative illnesses. Also of note, UCH-L1 seems to have a role in the lipid-metabolism which opens new questions for future research.

7. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	<i>4E-bindendes-Protein</i>
Akt	<i>Proteinkinase B</i>
AMP	<i>Adenosinmonophosphat</i>
AMPK	<i>AMP activated protein kinase</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
ATP5G1	<i>ATP synthase lipid-binding protein (mitochondrial)</i>
CAD	<i>Carbamoyl-phosphate synthetase</i>
COX5A	<i>Cytochrome c oxidase subunit 5a</i>
CUL4A	<i>Cullin-4A</i>
DDB1	<i>DNA damage-binding protein 1</i>
DEPTOR	<i>DEP domain containing mTOR interacting protein</i>
DUBs	<i>Deubiquitinierende Proteine</i>
EJC	<i>Exon-Junction-Complex</i>
Eppi	<i>Eppendorf Reaktionsgefäß</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
FASN	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FKBP12	<i>FK506 binding protein 12</i>
gad	<i>Gracile axonal dystrophy</i>
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
IDH3A	<i>Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha</i>
mLST8	<i>Mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
MTHFD2	<i>Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2</i>
mTORC1	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1</i>
NADPH	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
PIC	<i>Translations-Preinitiations-Komplex</i>
PRAS40	<i>Proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
Raptor	<i>Regulatory protein associated with mTOR</i>
Rictor	<i>Rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
RNA	<i>Ribonucleinacid</i>
S6K	<i>S6-Kinase</i>
S6K	<i>p70-S6-Kinase</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SKAR	<i>S6K1 Aly/REF-like substrate</i>
SREBF1	<i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i>
SREBP	<i>Sterol responsive element binding protein</i>
TFEB	<i>Transkriptionsfaktor EB</i>
UCH-L1	<i>Ubiquitin-C-terminal-Hydrolase 1</i>
ULK1	<i>UNC-51-like kinase 1</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
UPS	<i>Ubiquitin-Proteasom-System</i>
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

8. Verzeichnis von Abbildungen und Tabellen

Abb.	Titel	Seite
1	Funktion von mTORC1 (Schema)	6
2	Signalkaskade von mTORC1	7
3	Cre/loxP-System und Erzeugung von UCH-L1-KO-Mäusen	14
4	Verschiedene UCH-L1-Mutationen im Vergleich	16
5	3 Wochen alte Uch-I1 ^{d/d} -Mäuse zeigen keine Unterschiede in Hirngewebe hinsichtlich der Akt-Aktivität gegenüber Wildtyp Geschwistertieren.	23
6	Vergleichende Darstellung der Expression von UCH-L1 in unterschiedlichen Mausmodellen	24
7	nm3419- und gad-Mäuse exprimieren eine UCH-L1-Isoform	25
8	UCH-L1-KO-Tiere und nm3419-Mäuse zeigen ein unterschiedliches Verhalten mTOR-abhängiger Marker	26
9	Uch-I1 ^{d/d} -Tiere weisen gegenüber Wildtyptieren einen gesteigerten mitochondrialen Energiestoffwechsel auf.	28
10	Uch-I1 ^{d/d} -Tiere weisen gegenüber Wildtyptieren einen veränderten Fett-Stoffwechsel und Wachstumsfaktor Transkript Gehalt auf	29
11	Die Aktivierung von Schlüsselenzymen, die die Proteinsynthese aktivieren, ist in Hirnen UCH-L1-defizienter Mäuse postnatal erhöht	31
12	Postnatale Uch-I1 ^{d/d} Hirne weisen eine erhöhte Phosphorylierung von ULK auf	32
13	Der Monoubiquitin Gehalt ist zu post- aber nicht zu präsymptomatischen Zeitpunkten reduziert. Poly-ubiquitinierte Proteine verhalten sich umgekehrt.	33
14	Rapamycin senkt die mTOR-Aktivität und hebt die Unterschiede zwischen den Genotypen auf	35
15	Rapamycin hat keine Auswirkung auf den Gehalt polyubiquitinerter Proteine oder an Monoubiquitin	36
16	UCH-L1-defiziente Neuronen zeigen eine stärkere mTOR-abhängige Phosphorylierung downstream gelegener Targets.	37
Tbb.	Titel	Seite
1	Primärantikörper	12
2	Sekundärantikörper	12
3	Gängige Puffer und Ansätze	13
4	Spezifikationen der Gele für Western Blot	19
5	Inkubationsplan für Western Blot	20
6	Primer für qPCR	21

9. Literaturverzeichnis

1. D. Komander, M. J. Clague, S. Urbe, Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 550-563 (2009).
2. T. Ravid, M. Hochstrasser, Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 679-690 (2008).
3. H. Barriere, C. Nemes, K. Du, G. L. Lukacs, Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol Biol Cell* **18**, 3952-3965 (2007).
4. R. L. Williams, S. Urbe, The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 355-368 (2007).
5. R. L. Welchman, C. Gordon, R. J. Mayer, Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 599-609 (2005).
6. P. Bishop, D. Rocca, J. M. Henley, Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J* **473**, 2453-2462 (2016).
7. C. N. Larsen, B. A. Krantz, K. D. Wilkinson, Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* **37**, 3358-3368 (1998).
8. J. S. Bett *et al.*, Ubiquitin C-terminal hydrolases cleave isopeptide- and peptide-linked ubiquitin from structured proteins but do not edit ubiquitin homopolymers. *Biochem J* **466**, 489-498 (2015).
9. S. S. Wing, Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* **35**, 590-605 (2003).
10. M. S. Ritorto *et al.*, Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature communications* **5**, 4763 (2014).
11. H. Osaka, Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Human Molecular Genetics* **12**, 1945-1958 (2003).
12. E. Kyratzi, M. Pavlaki, L. Stefanis, The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells. *Hum Mol Genet* **17**, 2160-2171 (2008).

13. R. S. Takala *et al.*, Glial Fibrillary Acidic Protein and Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 as Outcome Predictors in Traumatic Brain Injury. *World neurosurgery* **87**, 8-20 (2016).
14. Y. Liu, L. Fallon, H. A. Lashuel, Z. Liu, P. T. Lansbury, Jr., The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* **111**, 209-218 (2002).
15. K. Bilguvar *et al.*, Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3489-3494 (2013).
16. I. N. Day, R. J. Thompson, UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol* **90**, 327-362 (2010).
17. Y. Miyoshi *et al.*, High expression of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 and -L3 mRNA predicts early recurrence in patients with invasive breast cancer. *Cancer Sci* **97**, 523-529 (2006).
18. J. E. Olerud, D. S. Chiu, M. L. Usui, N. S. Gibran, J. C. Ansel, Protein gene product 9.5 is expressed by fibroblasts in human cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* **111**, 565-572 (1998).
19. C. Meyer-Schwesinger *et al.*, A new role for the neuronal ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) in podocyte process formation and podocyte injury in human glomerulopathies. *The Journal of pathology* **217**, 452-464 (2009).
20. K. Saigoh *et al.*, Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* **23**, 47-51 (1999).
21. B. J. Walters *et al.*, Differential effects of Usp14 and Uch-L1 on the ubiquitin proteasome system and synaptic activity. *Mol Cell Neurosci* **39**, 539-548 (2008).
22. J. H. Jara *et al.*, Corticospinal Motor Neurons Are Susceptible to Increased ER Stress and Display Profound Degeneration in the Absence of UCHL1 Function. *Cereb Cortex* **25**, 4259-4272 (2015).
23. S. Hussain *et al.*, UCH-L1 bypasses mTOR to promote protein biosynthesis and is required for MYC driven lymphomagenesis in mice. *Blood* 10.1182/blood-2018-05-848515 (2018).

24. P. B. Tran, R. J. Miller, Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power? *Trends Neurosci* **22**, 194-197 (1999).
25. J. Choi *et al.*, Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* **279**, 13256-13264 (2004).
26. S. Nagamine *et al.*, Deficiency of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) leads to vulnerability to lipid peroxidation. *Neurochem Int* **57**, 102-110 (2010).
27. S. Hussain *et al.*, The de-ubiquitinase UCH-L1 is an oncogene that drives the development of lymphoma in vivo by deregulating PHLPP1 and Akt signaling. *Leukemia* **24**, 1641-1655 (2010).
28. S. Hussain *et al.*, Ubiquitin hydrolase UCH-L1 destabilizes mTOR complex 1 by antagonizing DDB1-CUL4-mediated ubiquitination of raptor. *Mol Cell Biol* **33**, 1188-1197 (2013).
29. J. Li, S. G. Kim, J. Blenis, Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* **19**, 373-379 (2014).
30. J. Chung, C. J. Kuo, G. R. Crabtree, J. Blenis, Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* **69**, 1227-1236 (1992).
31. C. J. Sabers *et al.*, Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* **270**, 815-822 (1995).
32. D. H. Kim *et al.*, mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163-175 (2002).
33. D. H. Kim *et al.*, GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* **11**, 895-904 (2003).
34. K. Hara *et al.*, Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**, 177-189 (2002).
35. L. Wang, T. E. Harris, R. A. Roth, J. C. Lawrence, Jr., PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* **282**, 20036-20044 (2007).

36. T. R. Peterson *et al.*, DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**, 873-886 (2009).
37. D. D. Sarbassov *et al.*, Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**, 1296-1302 (2004).
38. D. D. Sarbassov *et al.*, Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* **22**, 159-168 (2006).
39. R. A. Saxton, D. M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960-976 (2017).
40. D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101 (2005).
41. S. Sengupta, T. R. Peterson, D. M. Sabatini, Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* **40**, 310-322 (2010).
42. M. Saitoh *et al.*, Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem* **277**, 20104-20112 (2002).
43. M. K. Holz, B. A. Ballif, S. P. Gygi, J. Blenis, mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**, 569-580 (2005).
44. N. V. Dorrello *et al.*, S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* **314**, 467-471 (2006).
45. X. M. Ma, S. O. Yoon, C. J. Richardson, K. Julich, J. Blenis, SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* **133**, 303-313 (2008).
46. T. R. Peterson *et al.*, mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* **146**, 408-420 (2011).
47. K. Düvel *et al.*, Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. **39**, 171-183 (2010).

48. I. Ben-Sahra, J. J. Howell, J. M. Asara, B. D. Manning, Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* **339**, 1323-1328 (2013).
49. I. Ben-Sahra, G. Hoxhaj, S. J. H. Ricoult, J. M. Asara, B. D. Manning, mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science* **351**, 728-733 (2016).
50. C. He, D. J. Klionsky, Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93 (2009).
51. J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, K. L. Guan, AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141 (2011).
52. J. A. Martina, Y. Chen, M. Gucek, R. Puertollano, MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903-914 (2012).
53. J. Zhao, B. Zhai, S. P. Gygi, A. L. Goldberg, mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 15790-15797 (2015).
54. A. Rousseau, A. Bertolotti, An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* **536**, 184 (2016).
55. Y. Zhang *et al.*, Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature* **513**, 440 (2014).
56. P. Ghosh, M. Wu, H. Zhang, H. Sun, mTORC1 signaling requires proteasomal function and the involvement of CUL4-DDB1 ubiquitin E3 ligase. *Cell Cycle* **7**, 373-381 (2008).
57. A. T. Reinicke *et al.*, Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) loss causes neurodegeneration by altering protein turnover in the first postnatal weeks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 7963-7972 (2019).
58. M. A. McLellan, N. A. Rosenthal, A. R. Pinto, Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol* **7**, 1-12 (2017).
59. J. Renart, J. Reiser, G. R. Stark, Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3116-3120 (1979).

60. B. Holzapfel, L. Wickert, Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. **37**, 120-126 (2007).
61. MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin® RNA: User manual. (2015).
62. A. Biosystems, StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Reagent Guide. (2010).
63. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
64. M. P. Abramoff M, Ram SJ, Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42 (2004).
65. J. T. Cunningham *et al.*, mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* **450**, 736 (2007).
66. M. Laplante, D. M. Sabatini, Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* **126**, 1713-1719 (2013).
67. M. Rosner, N. Siegel, A. Valli, C. Fuchs, M. Hengstschlager, mTOR phosphorylated at S2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids* **38**, 223-228 (2010).
68. E. D. Werner, J. L. Brodsky, A. A. McCracken, Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13797-13801 (1996).
69. L. Lemus, V. Goder, Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin. *Cells* **3**, 824-847 (2014).
70. K. Mekada *et al.*, Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim* **58**, 141-149 (2009).
71. H. F. Xu *et al.*, Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)c promoter: Characterization and transcriptional regulation by mature SREBP-1 and liver X receptor alpha in goat mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* **99**, 1595-1604 (2016).
72. Y. Wei, Y. J. Zhang, Y. Cai, M. H. Xu, The role of mitochondria in mTOR-regulated longevity. *Biol Rev Camb Philos Soc* **90**, 167-181 (2015).
73. I. Bakan, M. Laplante, Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Curr Opin Lipidol* **23**, 226-234 (2012).

74. M. Szelechowski *et al.*, Metabolic Reprogramming in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific reports* **8**, 3953 (2018).
75. A. Fattal-Valevski *et al.*, Homozygous mutation, p.Pro304His, in IDH3A, encoding isocitrate dehydrogenase subunit is associated with severe encephalopathy in infancy. *Neurogenetics* **18**, 57-61 (2017).
76. B. Ugur *et al.*, The Krebs Cycle Enzyme Isocitrate Dehydrogenase 3A Couples Mitochondrial Metabolism to Synaptic Transmission. *Cell Rep* **21**, 3794-3806 (2017).
77. J. Fernø *et al.*, Antipsychotic drugs activate SREBP-regulated expression of lipid biosynthetic genes in cultured human glioma cells: a novel mechanism of action? *Pharmacogenomics J* **5**, 298-304 (2005).
78. S. Le Hellard *et al.*, Polymorphisms in SREBF1 and SREBF2, two antipsychotic-activated transcription factors controlling cellular lipogenesis, are associated with schizophrenia in German and Scandinavian samples. *Mol Psychiatry* **15**, 463-472 (2010).
79. F. Chen, Y. Sugiura, K. G. Myers, Y. Liu, W. Lin, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 is required for maintaining the structure and function of the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1636-1641 (2010).
80. S. D. Speese, N. Trotta, C. K. Rodesch, B. Aravamudan, K. Broadie, The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Curr Biol* **13**, 899-910 (2003).
81. L. Cheng, C. Locke, G. W. Davis, S6 kinase localizes to the presynaptic active zone and functions with PDK1 to control synapse development. *J Cell Biol* **194**, 921-935 (2011).
82. C. Xu, B. Bailly-Maitre, J. C. Reed, Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2656-2664 (2005).
83. Y. Imai *et al.*, An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891-902 (2001).
84. Y. Y. Tan, H. Y. Zhou, Z. Q. Wang, S. D. Chen, Endoplasmic reticulum stress contributes to the cell death induced by UCH-L1 inhibitor. *Mol Cell Biochem* **318**, 109-115 (2008).

85. F. Nazio, F. Cecconi, Autophagy up and down by outsmarting the incredible ULK. *Autophagy* **13**, 967-968 (2017).
86. D. Komander, M. Rape, The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**, 203-229 (2012).

10. Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Catherine Meyer-Schwesinger, welche in Ihrer Funktion als Betreuerin und Doktormutter diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Neben der essenziellen Bereitstellung der Ressourcen ihrer Arbeitsgruppe, möchte ich mich vor allem für einen ausgesprochen freundlichen Umgang, für viel Geduld und motivierende Gespräche bedanken.

Ich danke außerdem der technischen Assistenz unserer Arbeitsgruppe. Hierbei möchte ich mich besonders bei Frau Marlies Sachs bedanken, die für Fragen stets ein offenes Ohr hatte, half wo es notwendig war und darüber hinaus die „gute Seele“ des Labors verkörperte. Insgesamt bedanke ich mich für eine sehr schöne Atmosphäre im Labor die nicht zuletzt meinen Mitdoktoranden Julia, Karoline und Malte zu verdanken war.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und Geschwistern. Während dieser langwierigen Arbeit wart ihr in allen Tiefen und Höhen, die diese Zeit mir bereitet hat, für mich da. Ohne euch wäre ich sicher nicht nur an dieser Arbeit gescheitert! Danke, dass ihr zu mir gehalten habt.

11. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 Jahr des 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.

Unterschrift: