

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. Guido Posern)

Generierung monoklonaler Antikörper gegen das Protein CLN6

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Thomas Cramer

Geboren am 05.07.1982 in Potsdam-Babelsberg

Gutachter:

Prof. Dr. T. Hollemann

Univ. - Prof. Dr. P. Fornara

Prof. B. Wiederanders (Jena)

12.07.2016

23.05.2017

REFERAT

Neuronale Ceroid Lipofuszinosen NCL/CLN sind neurodegenerative, hereditäre Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter, welche durch Mutationen in CLN-Proteinen ausgelöst werden (Jalanko und Baulke, 2009). Es kommt bei den Patienten zur intrazellulären Ablagerung des Lipoproteins Lipofuszin. Die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen werden zu den Speicherkrankheiten gezählt.

Die Funktionen der meisten CLN-Proteine sind nicht bekannt. Lediglich bei CLN1 und bei CLN2 konnten Funktionseinschränkungen der Enzyme Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1) und Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP 1) als Erkrankungsursache identifiziert werden.

Das CLN6-Protein (MM 35kDa) ist als Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums identifiziert worden und besteht aus 311AS (Heine *et al.*, 2004, 2007). Es kodiert auf dem langen Arm des Chromosoms 15q21-23 und (Gao *et al.*, 2002 Wheeler *et al.*, 2002). Es löst die Indisch-Iberische Variante der juvenilen NCL aus (Sharp, *et al.*, 1997). Histologisch weisen die Zellen in der Elektronenmikroskopie die pathognomonischen intrazellulären Lipofuszineinschlüsse in gemischter Konfiguration auf (Sharp *et al.*, 1999, Gao *et al.*, 2002). Es wird über eine Beteiligung des CLN6-Proteins an den Wachstumsvorgängen im Dorsal Root Ganglion diskutiert (Liu & Strittmatter, 2001; Charrier *et al.*, 2003; Schmidt & Strittmatter, 2007; Hou *et al.*, 2008; Benedict *et al.*, 2009). Aber möglicherweise hat das CLN6-Protein auch eine Funktion im Rahmen der Mikrotubuli-Ausprägung oder des intrazellulären Transports von Zellorganellen unter Beteiligung von Kinesin I (Fukata *et al.*, 2002). Die genaue Funktion von CLN6 konnte bisher aber nicht geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische monoklonale Anti-CLN6-Antikörper generiert. Dafür wurden Peptide von CLN6-Aminosäuresequenzen synthetisiert, welche außerhalb der ER-Membran liegen. Aus Milzzellen einer immunisierten Maus konnten durch Fusion mit Myelomzellen Hybridome generiert werden - darunter die Antikörper-produzierenden Klone 1D10, 2B2, 3A10 und 4D7. Die Antikörper detektierten rekombinantes CLN6. In der Immunfluoreszenz konnte in der Mamma-Ca-Zelllinie SkBr3 die Kollokalisierung von CLN6 und der ER-spezifischen Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) nachgewiesen werden. In der Immunhistologie wurde CLN6 auf Proteinebene spezifisch in sekretorischen Zellen im Bereich des Magen-Corpus und in humanem Mamma-Gewebe, sowie in Leber, Niere und Skelettmuskel angefärbt. Die dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen die erfolgreiche Generierung von monoklonalen Anti-CLN6-Antikörpern. Diese Antikörper können für Untersuchungen genutzt werden, um Funktionen von CLN6 aufzuklären.

Cramer, Thomas: Generierung monoklonaler Antikörper gegen das Protein CLN6; Halle/Saale, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, 66 Seiten, 2016.

INHALTSVERZEICHNIS

TITELBLATT

REFERAT II

INHALTSVERZEICHNIS III

VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN V

1. EINLEITUNG 1

1.1 NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN 1

1.2 NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN (NCL/CLN) 1

1.2.1 KLINISCHER VERLAUF 3

1.2.2 CLN-ASSOZIIERTE PROTEINE 4

1.3 INFANTILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN 4

1.3.1 CLN1 - INFANTILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN
(HABERG-SANTAVUORI-DISEASE) 4

1.4 SPÄTINFANTILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN 6

1.4.1 CLN2 - KLASSISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN
NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOLEN 61.4.2 CLN5 - FINNISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN
NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN 71.4.3 CLN6 - INDISCH-IBERISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN
NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOLEN 71.4.4 CLN7 - TÜRKISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN
NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOLEN 10

1.5 JUVENILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN 11

1.5.1 CLN3-ASSOZIIERTE JUVENILE NEURONALE CEROID
LIPOFUSZINOLEN (*BATTEN DISEASE*) 111.6 WEITERE FORMEN DER NEURONALEN CEROID
LIPOFUSZINOLEN 121.6.1 CLN4 - ADULTE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN
(*KUFS DISEASE*) 12

1.6.2 CLN10 - KONGENITALE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN 13

1.6.3 WEITERE VARIANTEN DER NEURONALEN CEROID
LIPOFUSZINOLEN 13

1.7 DIAGNOSTIK UND ETABLIERTE THERAPIEKONZEPTE 13

2. ZIELSTELLUNG 15**3. MATERIAL UND METHODEN 16**

3.1 MATERIALIEN 16

3.1.1 CHEMIKALIEN 16

3.1.2 SONSTIGE MATERIALIEN 17

3.1.3 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR 18

3.1.4 ZELLINIEN 18

3.1.5 PRIMÄRE ANTIKÖRPER 18

3.1.6 PROTEINE UND PEPTIDE 20

3.2. GENERIERUNG MURINER MONOKLONALER ANTIKÖRPER 20

3.2.1 PRINZIP DER GENERIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER
UND SELEKTION VON HYBRIDOMZELLEN 20

3.2.2 ANTIGEN 20

3.2.3 TIERE UND TIERHALTUNG 20

3.2.4 IMMUNISIERUNG 21

3.2.5 GEWINNUNG VON FEEDERZELLEN 22

3.2.6 FUSION 22

3.2.7 KLONIERUNG UND NOMENKLATUR 25

3.3 KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON ZELLINIEN 26

3.3.1 KULTIVIERUNG VON HYBRIDOMZELLEN UND TUMORZELLEN 26

3.3.2 KRYOKONSERVIERUNG 26

3.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	26
3.4.1	ANTIKÖRPER-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	26
3.4.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	27
3.4.3	ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	27
3.4.4	SDS-PAGE	28
3.4.5	NUPAGE®-GEL-SYSTEM	29
3.4.6	IMMUNOBLOT-ANALYSE	29
3.5	IMMUNZYTLOGIE	30
3.6	IMMUNHISTOLOGIE	30
3.6.1	IMMUNHISTOLOGISCHES VERFAHREN	30
3.6.2	AUSWAHL DER PRÄPARATE	31
3.6.3	ABLAUF DER IMMUNHISTOLOGIE	32
3.7	METHODEN DES ZELLAUFSCHLUSSES	32
3.7.1	ZELLAUFSCHLUSS MIT LYSIS-PUFFER	32
3.7.2	ZELLAUFSCHLUSS MIT DIGITONIN	32
4.	ERGEBNISSE	34
4.1	AUSWAHL DER PEPTIDE FÜR DIE IMMUNISIERUNG	34
4.2	MONOKLONALE ANTI-CLN6-ANTIKÖRPER	34
4.3	FUNKTIONSNACHWEISE DER ANTI-CLN6-ANTIKÖRPER	35
4.3.1	FUNKTIONSNACHWEIS IM ELISA	35
4.3.2	IMMUNOBLOTANALYSE	35
4.3.3	REAKTION MIT REKOMBINANTEM CLN6	36
4.3.4	IMMUNFLUORESCENZ-NACHWEIS VON CLN6	37
4.3.5	IMMUNHISTOLOGIE	39
4.3.6	NACHWEIS VON CLN6 IN DER IMMUNHISTOLOGIE	41
5.	DISKUSSION	43
5.1	ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES CLN6	43
5.2	GEWINNUNG SPEZIFISCHER MONOKLONALER ANTI-CLN6 ANTIKÖRPER	43
5.3	SPEZIFITÄT MONOKLONALER ANTI-CLN6-ANTIKÖRPER	44
5.4	IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CLN6	45
5.4.1	IMMUNZYTOCHEMIE MIT ZELLEN DER TUMORZELLINIE SKBR3	45
5.5	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CLN6	45
5.5.1	IMMUNHISTOLOGIE DER LEBER	46
5.5.2	IMMUNHISTOLOGIE DER NIERE	46
5.5.3	IMMUNHISTOLOGIE DES SKELETTMUSKELS	48
5.5.4	IMMUNHISTOLOGIE DES MAGENS	49
5.5.5	IMMUNHISTOLOGIE DER MAMMA	50
5.5.6	IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN WEITERER ORGANE	50
5.6	AUSBLICK	52
6.	ZUSAMMENFASSUNG	53
7.	LITERATURVERZEICHNIS	55
8.	THESEN	66
	LEBENS LAUF	
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	
	ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE	
	DANKSAGUNG	

VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

μ	mikro (1x10 ⁻⁶)
μL	Mikroliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
COS-Zellen	immortalisierte Nierenzellen der grünen Meerkatze
Da	Dalton
DAB	Di-Amino-Benzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMPR	Epilepsy With Progressive Mental Retardation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
FKS	Fetales Kälber-Serum
Fc	Fragment crystallizable
Gl.	Glandula
GST	Glutathion S-Transferase
GRODS	granuläre osmiophile Einlagerungen
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HT	Hypoxanthin-Thymidin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor Typ 2
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
IK	Immunkomplex
IFA	Inkomplettes Freund's Adjuvans
INCL	Infantile Neuronale Lipofuszinose
JNCL	Juvenile Neuronale Lipofuszinose
k	Kilo
kb	Kilo Basen
KFA	Komplettes Freund's Adjuvans

(v)LINCL	(variant) Late Infantile Neuronal Lipofuscinosis
Lsg.	Lösung
m	milli (1×10^{-3})
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MM	Molare Masse
mL	Milliliter
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
pAk	polyklonaler Antikörper
NCL	Neuronale Ceroid Lipofuszinosen
NNH	Nasen-Nebenhöhle
OCL	Ovine Ceroid Lipofuszinose
Pam(3)-Cys	Pam ₃ CSK ₄ · 3HCl, (S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys ₄ -OH · 3HCl,
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PPT1	Palmitoylprotein-Thioesterase 1
rek.	rekombinant
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Shingolipid Activator Protein
Sub C	Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase
Tab.	Tabelle
TE	TRIS-EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vgl.	vergleiche
z.T.	zum Teil

1. EINLEITUNG

Die Ceroid Lipofuszinosen (CLN) stellen eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar. Der Begriff Neuronale Ceroid Lipofuszinose (NCL) wird synonym verwendet. Im englischen Sprachraum ist ebenfalls die Bezeichnung *Batten Diseases* etabliert. Bei den CLN-Erkrankungen handelt es sich nach Jalanko und Braulke um wenig verbreitete Erberkrankungen mit einer Inzidenz von weltweit 1:100000, wobei in den USA und besonders in Skandinavien Patienten mit einer Inzidenz von 1:12500 häufiger betroffen sind (Jalanko und Braulke, 2009). Die Ceroid Lipofuszinosen werden den Speicherkrankheiten zugeordnet. Bei den relativ seltenen neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter handelt es sich bei den CLN um die am häufigsten auftretende Gruppe. Gegenwärtig sind keine Therapien etabliert, mit denen eine Remission der CLN-Erkrankungen erreicht wird. Aufgrund der vergleichsweise geringen Häufigkeit werden die Eltern, das soziale Umfeld und die Kinderärzte des Patienten meist erstmalig mit dieser Erbkrankheit konfrontiert. Die pathobiochemischen Grundlagen der Lipofuszin-Speicherung in der Zelle sowie die Funktionen aller CLN-Proteine sind bisher nur unzureichend aufgeklärt, weshalb für die betroffenen Patienten derzeit nur palliative Behandlungsansätze etabliert sind. Aktuell wird vom Kinderarzt und vom Neuropädiater anhand von Symptomen der Verdacht auf eine Lipofuszinose geäußert und mit verschiedenen Diagnoseverfahren bestätigt. Gegenwärtig werden Therapieverfahren entwickelt, u.a. in Form einer Enzymersatztherapie (Steinfeld *et al.*, 2010). Es besteht die begründete Hoffnung, dass die Aufklärung der intrazellulären Prozesse zu einem besseren Verständnis der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen führt und damit potentiell zu einem kurativen Behandlungsansatz.

1.1 NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN

Neurodegenerative Erkrankungen im Kindesalter äußern sich durch Degeneration von neuronalen Strukturen, welche in enger funktionaler Verbindung stehen. Beispielhaft sind hier die weiße Hirnsubstanz in Verbindung mit den Basalganglien als „funktionales System“ anzusehen, genauso wie das Rückenmark, die Vorderhornzellen und die muskuläre Endplatte mit zugehörigem Muskel ein funktionales System darstellen. Bei Beeinträchtigungen mehrerer dieser funktional verbundenen Systeme, spricht man von einer systemischen neurodegenerativen Erkrankung.

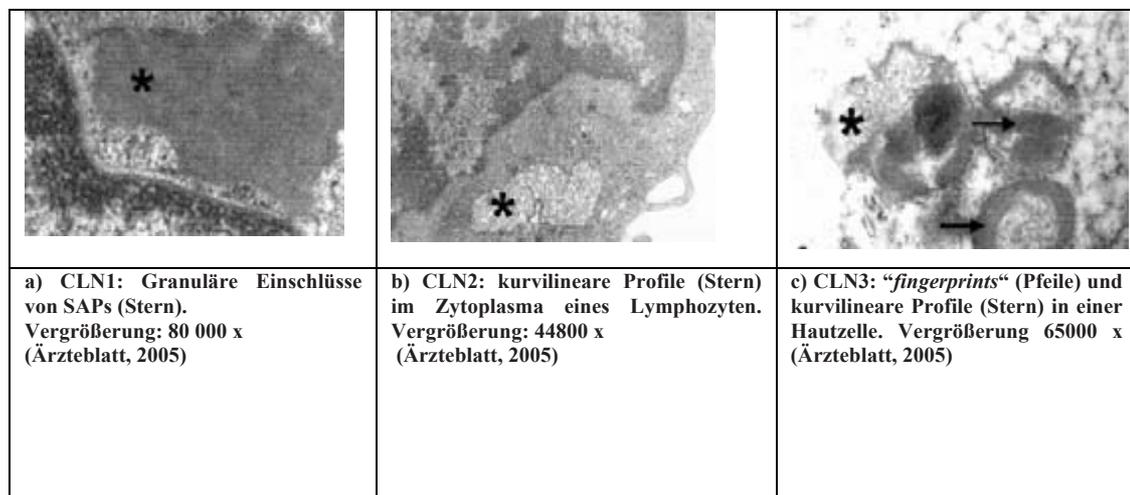
1.2 NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOSEN (NCL/CLN)

Neuronale Ceroid Lipofuszinosen werden in der Literatur mit einer Inzidenz in Europa und Nordamerika von 1: 12500 angegeben. Für die einzelnen CLN-Erkrankungen sind inzwischen die chromosomalen Gendefekte identifiziert worden (vgl. Tab 1). Beispielsweise liegt die Mutation bei der CLN1-Variante im Bereich des chromosomalen Abschnitts 1p34.2, der für die PPT1 kodiert.

Tab. 1: Übersicht: Chromosomale Zuordnung der Lipofuszinosen (Mole, 2004).

CLN1	1p34.2
CLN2	11p15.4
CLN3	16p12.1
CLN4	15q23
CLN5	13q21.1-q32
CLN6	15q21-23
CLN7	4q28.2
CLN8	8p23.3
CLN10	11p15.5

Bei den verschiedenen CLN-Varianten liegt in der Regel ein autosomal-rezessiver Erbgang vor. Das histologische Bild der CLN ist geprägt von intrazellulärer Speicherung von morphologisch definiertem Material, dem sogenannten Ceroidlipofuszin (Goebel und Wisniewski, 2004). Neben anderen hydrophoben Lipoproteinen enthält das wachsartige Lipofuszin bei den meisten CLN-Varianten die C-Untereinheit (Sub C) der mitochondrialen ATP-Synthase (Palmer *et al.*, 1992). Wahrscheinlich führt eine fehlende lysosomale Degradation zur vermehrten intrazellulären Anhäufung des Lipofuszins.

**Abb. 1: Elektronenmikroskopie: Charakteristische Zelleinschlüsse bei CLN-Patienten.**

Bei den CLN1- und CLN10-assoziierten Ceroid Lipofuszinosen werden neben den Sub C-Ablagerungen auch Einschlüssen wie das Sphingolipid Activator Protein (SAPs der Gruppen A und D) in Form so genannter granulär-osmiophiler Einlagerungen (GRODS) nachgewiesen. Bis heute gelten die Zelleinschlüsse als ein Unterscheidungs- und Gliederungs-Merkmal der einzelnen CLN-Formen. (Abb.:1). Durch die Ablagerungen in den Neuronen kommt es zum Zelluntergang, was schließlich zu den CLN-Symptomen führt.

1.2.1 KLINISCHER VERLAUF

Die neuronalen Lipofuszinosen beginnen mit einem rasch progredient verlaufenden Visusverlust, welcher zeitnah zur Amaurosis führt, gepaart mit Demenz-Symptomen und vielfach mit epileptiformen Störungen sowie Lähmungen (Haltia, 2003). Abhängig davon, welche der CLN-Erkrankung vorliegt, variiert der Beginn der Symptome hauptsächlich vom späten Säuglingsalter bis zur präpubertären Entwicklungsphase. Der neurologische, physische und psychische Verfall führt im Krankheitsverlauf zur völligen Pflegebedürftigkeit des Patienten und zum frühzeitigen Tod. Allen Erkrankungsvarianten ist gemeinsam, dass die Manifestation der Erkrankung mit einem Verlust von Fähigkeiten einhergeht, welche ausgehend von den Phasen des kindlichen Wachstums, bereits entwicklungsgerecht ausgeprägt waren. Die der Amaurosis zugrunde liegende Retinopathie stellt häufig das Anfangssymptom dar. Es kommt nachfolgend zur Entwicklung einer Art frühkindlicher Demenz mit den beschriebenen typischen Fähigkeitsverlusten (Persaud-Sawin *et al.*, 2007). In den Phasen der cerebralen Degeneration lassen sich im MRT bei der infantilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinose (CLN1) anfänglich unspezifische Alterationen im periventrikulären Marklager nachweisen. Der Thalamus stellt sich in der T2-Wichtung hypointens dar - verglichen mit den Basalganglien. Außerdem kommt es zu signalintensiven Alterationen („rims“), welche die Seitenventrikel hyperintens umgeben (Autti *et al.*, 1992, 1996; Vanhanen *et al.*, 1995). Im Verlauf kommt es parallel zur Progredienz der erkrankungsspezifischen Neurodegeneration bei allen CLN-Erkrankungen zu einer ausgeprägten Hirnatrophie mit einem Volumenverlust bis 50% (Vesa *et al.*, 1995). Vorangig handelt es sich dabei um einen Verlust der grauen Hirnsubstanz. Die Ceroid Lipofuszinosen führen letztendlich zum vorzeitigen Tod der betroffenen Patienten. Eine frühe Diagnose hat einen hohen Stellenwert, trotz der aktuell infausten Prognose. Davon hängt die palliative Behandlung ab, welche den Patienten verbesserte Prognosen versprechen im Hinblick auf zu erhaltende motorische und geistige Fähigkeiten. Dem sozialen Umfeld des Patienten können bei feststehender Diagnose damit auch der derzeitige wissenschaftliche Erkenntnisstand, Hintergründe der Erkrankung sowie der Stand der derzeitigen Therapieaussichten vermittelt werden. Dadurch wird schnelle Hilfe für die Betroffenen und deren Familien hinsichtlich der langwierigen und schwierigen Patientenbegleitung möglich. Ebenso lassen die bisherigen Ergebnisse von vereinzelten experimentellen Studien den frühen Behandlungsbeginn vorteilhaft erscheinen (Malatack *et al.*, 2003). Die einzelnen CLN-Unterformen haben bis auf wenige Ausnahmen unterschiedliche Erstmanifestationsalter. Die unterschiedlichen Manifestationsalter der einzelnen CLN-Formen wurden lange Zeit für die Nomenklatur der CLN-Varianten herangezogen. So ist bei der CLN3 ein Erkrankungsbeginn im frühen Schulalter bekannt, während die von Mutationen im CLN1-Gen verursachte infantile Variante der CLN-Erkrankung (*INCL*) einen Erkrankungsbeginn am Ende des ersten Lebensjahres aufweist.

1.2.2 CLN-ASSOZIIERTE PROTEINE

CLN-assoziierte Proteine sind bereits lange im Blickfeld der biologischen, biochemischen und genetischen Grundlagenforschung. Untersuchungen ergaben, dass ein Mangel an Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (CLN1) und Tripeptidyl-Peptidase 1 (CLN2), welche intrazelluläre Enzyme darstellen, maßgeblich an der Pathogenese zweier Varianten der Ceroid Lipofuszinosen beteiligt sind (Sleat *et al.*, 1996, 1997; Ezaki *et al.*, 2000; Lu JY *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006 a, b).

Es konnte auch nachgewiesen werden, dass bei anderen Unterformen der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen Veränderungen von zellulären Membranproteinen für die Erkrankung ursächlich sind. Nicht nur Veränderungen in lysosomalen Proteinen (z.B. CLN3) führen zu den intrazellulären Ablagerungen, sondern auch Mutationen von Proteinen, die im ER lokalisiert sind. Beispiele sind hier die Ceroid Lipofuszinosen der Varianten CLN6 und CLN8 (Lonka *et al.*, 2000, 2004; Heine *et al.*, 2004, 2007). Die primären Funktionen dieser Proteine sind bis heute nicht abschließend geklärt. Vielmehr muss festgehalten werden, dass man bisher nur mangelhaft versteht, wie die zellbiologischen und biochemischen Vorgänge die Symptomatik der Patienten und die zellmorphologischen Veränderungen erklären. Pearce konnte zeigen, dass das Gen für das Hefeprotein Btn1 ortholog zum Gen für das CLN3-Protein in eukaryontischen Organismen ist. Es wurde auf eine wichtige Rolle des CLN3-Proteins in der lysosomalen pH-Kontrolle geschlossen (Pearce *et al.*, 1998, 1999). Das Vorkommen des Hefeproteins btn1 in *Saccharomyces cerevisiae*, der Nachweis vom CLN3-Protein im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, sowie die Expression in Maus, Hund, Schaf und Mensch zeigen die evolutionäre Konservierung der CLN-Proteine. Natürliche oder transgene Tiermodelle haben zur Entschlüsselung der zellulären Vorgänge beigetragen. So wurde im Schaf-Modell (Mutation im CLN6-Gen) erstmalig die Untereinheit C der ATP-Synthase als Bestandteil des zellulären Speichermaterials nachgewiesen (Palmer *et al.*, 1992). Jedoch blieben bis heute viele Fragen ungeklärt, auch aufgrund fehlender Antikörper.

1.3 INFANTILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN

1.3.1 CLN1 - INFANTILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOSE (HABERG-SANTAVUORI-DISEASE)

Die infantilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (INCL) werden durch Mutationen auf dem kurzen Arm des 1. Chromosoms verursacht (Vesa *et al.*, 1995). 1p34.2 kodiert für die Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1) (17.03.13, 12Uhr <http://omim.org/entry/256730>). Aktuell sind 64 Mutationen im Gen für PPT1 beschrieben (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/SummaryTableNov2012.htm>).

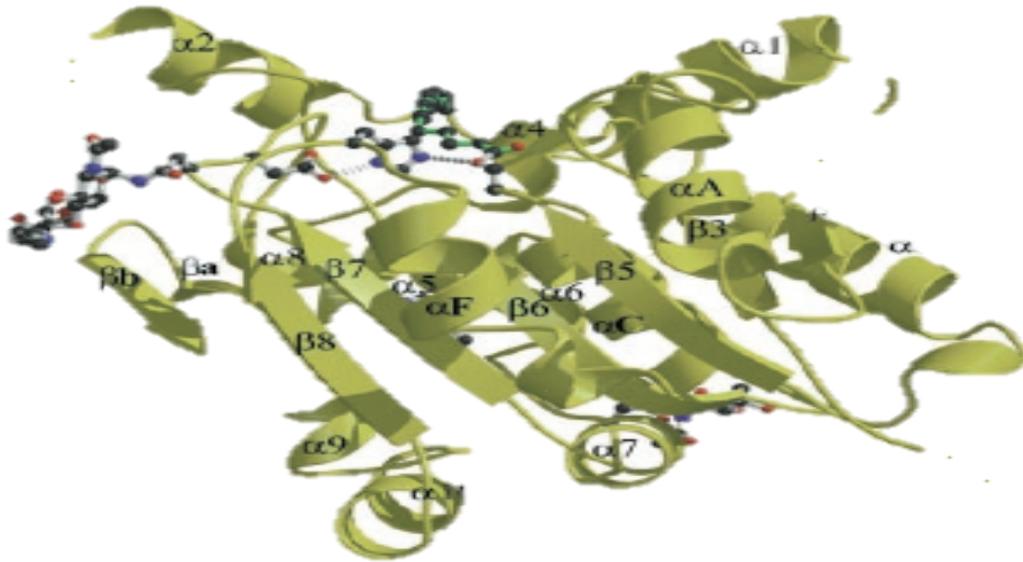


Abb. 2: Kristalline Struktur von PPT1 im Komplex mit Palmitat (Bellizzi *et al.*, 2000).

Die weltweit häufigste Mutation ist der Abbruch der Aminosäuresequenz nach Arginin 151, wohingegen die Missens-Mutation (Arg122Trp) in Nordeuropa und besonders in Finnland die häufigste Variante der INCL darstellt. Die daraus resultierende Verschiebung der Wasserstoffbrückenbindungen führt zur Änderung der Konformation. Die konsekutive Fehlfaltung von PPT1 (Abb. 2) führt zu veränderten Funktionen mit Ausprägung der entsprechenden phänotypischen Veränderungen, welche Santavuori erstmalig beschrieb. Sie führt zur Einschränkung der Funktion bis zum völligen Funktionsverlust der PPT1. Die in den Zellen abgelagerten Lipoproteinfragmente zeugen von einer Funktionsstörung der Lysosomen im Rahmen der Proteolyse, die durch das lysosomale Protein PPT1 durch Abspaltung von Palmitoylresten unterstützt wird (Lu JY *et al.*, 2002). Andere Ergebnisse zeigten auch, dass bei verminderter Funktion dieses Enzyms der ER-geförderte oxidative Stress, z.B. über den Unfolded-Protein-Response (UPR) induziert wird, was zum Anstieg der Aktivität verschiedener Caspasen (besonders der Caspasen 3, 9 und 12) führt. Möglicherweise kommt es dadurch zur Einleitung von Apoptosen (Kim *et al.*, 2006 a, b). Doch warum trotz disseminierter Ablagerung in verschiedenen Körperzellen besonders das neuronale System betroffen ist und Neuronen zerstört werden, ist bisher nicht geklärt. Im 8.-14. Lebensmonat wird als Primärsymptom ein Fähigkeitsverlust der bereits durchschrittenen Entwicklungsstufen festgestellt. Es kommt zum Stillstand der kindlichen Entwicklung und schließlich zum Verlust erlernter Fähigkeiten. Beispielsweise ist das bereits erlernte Laufen und Sitzen nicht mehr möglich. Eine voranschreitende Degeneration der Netzhaut führt zur vollständigen Erblindung. Die auftretenden epileptischen Anfälle und die sich entwickelnde Spastik sind medikamentös nur eingeschränkt beeinflussbar. Bis heute stehen den Patienten nur palliative Therapieoptionen zur Verfügung.

1.4 SPÄTINFANTILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN

Die Gliederung der spätinfantilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen unterliegt stetigen Änderungen. Klinisch wurden die Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen lange nach dem Erkrankungsbeginn eingeteilt. Anhand der genetischen und biochemischen Ursachen werden die **spätinfantilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (LINCL)** wie folgt gegliedert:

Tab. 2: Übersicht über die spätinfantilen CLN-Erkrankungen.

SPÄTINFANTILE CLN-ERKRANKUNGEN (LINCL)		
Classic late infantile NCL (LINCL) <small>(17.03.13 12Uhr http://omim.org/entry/204500)</small>		
Mutation im CLN2-Gen	11p15.4	Defekt der Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1)
Finnische Variante der LINCL <small>(17.03.13 12Uhr http://omim.org/entry/256731)</small>		
Mutation im CLN5-Gen	13q21.1-q32	Defekt eines Membranproteins
Indisch-Iberische Variante (vLINCL) <small>(17.03.13 12Uhr http://omim.org/entry/601780)</small>		
Mutation im CLN6-Gen	15q21-23	Defekt eines Membranproteins des ER
Türkische Variante der LINCL <small>(17.03.13 12Uhr http://omim.org/entry/610951)</small>		
Mutation im CLN7-Gen	4q28.2	Defekt des lysosomalen Transporters MFSD8
EMPR/Northern Epilepsy <small>(17.3.13 12Uhr http://omim.org/entry/600143)</small>		
Mutation im CLN8-Gen	8p23.3	Defekt eines transmembranen Proteins im ER und im Golgi-Apparat

1.4.1 CLN2 - KLASSISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOSE

Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 wird die Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1) kodiert. (Sleat *et al.*, 1996, 1997; Wisniewski *et al.*, 2001). TPP1 ist eine aus 368 Aminosäuren bestehende Serin-Protease, welche am freien N-Terminus Tripeptide von kleinen Polypeptiden abspaltet. Die TPP1 wird als inaktives Zymogen synthetisiert (Autefage *et al.*, 2009). Es wird außerdem eine geringfügige Aktivität als Endopeptidase vermutet (Ezaki *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Golabek *et al.*, 2003). TPP1 ist an mehreren Stellen glykosyliert und für die Reifung und Aktivität der Lysosomen und des ER von Bedeutung (Steinfeld *et al.*, 2004). In der Einleitung der Apoptose scheint TPP1 eine Rolle zu spielen, denn Zellen ohne TPP1, ähnlich wie Zellen ohne PPT1, sind unempfindlich gegen die durch TNF-Alpha ausgelöste Apoptose (Autefage *et al.*, 2009). Die Aktivität von CLN2 scheint von seiner Glykosylierung abzuhängen (Tsiakas *et al.*, 2004). TPP1 ist in den Lysosomen lokalisiert (Steinfeld *et al.*, 2006) und führt bei Funktionsausfall zur Kumulation der Subunit C der mitochondrialen ATP-Synthase als pathognomonische kurvilineare Ablagerung. Die Patienten haben die höchste Konzentration von TPP1 zum Zeitpunkt der ersten Symptome. Nachfolgend tritt bei den jungen Patienten ein Aktivitätsverlust vor allen Dingen in Hirn, Leber, Nieren, Herz und

Darmgewebe auf (Kurachi *et al.*, 2001). Wahrscheinlich bedingen erhaltene Restfunktionen von TPP1 die leicht differierenden klinischen Bilder der Patienten und damit den individuellen Krankheitsverlauf. Die Patienten mit CLN2-assoziiertes klassischer LINCL zeigen um das 3. Lebensjahr erstmals Symptome, anfänglich mit einer verlangsamten kindlichen Entwicklung. Es kommt ebenfalls zu einem Visusverlust sowie zu epileptischen Anfällen. Alle psychomotorischen Fähigkeiten gehen bis zum Alter von 12-15 Jahren verloren. Für die klassische Variante der Neuronalen Ceroid Lipofuszinose sind derzeit nur palliative Behandlungsansätze etabliert.

1.4.2 CLN5 - FINNISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOSE

Die Mutation im Gen für das Protein CLN5 wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 13 (13q21.1-q32) detektiert (Williams *et al.*, 1994). Die Funktion des 407 Aminosäuren langen und 46 kDa schweren glykosylierten Proteins CLN5 ist noch immer unklar. Bei CLN5 handelt es sich um ein lysosomales Molekül, was durch die Kolo-kalisation mit Lamp-1 nachgewiesen werden konnte. In den Lysosomen erfährt das Protein wahrscheinlich seine Reifung (Vesa *et al.*, 2002; Vesa und Peltonen, 2002; Isosomppi *et al.*, 2002; Holmberg *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2006; Sleat *et al.*, 2009; Lebrun *et al.*, 2009; Lyly *et al.*, 2009; Schmiedt *et al.*, 2010). In der finnischen Population wird ein gehäuftes Vorkommen beobachtet (Pineda-Trujillo *et al.*, 2005). In Zellen, welche eine Überexpression des Proteins CLN5 aufweisen, konnte eine Lokalisation im ER und im Golgi-Apparat nachgewiesen werden. Aufgrund der starken Glykosylierung wird vermutet, dass das Protein das endoplasmatische Retikulum, ausgestattet mit Mannose-6-Phosphat, in Richtung der Golgi-Vesikel verlässt. Die reife Form ist in den Lysosomen aktiv (Schmiedt *et al.*, 2010). Santavuori beschrieb erstmalig die Ceroid Lipofuszinose der Variante CLN5, welche mit EEG-Veränderungen, mentaler Retardierung und myoklonischer Epilepsie auffiel und damit der Gruppe der spätinfantilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (LINCL) zugeordnet wurde (Santavuori *et al.*, 1982, 1991). Jedoch traten bei den untersuchten Patienten erst in einem Alter von 4-7 Jahren die ersten Symptome auf, im Gegensatz zur klassischen Variante, welche bereits erste Symptome im Lebensalter von 2-4 Jahren aufweisen.

1.4.3 CLN6 - INDISCH-IBERISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOSE

1997 wurden zwei Patienten beschrieben, welche klinisch eine Variante der juvenilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen mit einem Erkrankungsbeginn zwischen dem 4. und 6. Lebensjahr aufwiesen, die aber nicht aus Finnland, sondern vom indischen Subkontinent stammten (Sharp *et al.*, 1997). Histologisch wiesen die untersuchten Zellen zwar die für Lipofuszinosen typischen wachsartigen lysosomalen Einschlüsse auf, jedoch waren diese in bisher unbekannter Konfiguration vorhanden. Es handelte sich im elektronenmikroskopischen

Bild um eine Kombination aus den bereits bekannten Formationsanordnungen der intrazellulär nachweisbaren Ablagerungen bei anderen CLN-Varianten. Einerseits kamen die für CLN2-Erkrankung typischen kurvilinearen Einschlüsse vor, andererseits auch die „Fingerabdruck“-Anordnungen, welche für die CLN3 typisch sind. Mutationen im CLN6-Protein lösen diese indisch-iberische Variante der spätinfantilen Ceroid Lipofuszinose (vLINCL) aus (Sharp *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2002). Das Gen für das aus 311 AS bestehende CLN6-Protein ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert, umfasst ca. 22,7 kb mit 7 Exons. Es wird daraus eine 2,4 kb umfassende mRNA transkribiert. Es wurden verschiedene Mutationen im CLN6-Gen gefunden (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002). Derzeit sind 68 Mutationen im CLN6-Gen bekannt. (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN6mutationtable.htm>). Die häufigste Mutation ist der Verlust der Aminosäure Isoleucin 154 der 4. Domäne (Wheeler *et al.*, 2002). Das Protein ist stark konserviert (Mole *et al.*, 2004; Heine *et al.*, 2004). Nach aktuell vorliegenden Erkenntnissen geht man von einem Vorkommen des Proteins CLN6 im ER aus. Im Golgi-Apparat oder den Lysosomen wurde CLN6 nicht nachgewiesen (Heine *et al.*, 2004, 2007). Berechnungen gehen von 7 transmembranen Domänen aus. Der N-Terminus ist in das Zytosol gerichtet und der C-Terminus ragt in das Lumen des ER. N-Terminus und Domäne 6 und 7 sind für die Membranfixierung im ER verantwortlich. Fehlen sie, geht das Protein CLN6 aus dem ER verloren (Heine *et al.*, 2004, 2007). Eine Interaktion der Proteine CLN6 und CLN8, welche beide im ER lokalisiert wurden, findet nicht statt (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002; Heine *et al.*, 2007). Es konnte keine Bildung von Heterodimeren oder eine gegenseitige Beeinflussung nachgewiesen werden (Heine *et al.*, 2004). Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die genetische Information für CLN6 ubiquitär vorhanden ist. Transkripte von 2,4 kb und 3,7 kb wurden in allen Geweben detektiert. Zusätzlich wurden in Skelettmuskelgewebe zwei weitere Transkripte von 1,1 kb und 5,9 kb nachgewiesen (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002). South Hampshire- und Merino-Schafe sowie Mäuse können an einer Ceroid Lipofuszinose erkranken und weisen gleichartige Erkrankungsvarianten auf, welche ebenfalls durch Mutationen im CLN6-Gen verursacht werden (Tammen *et al.*, 2006). Beide Spezies dienen deshalb als Tiermodelle (Jolly *et al.*, 1989, Cook *et al.*, 2002). Auch bei den Tieren kommt es zu Visusverlust, Verhaltensauffälligkeiten, Lähmungen sowie zu Krampfanfällen, begleitet durch die typischen histologischen neuronalen Veränderungen, was insgesamt zu einer deutlich eingeschränkten Lebenserwartung dieser Tiere führt (Mayhew *et al.*, 1985; Bronson *et al.*, 1993, 1998; Cook *et al.*, 2002). Bei Schafen mit oviner Ceroid Lipofuszinose (OCL) ist die typische Astrozytose und Mikrogliose bereits kurz nach der Geburt nachweisbar (Oswald *et al.*, 2005). Klinisch entwickeln sich sowohl beim Tiermodell als auch beim Menschen eine Amaurosis, gefolgt von Störungen der Motorik und des Verhaltens auf der Basis einer Hirnatrophie. Die Tiere versterben nach durchschnittlich 27 Monaten. Histologisch finden sich im ovinen Tiermodell eine ausgeprägte Astrozytose in verschiedenen Hirnarealen sowie die typischen Ablagerungen der Lipoproteine (Mayhew *et al.*, 1985; Cook *et al.*, 2002). Im natürlich vorkommenden Mausmodell mit Mutationen im CLN6-Gen (CLN6^{nclf}-Maus)

weist neben dem ähnlichen klinischen Bild auch das elektronenmikroskopisch nachweisbare, identische und intrazellulär abgelagerte, autofluoreszierende Zellmaterial auf eine ähnliche Erkrankung hin (Katz *et al.*, 2001). Ähnlich der humanen Ausprägung treten histologisch nachweisbare Demyelinisierungserscheinungen, cerebrale Atrophie mit begleitender reaktiver Gliose sowie eine retinale und neuronale Degeneration auf (Cooper *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2001; Cooper 2003; Mitchinson *et al.*, 2004; Bible *et al.*, 2004; Pontikis *et al.*, 2004). Klinisch können eine Ataxie, Amaurosis sowie verändertes Verhalten beobachtet werden. Im 9. Lebensmonat treten Lähmungen auf, gefolgt von einem frühen Tod. In Untersuchungen am Schafmodell und bei Zellen von CLN6-Patienten wurde eine deutliche Erhöhung von lysosomaler Arylsulfatase A (ASA) nachgewiesen. Bei der Metachromatischen Leukodystrophie weist das Gen für die ASA Mutationen auf. Eine Beeinträchtigung im intrazellulären Transport zu den Lysosomen wird für unwahrscheinlich gehalten. Es wird postuliert, dass ASA keine pH-abhängige Octamerisierung erfährt und als Dimer vorliegt (von Bülow *et al.*, 2002), das schnell abgebaut wird, wodurch die niedrige Präsenz erklärbar wird. Die ähnlichen Phänotypen der Metachromatischen Leukodystrophie sowie der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen könnten ebenfalls auf eine lysosomale Fehlfunktion in Zellen mit verändertem CLN6-Protein hinweisen und die Kumulation der typischen intrazellulären Ablagerungen erklären (Heine *et al.*, 2004). Proteine der Collapsin Response Mediator Protein-Familie kommen spezifisch nur in Hirngewebe vor und haben Einfluss auf Wachstums- und Abbauprozesse im ZNS (Hou *et al.*, 2008). Komplexe aus CRMP-2 (Collapsin Response Mediator Protein-2) und dem Protein CLN6 wurden nachgewiesen. CRMP-2 (62,23 kDa) war in cerebralem Gewebe besonders im Thalamus der CLN6^{ncif}-Maus reduziert. Zur weiteren Differenzierung wurden CRMP-abhängige Vorgänge an der CLN 6^{ncif}-Maus untersucht. Es konnte bei einem Mangel an CLN6 keine Änderung der Wachstumsvorgänge im *Dorsal Root Ganglion* (DRG) nachgewiesen werden (Benedict *et al.*, 2009), wo CRMP-2 als Effektorprotein im Wachstums- und Modulationsprozess (growth cone collapse) eine Rolle spielt (Charrier *et al.*, 2003). Daraus wurde geschlossen, dass die Semaphorin3-Kaskade nicht gestört ist, welche in der Beeinflussung des axonalen Wachstums in Kombination mit CRMP-2 eine entscheidende Rolle spielt (Liu & Strittmatter., 2001, Schmid & Strittmatter, 2007) . Durch den Mangel an funktionsfähigem CLN6 wird auf eine verminderte CLN6-CRMP-Interaktion geschlossen. Die daraus folgende beeinträchtigte Zellreifung von Neuronen könnte die neuronalen Pathologien erklären (Benedict *et al.*, 2009). Die CRMP-2-Ausprägung ist im cerebralen Gewebe der CLN6^{ncif} -Maus vermindert. Im Vergleich mit einer Kontrollzelllinie wurden bei der CLN6^{ncif} -Maus im CRMP abhängigen Reifungs- und Wachstumsprozess von kultivierten neuronalen Zellen (Hippocampus) keine ausreichend gereiften synaptischen Verbindungen ausgebildet und ein deutlich verfrühter Untergang der hippocampalen Zellen beobachtet (Benedict *et al.*, 2009). Außerdem konnte in der CLN6^{ncif}-Maus nachgewiesen werden, dass die korrekte Interaktion von CRMP und Mikrotubuli, Kinesinen und dem Neurofibromatose Related Protein (NF1) nicht funktioniert. Zusätzlich

wird gezeigt, dass die Moleküle CLN6 und CRMP mit dem *kinesin light chain protein* (KLC4 oder KNSL8) komplexieren können. Interaktionen von CRMP mit dem Mikrotubuli-Bindungsprotein Kinesin I sind nachgewiesen worden (Fukata *et al.*, 2002). CLN6-abhängige intrazelluläre Transport-Mechanismen mit Kinesin werden diskutiert. Die mitochondriale MnSOD, eine Mangan-abhängige Superoxid Dismutase ist in cerebralen Geweben (Neuronen und Astrozyten) und Fibroblasten von CLN6 Patienten und OCL-Schafen signifikant und spezifisch erhöht, was auf eine aktivierte Mikroglia, oxidativen Stress und/oder aktivierte Cytokine im Rahmen eines Entzündungsprozesses hinweisen könnte (Heine *et al.*, 2003). Es wurde außerdem ein erhöhtes Vorkommen von Mangan und Zink im cerebralen Gewebe des OCL-Schafs nachgewiesen (Kanninen *et al.*, 2013). Trotz umfangreicher genetischer und proteinchemischer Untersuchungen ist auch aufgrund fehlender spezifischer Antikörper die genaue Funktion des CLN6-Proteins weiterhin ungeklärt. Die Manifestation der CLN6-Erkrankung ist variabel. Bereits im Alter von 18 Monaten können Patienten mit ersten Symptomen auffällig werden, genauso wie andere Patienten erst in einem Alter von acht Jahren symptomatisch werden. Die Einschränkung der Sehfähigkeit tritt auch hier häufig als erstes Symptom auf. Krämpfe und völliger Verlust der psychomotorischen Fähigkeiten führen zum Tod in der zweiten bis dritten Lebensdekade.

1.4.4 CLN7 - TÜRKISCHE VARIANTE DER SPÄTINFANTILEN NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOSE

Die durch Mutationen im CLN7-Gen verursachte CLN-Variante wurde aufgrund des erstmalig dokumentierten Vorkommens in Vorderasien als türkische Variante bezeichnet (Topcu *et al.*, 2004). Inzwischen wird auch in anderen, klinisch ähnlich gelagerten Fällen, von einer CLN7-assoziierten Erkrankung ausgegangen (Stogmann *et al.*, 2009). In der Mehrzahl der bisher bekannten Fälle ist ein Defekt am Major Facilitator Superfamily Domain Containing Protein 8 (MFSD8 - Protein) detektiert worden (Siintola *et al.*, 2007). Bei diesem 58 kDa schweren Protein handelt es sich um ein Transportprotein. Durch die Untersuchung von GFP-getagten HeLa- und COS 1-Zellen, welche das CLN7-Protein überexprimieren, geht man derzeit davon aus, dass es sich bei MFSD8 wahrscheinlich um einen lysosomalen Transporter handelt (Siintola *et al.*, 2007), der eine Rolle in der Clathrin-gesteuerten Endozytose spielt (Steenhuis *et al.*, 2010). Die betroffenen Patienten zeigen erstmalig mit zwei bis sieben Jahren Symptome, wie Verlangsamung der motorischen Bewegungsabläufe und der Sprache, Visusverlust, mentale Retardierung, Myoklonien sowie Persönlichkeitsstörungen. Histopathologisch zeigen sich im elektronenmikroskopischen Bild die bekannten „fingerprints“, sowie wenig vakuolisierte Lymphozyten (Topcu *et al.*, 2004).

1.4.5 CLN8 - NORTHERN EPILEPSY/ PROGRESSIVE EPILEPSY WITH

MENTAL RETARDATION (EPMR)

Mutationen im Gen für das Protein CLN8 (8p23) führen im Mausmodell schnell zur Degeneration von Motoneuronen (Bronson *et al.*, 1993; Ranta *et al.*, 1999). Cerebrale Gewebe von Tieren und humanen Patienten zeigen deutliche Einlagerungen autofluoreszierender Materialien und damit pathognomonisch die Neurodegeneration. Das aus 288 Aminosäuren bestehende CLN8-Protein ist im endoplasmatischen Retikulum und im ER to Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) lokalisiert (Lonka *et al.*, 2000; Lonka *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um mobile Transport-Kompartimente, welche zwischen ER und Golgi-Apparat Transportaufgaben übernehmen. CLN8 und andere lysosomale Proteine konnten in der Immunfluoreszenz von transfizierten hippocampalen Neuronenzellen im *basolateralen Bereich* der Zelle nachgewiesen werden. Massenspektrometrisch konnte in Proben aus Hirngewebe von CLN8-Patienten ein vermindertes und abnorm verändertes Aufkommen an Phospholipiden und Sphingolipiden nachgewiesen werden (Winter und Ponting 2002; Guillas *et al.*, 2003; Hermansson *et al.*, 2005). Die Interaktionspartner sind auch hier noch nicht identifiziert.

Die ersten Symptome bei EPMR-Patienten zeigen sich meist zwischen dem 7. und 10. Lebensjahr. Es kommt zu cerebralen Krampfanfällen, mentaler Retardierung, verlangsamten Bewegungen sowie zu psychomotorisch pathologischem Verhalten. Einige Patienten zeigen eine abgeschwächte Sehschärfe ohne oculare Erkrankungserscheinungen (Hirvasniemi *et al.*, 1994; Hirvasniemi *et al.*, 1995). Bei der EPMR ist ein milder Verlauf die Regel und ein Lebensalter von über 50 Jahren kann durchaus erreicht werden.

1.5 JUVENILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLEN

1.5.1 CLN3-ASSOZIIERTE JUVENILE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOSE (BATTEN DISEASE)

Mutationen im CLN3-Gen verursachen die am häufigsten auftretende CLN-Variante. Aktuell beträgt die Prävalenz in Deutschland ca. 300 Fälle bei einer Inzidenz von 1:50 000 (Claussen *et al.*, 1992). Das Gen kodiert für ein Membranprotein, welches 6 transmembrane Domänen (MM 43kDa) aufweist und auf Chromosom 16p12.1 lokalisiert ist (Janes *et al.*, 1996). Aktuell sind 57 Mutationen im Gen für CLN3 bekannt (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN3mutationtable.htm> 16.3.2014 21:52Uhr). Die häufigste Mutation wird durch eine Frame-Shift-Mutation nach Cystein 153 verursacht, mit Verlust von Exon 7 und 8. Diese Veränderung verursacht eine Addition von 28 neuen Aminosäuren und die Ausbildung eines Stopcodons. Das führt zu einer Verkürzung der mRNA ab AS 153, was zu einem Verlust des intakten, aus 438 Aminosäuren bestehenden Proteins CLN3 führt. Es werden auch CLN3-Varianten beschrieben, wo eine verminderte Aktivität von CLN3 vermutet wird (Kitzmüller *et al.*, 2008). Das Protein CLN3 konnte im Nucleolus, im Golgi-Apparat, in den Mitochondrien und in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Hauptsächlich ist CLN3 aber in den Lysosomen und Endosomen lokalisiert (Ezaki *et al.*, 2003; Kyttala *et al.*,

2004, 2005; Storch *et al.*, 2004, 2007). Die genaue Funktion ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Das Protein CLN3 wird in der Hefe exprimiert und ist konserviert in allen eukaryontischen Organismen anzutreffen (Gachet *et al.*, 2005). Experimentell wurden 6 Transmembran-Domänen nachgewiesen, wobei N- und C-Terminus in das Zytosol gerichtet sind (Phillips *et al.*, 2005). Es wird eine Interaktion der Moleküle Calsenilin, CLN3 und Ca^{2+} vermutet (Chang *et al.*, 2007). Ein CLN3-Knockout-Mausmodell zeigte eine Astrozytose und Gliose des Thalamus und des sensorischen Cortex (Pontikis *et al.*, 2005). In Immunpräzipitaten von CLN3-positiven Zellen wurden Untereinheiten der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ mit CLN3-Antikörpern isoliert, was auf eine Interaktion des Proteins und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ hinweisen könnte (Uusi-Rauva *et al.*, 2008). Die Erkrankung beginnt meist im frühen Schulalter. Es stellt sich eine Sehschwäche ein, welche fälschlicherweise häufig als primär ophthalmologische Erkrankung diagnostiziert wird, z.B. als Retinitis pigmentosa (Hoffmann & Assmann, 2004). Es vergesellschaftet sich jedoch zusätzlich ein Entwicklungsstillstand sowie eine beginnende Demenz, erkennbar an einer sich verschlechternden schulischen Leistungsfähigkeit. Die Kinder fallen außerdem mit signifikanten Verhaltensänderungen auf. Die anfängliche Sehschwäche mündet in einer vollständigen Erblindung, gefolgt von einem rapiden Abbau aller psychomotorischen und psychointellektuellen Fähigkeiten. Es kommt zum fortschreitenden psychomotorischen Verfall, welcher zu einer komplexen Pflegebedürftigkeit führt. Die Anlage einer percutanen endoskopischen Gastrostomie (PEG) wird notwendig, da die Patienten die körperliche und geistige Fähigkeit zur ausreichenden Nahrungsaufnahme verlieren. Die Patienten erleben den Prozess des körperlichen und geistigen Leistungsverfalls bewusst mit, bei anfänglich noch gut erhaltener eigener Wahrnehmung. Dieser Prozess dauert zumeist Jahre und die Patienten erreichen ein Lebensalter zwischen 20 und 40 Jahren.

1.6 WEITERE FORMEN DER NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOLEN

1.6.1 CLN4 - ADULTE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOLE

(Kufs Disease)

Es handelt sich bei diesen Patienten um Erkrankungen, bei denen vom jungen Erwachsenenalter bis in die vierte Lebensdekade ein Abbau der psychointellektuellen Fähigkeiten auffällig wird (Berkovic *et al.*, 1988a, b; Martin *et al.*, 1999; Nijssen *et al.*, 2002). Die klinisch zu unterscheidenden Typen (Typ A und Typ B) haben nach aktuellen Erkenntnissen differierende genetische Grundlagen. Für die im anglo-amerikanischen Raum als *Kufs Disease* bezeichnete Erkrankung sind für den Typ A Mutationen im Gen für CLN6 und Mutationen in PPT1 nachgewiesen worden und für Typ B werden aktuell Mutationen im Cathepsin F postuliert (Arsov *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2013). Typ A ist neben der voranschreitenden Demenz charakterisiert durch eine progressive myoklonische Epilepsie. Der Typ B ist gekennzeichnet durch früh beginnende Demenz, sowie Störungen des pyramidalen und extrapyramidalen Systems. Die visuellen Fähigkeiten sind in dieser Erkrankungsvariante

weitestgehend unbeeinträchtigt (Lonka, 2004). Als weitere Besonderheit ist hier ein autosomal dominanter (*Parry Disease*) und ein autosomal rezessiver Erbgang (*Kufs Disease*) bekannt.

1.6.2 CLN10 - KONGENITALE NEURONALE CEROID LIPOFUSZINOSE

Der Defekt ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15.5) im Gen für das Protein CLN10 lokalisiert (17.03.13 12Uhr <http://omim.org/entry/6101279>). CLN10 steht im Zusammenhang mit einem Mangel an der lysosomalen Protease Cathepsin D (Barohn *et al.*, 1992; Siintola *et al.*, 2006). Bei der kongenitalen Form beginnt die Erkrankung bereits intrauterin. Die Kinder kommen mit einer Mikrozephalie zur Welt. In den ersten Lebensstunden erleiden diese Patienten Krampfanfälle. Die Patienten sterben innerhalb des ersten Lebensjahres. In der sich später manifestierenden Variante entwickeln die Kinder, wie bei der vLINCL eine Amaurosis, Epilepsie sowie eine psychomotorische Retardierung.

1.6.3 WEITERE VARIANTEN DER NEURONALEN CEROID LIPOFUSZINOLEN

Es wird über weitere genetische Erkrankungen berichtet, für die die Begriffe CLN11, CLN12, CLN13 und CLN14 benutzt werden. Jedoch ist in diesen Fällen noch nicht klar, ob hier die Zuordnung zu den CLN-Erkrankungen gerechtfertigt und sinnvoll ist. Die Klassifikation CLN9 wird für Erkrankungsfälle mit Erkrankungsbeginn in der Altersspanne der JNCL verwendet, die nicht der CLN3-Variante zugeordnet werden können (17.3.13 12Uhr <http://www.ucl.ac.uk/ncl/mutation.shtml>). Derzeit werden auch pathologische Zustände, die durch Mutationen im Gen des Chloridkanals 7 (CLC-7) ausgelöst werden, zu den Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen gezählt. Dabei handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte, infantile, bösartige Osteopetrose, welche mit dem klinischen Bild einer Hirnatrophie, Mikrozephalie, Autismus, Taubheit und Blindheit zum frühzeitigen Tod in den ersten 10 Lebensjahren führt (Frattini *et al.*, 2003; Waguespack *et al.*, 2003, 2007). Bei ca. 10 % der Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Neuronale Ceroid Lipofuszinose besteht, konnte bisher das Krankheitsbild keiner der bekannten Varianten zugeordnet werden. Veränderungen proteinkodierender Genabschnitte (u.a. für Cathepsin B, Cathepsin L, Cathepsin F, Palmitoyl Protein Thioesterase 2, Osteopetrosis Associated Transmembrane Protein 1), welche bei transgenen Tieren einen ähnlichen Phänotyp wie bei CLN-Erkrankungen verursachen (Järplid und Haltia, 1993; Gupta *et al.*, 2001; Felbor *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2006), konnten bisher beim Menschen als Ursache nicht nachgewiesen werden.

1.7 DIAGNOSTIK UND ETABLIERTE THERAPIEKONZEPTE

Bei unklaren Entwicklungsverzögerungen und unklaren epileptiformen Erkrankungen werden bei Verdacht auf eine NCL Blutproben analysiert, um TTP1, PTT1 und Cathepsin D zu bestimmen. Werden Abweichungen von den normalen Konzentrationen nachgewiesen,

werden molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt und damit CLN1, CLN2 und CLN10 ggf. bestätigt oder ausgeschlossen. Auch Hautfibroblasten werden elektronenmikroskopisch untersucht. Sind hier intrazelluläre Ablagerungen (Ceroid-Lipofuszin) nachzuweisen, werden weitere molekularbiologische Untersuchungen hinsichtlich der CLN Variante durchgeführt. Bei Kindern im Schulalter weisen Vakuolen in Lymphozyten auf CLN3 hin, was über genetische Untersuchungen bestätigt werden muss. Erhärtet sich der Verdacht nicht, werden elektronenmikroskopische Untersuchungen von Fibroblasten durchgeführt um intrazelluläres Ceroid-Lipofuszin nachzuweisen. Daran schließen sich genetische Untersuchungen an, um den Gen-Defekt zu identifizieren (<http://ncl-netz.de/diagnostik.htm>). Etablierte Therapieschemata bestehen gegenwärtig aus palliativen Behandlungsansätzen. Wenige Patienten wurden zusätzlich im Rahmen von experimentellen Studien behandelt. Dabei wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Die Transplantation von Knochenmark zeigte keinen Erfolg (Lake *et al.*, 1995; Lonquist *et al.*, 2001). Stammzelltransplantationen werden im Rahmen von Studien bereits durchgeführt, jedoch können besonders die pathologischen Erscheinungen im neuronalen System derzeit nicht entscheidend positiv beeinflusst werden. Eine sehr frühe Transplantation wird als möglicher Lösungsansatz vorgeschlagen (Malatack *et al.*, 2003). Gentherapie-Ansätze werden in Studien verfolgt und bringen in Tiermodellen nachweisbare Verbesserungen auf zellulärer Ebene. In der Behandlung von Patienten wird sich deshalb derzeit auf die Gen-Therapie konzentriert. In Studien an menschlichen Patienten werden genetische Informationen für Enzyme (u.a. TPP1) mit Hilfe eines viralen Vektors direkt intracerebral injiziert mit dem Ziel, neuronalen Zellen korrekte genetische Informationen zur Verfügung zu stellen für die Generierung von fehlerfreien Enzymen und Proteinen (Selden *et al.*, 2013). Im Mausmodell konnten damit, z. T. in Kombination mit Knochenmarktransplantationen, bereits deutliche Anzeichen einer positiven Beeinflussung hinsichtlich zellulärer, histologischer und klinischer Befunde gezeigt werden (Macualey *et al.*, 2012). Im März 2016 vorab veröffentlichte Daten zeigen, dass bei 87% der Patienten, welche an eine Phase 2-Studie im Universitätsklinikum Hamburg teilgenommen haben, eine Verbesserung des klinischen Bildes durch eine intraventuläre Injektion von TPP1 erreicht werden konnte (<https://www.uke.de/dateien/einrichtungen/unternehmenskommunikation/dokumente/pressemitteilungen/kindliche-demenz/ncl/kindliche/demenz/pm20160303.pdf>). Für die Anwendung von Flupiritin, einem Nichtopioid-Analgetikum mit muskelrelaxierenden Eigenschaften, konnte bisher kein nachweisbarer Vorteil gezeigt werden (Cialone *et al.*, 2011). Nach bisherigen Studienergebnissen kann die Verabreichung von Mercaptamin (Cystagon®), einem Cysteamin-Bitartrat, bei wenigen Patienten eine leichte Verbesserung des klinischen Bildes bewirken. Eine Remission konnte jedoch in keinem Fall erreicht werden. Die abschließende Bewertung und Veröffentlichung der Ergebnisse der Interventionsstudie werden demnächst erwartet (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00028262>). Medikamentös werden für die einzelnen Symptome die verschiedenen in Tabelle 3 dargestellten Wirkstoffgruppen-Medikamente

verabreicht. Neben der medikamentösen Therapie stehen vor allem Bewegungstherapien als Behandlungsoption im Vordergrund. Ergotherapie, koordinationsschulende und soziotherapeutische Beschäftigungen wie Reiten und Tandemfahren stellen eine gute körperliche und geistige Förderung für die Patienten dar. Im fortgeschrittenen Stadium stellt der Erhalt der Lebensfunktionen das hauptsächliche Behandlungsziel dar, u.a durch parenterale Ernährung, sowie Linderung stark ausgeprägter Symptome. Im Verlauf kommt es zum stetigen geistigen Verfall, was sich z.T. durch Nahrungsverweigerung und durch eine Aspirationsneigung äußert, weswegen die beschriebenen Verfahrensweisen angewendet werden (PEG-Sonde, parenterale Ernährung). Eine besondere Herausforderung stellen der präpubertäre Erkrankungsbeginn sowie der Erkrankungsfortschritt in der Adoleszenz dar. Die durch den Patienten bewusst erlebte voranschreitende Erblindung und der zunehmende geistige Verfall stellen die Patienten, die Eltern, Lehrer und das private Umfeld in dieser Entwicklungsphase vor besondere Herausforderungen. Psychologische Hilfe und feste Integration des Patienten in das soziale Umfeld sind überaus wichtig. Gerade die Bewältigung der ohnehin schwierigen pubertären Entwicklungsphase ist im Rahmen des bewusst erlebten kognitiven und physischen Verfalls frustrationsgeprägt und bedarf besonderer Beachtung. Auch auf die Betreuung der Eltern und des privaten Umfelds ist bei möglicherweise langjähriger Konfrontation mit dem krankheitsbedingten Verfall des Patienten ebenfalls ein Augenmerk zu legen. Es existiert dahingehend bereits ein Netz an Selbsthilfvereinen und organisierter Betreuung in Deutschland.

Tab. 3: Medikamentöse Therapie bei CLN-Patienten.

Einsatzspektrum	Wirkstoffe/Präparate
Schmerzzustände	Orale Opioide (*Morphium®) Fentanylpflaster (*Durogesic®)
Spastik	Baclofen (*Lebic®)
Reduzierung von Grand-Mal-Anfällen, Erhöhung der Krampfschwelle	Lamotrigin (*Elmendos®) Valproat (*Ergenyl®)
Beruhigung und Schlafinduktion bei abendlicher Unruhe und allgemeinen Unruhezuständen	Chloralhydrat (*Chloralhydrat®)
Schwer ausgeprägte psychotische Zustände, Halluzinationen	Levomepromazin (*Levium®) Risperidon (*Risperdal®), Clozapin (*Elcrit®)

2. ZIELSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, spezifische monoklonale Antikörper gegen CLN6 zu generieren. Bisher gibt es nur Untersuchungen, in denen CLN6 auf Transkriptionsebene untersucht wurde. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine monoklonalen Antikörper gegen CLN6 verfügbar. Spezifische Antikörper gegen CLN6 können das Molekül auf Proteinebene detektieren und zum weiteren Verständnis der biochemischen Zusammenhänge beitragen, welches ggf. zukünftig für Therapieansätze genutzt werden kann.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 CHEMIKALIEN

Amidoschwarz (0,8%)	Merck, Darmstadt
2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure (6))-diammonium-Salz (ABTS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	SERVA GmbH, Heidelberg
Blockierungsreagenz für ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim
Bond Dewax Solution	Leica Biosystems, Nussloch
Bond Polymer Refine Detection	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Bond Waschpuffer	Leica Biosystems, Nussloch
Bromphenolblau	Feinchemie, Sebnitz
Citronensäure, Monohydrat	Chemapol, Prag
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie® Stain Solution R-250	Bio-Rad Laboratories, München
Digitonin	Roth, Karlsruhe
Essigsäure, 100%	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99,8%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Folin-Ciocalteu-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formalinlösung, 35%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutaraldehyd, 25%	SERVA-GmbH, Heidelberg
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Appllichem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Appllichem, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogentartrat	Merck, Darmstadt
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe

MOPS	Invitrogen, Karlsruhe
NADH ₂	Roche Diagnostics, Mannheim
NaOH	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumperborat, Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat, Pentahydrat	Fluka, Schwalbach
4-Nitrobluetetrazoliumchloride (NBT)	Roche Diagnostics, Mannheim
N- (N-(L-3-trans-carboxioxirane-2-carbonyl)- L-leucyl)-agmatine (E64)	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepton	Gibco, Paisly, Großbritannien
Yeast Extract	Gibco, Paisly, Großbritannien
PIC-Protease Inhibitor Cocktail-Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyethylenglycol (PEG1500)	Roche Diagnostics, Mannheim
Poly-L-Lysin	Roth, Karlsruhe
RNase A	QIAGEN, Hilden
Silbernitrat	Fluka, Schwalbach
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	SERVA, Heidelberg
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA
Streptavidin-HRP	Amersham, Freiburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	
1,2-Bis(dimethylamino)-ethane (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thimerosal	Fluka, Schwalbach
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	SERVA, Heidelberg
Tris-Glycin-Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tween®20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg
Nutridoma-CS (50x)	Roche Diagnostics, Penzberg

3.1.2 SONSTIGE MATERIALIEN

Ultrafiltration Membrane Regenerated Cellulose YM10	Millipore, Bedford, England
Amicon®Ultra-15 Centrifugal Filter Devices	Millipore, Bedford, England
Mikrotiterplatte Costar High binding, flat bottom	Bioscience, San Diego, USA
Nitrocellulose Membrane Hybond™-c-extra	Amersham, Heidelberg

Tracker Tapes RPN 2050 (10 x 15cm)	Amersham, Heidelberg
Hyperfilm™ ECL	Amersham, Heidelberg
NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Novex® Tris Glycin	Invitrogen, Karlsruhe
Native Tris –Glycine Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
New PageRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.3 MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Kulturmedium. RPMI 1640 (Gibco, Paisly, Großbritannien) mit HEPES (25 mM), L-Glutamin (2 mM), NaHCO₃ (2 mM), NaCl (90 mM), Gentamycin (80 mg/L) wurde für die Zellkulturen verwendet und ggf. mit HAT/HT (Hypoxanthin: 1×10^{-4} M, Aminopterin: 1×10^{-7} M, Thymidin 1×10^{-5} M) zur Anzucht und Selektion von Hybridomen versetzt. Das Medium enthielt 10% fetales Kälberserum (FKS), welches vorher 20 min bei 56°C hitzeinaktiviert wurde.

Zellkulturmaterialien. Für die Zellkultur wurden vorrangig Materialien der Firmen Biochrom, Invitrogen und Sigma-Aldrich verwendet. Freund's Adjuvans (komplett und inkomplett) wurde von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA bezogen.

Kulturbedingungen. 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂.

Für die Standardkultivierung von Zellkulturen wurde der Inkubator HERAcell® 150 von Heraeus® (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) verwendet.

3.1.4 ZELLINIEN

Es wurde mit den in Tabelle 4 aufgeführten Zellen bzw. Zelllinien gearbeitet.

3.1.5 ANTIKÖRPER

Primärantikörper gegen CLN6 wurden im Rahmen der Arbeiten generiert. Zusätzlich wurde zur Detektierung des endoplasmatischen Retikulums (ER) Kaninchen-anti-PDI als ER-Marker eingesetzt sowie Sekundärantikörper (vgl. Tab5).

Tab. 4: Zelllinien und Bakterienstämme.

P3X63Ag8.653	HAT-sensitive, murine Myelomzelle P3X63-Ag8.653. Es besteht bei dieser Zelllinie ein Defekt im <i>Salvage pathway</i> der Nukleotidsynthese. Zellen dieser Linie fehlt das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) (Kearny <i>et al.</i> , 1979) zur Resynthese von Nukleotiden. Somit kann bei Blockade des Haupt-Syntheseweges die Pyrimidin- und Purinsynthese nicht erfolgen.
PC-3	Entwickelt aus einem Adeno-Karzinom der humanen Prostata (Kaighn ME <i>et al.</i> , 1979).
HeLa	Zelllinie eines humanen Adeno-Karzinoms der Cervix uteri (Lorenz, Frederike, 2006).
HEK-293	Humane embryonale Zelllinie, welche durch Transfektion zur immortalisierten Zelllinie wurde (Harvey M. Shein <i>et al.</i> , 1962).
SkBr3	Zelllinie eines humanen Mamma-Adenokarzinoms (Fogh <i>et al.</i> , 1977, Osmak <i>et al.</i> , 1997).
SH-SY5Y	Humane Neuroblastom Zelllinie (Biedler <i>et al.</i> , 1978).
E. coli XL 1-Blue	E. coli –Stamm XL1-Blue ist besonders geeignet als Vektor-Zelle, bei denen aufgrund eines „Inserts“ die Sequenz für die Galaktosidase fehlt. Eine an den Zellstoffwechsel von Galaktose gekoppelte Farbreaktion der Zelle ist gehemmt, welche damit Zellen mit freien Vektoren anzeigt (Sambrook <i>et al.</i> , 1989, de Gregorio, Nicolaus, 2010).

Tab. 5: Eingesetzte Antikörper.

Primärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
anti-PDI	Kaninchen	Acris, Herford	1:1000
Sekundärantikörper			
anti-Maus-IgG, Fcγ-spezifisch, HRP-markiert	Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:5000 - 1:10000
anti-Maus-IgG (H+L), Cy3-markiert	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	1:400 - 1:600
anti-Maus-IgG, Alexa 488-markiert	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	1:400 - 1:600

3.1.6 PROTEINE UND PEPTIDE

Tab. 6: Verwendete Peptide und Proteine.

Rekombinante Proteine	Größe	MM	Hersteller
CLN6, mit GST-Tag	551 AS	62,9 kDa	Abnova, Taiwan
Peptide	Sequenz	Anzahl AS	Hersteller
synthetische CLN6-Peptide	-MEATRRRQHLGATG-	14	EMC, Tübingen
(als PamCys- oder als Lysin-Peptide)	-NPIIKNLKPETLID-	14	
	-WVAWLWNDPVLRRKYP-	16	

3.2. GENERIERUNG MURINER MONOKLONALER ANTIKÖRPER

3.2.1 PRINZIP DER GENERIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER UND SELEKTION VON HYBRIDOMZELLEN

Zur Generierung monoklonaler Antikörper wurde ein 1975 von Köhler und Milstein vorgestelltes Prinzip angewendet (Köhler & Milstein, 1975). Milzzellen, welche Antikörper gegen ein gewünschtes Antigen produzieren, werden mit Myelomzellen P3X63Ag8.653 fusioniert. Danach weist die generierte Zelle die von der Milzzelle erlangte Eigenschaft der Antikörperbildung auf, gepaart mit der für die Tumorzelle typischen, unendlichen Teilungsfähigkeit. Durch die Blockade des Hauptstoffwechselwegs der Nukleotidsynthese im HAT-Medium sterben nicht fusionierte Myelomzellen aufgrund des defekten Reservestoffwechselwegs der Purin- und Pyrimidin-Biosynthese (HGPRT) ab und führen somit zur Selektion von Hybridomen. Das im HAT-Medium enthaltene Thymidin und Hypoxanthin wird von den Hybridomzellen zur Pyrimidin- und Purinsynthese über den HGPRT-Syntheseweg genutzt, denn sie verfügen über den *Salvage-Pathway* für die Pyrimidin- und Purin-Wiederverwertung (Peters J. & Gieseler R, 1990).

3.2.2 ANTIGEN

Bei den Antigenen, welche zur Immunisierung der Mäuse verwendet wurden, handelte es sich um Peptide der bekannten humanen CLN6 AS-Sequenz. Hinsichtlich möglicher Angriffspunkte für Antikörper gegen CLN6-Sequenzabschnitte wurden Abschnitte ausgewählt, die auf der Außenseite der ER-Membran liegen. Sequenzhomologien mit anderen Proteinen mussten weitestgehend ausgeschlossen werden. Besonders galt dies für Proteine der CLN-Familie. Zum Ausschluss von Homologien zwischen den Sequenzen der ausgewählten Peptide und der Sequenzen bekannter Proteine der CLN-Gruppe wurden verschiedene Datenbanken genutzt (u.a. Vergleichsprogramm der Rothen AG). Die ausgewählten Peptide wurden durch die Firma EMC microcollections aus Tübingen hergestellt.

3.2.3 TIERE UND TIERHALTUNG

Es wurden BALB/c-Mäuse aus hauseigener Zucht verwendet. Die Tiere wurden in Zweier- bis

Fünfergruppen in Macrolonkäfigen gehalten. Sie wurden mit handelsüblichem Futter für Mäuse sowie Wasser ernährt. Beides wurde ad libitum verabreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 Mäuse zur Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet. Dabei wurde streng auf die im Tierschutzgesetz vorgegebenen Haltungsvorschriften und die Verfahrensweisen geachtet.

3.2.4 IMMUNISIERUNG

Zur Immunisierung der Mäuse für die Antikörpergenerierung müssen die entsprechenden Antigene dem Immunsystem präsentiert werden. An Carrier gekoppelte Antigene sind deutlich immunogener als ungekoppelte Antigene. Als Carrier stehen neben Thyreoglobulin, polymeren Harzen, sowie Aminosäuren, noch eine Reihe weiterer Substanzen zur Verfügung (Jennings, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurden PamCys-gekoppelte Peptide eingesetzt (vgl. Abb.3).

Mit diesem Lipopeptid war im Vergleich zu anderen Adjuvantien eine stärkere Immunantwort zu erwarten (Kellner *et al.*, 1992). In den anschließenden Boosterungen wurden ebenfalls die an PamCys gekoppelten Peptide verwendet. Jede Maus erhielt mit der Erstimmunisierung 25 µg jedes gekoppelten CLN6-Peptids als Gemisch. Die verabreichte Emulsion bestand aus einer Mischung von 2 Fraktionen:

1. Peptide gelöst in 200 µL NaCl (0,154 M) und
2. 300 µL komplettes Freund's Adjuvans.

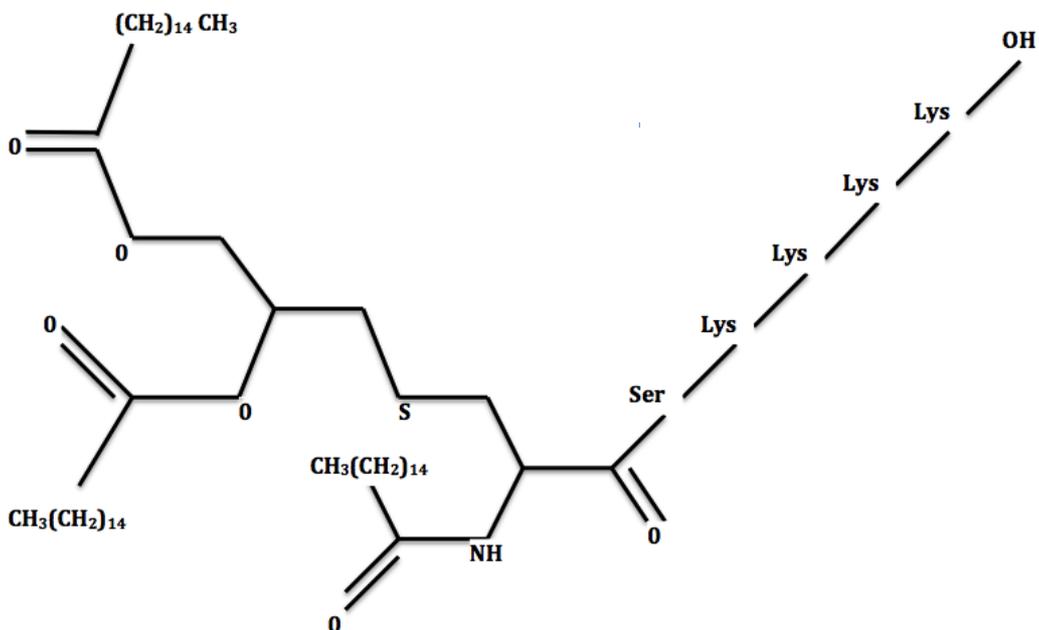


Abb. 3. Strukturformel des Lipopeptids PamCys.

Beide Bestandteile wurden mittels Vortexer mindestens 10 Minuten gut gemischt bis eine Emulsion entstand. Jede Maus erhielt 0,5 mL der Emulsion intraperitoneal injiziert. Nach 6 Wochen erhielt jede Maus noch einmal 20 µg der CLN6-Peptide mit inkomplettem Adjuvans.

Nach weiteren 2 Wochen fand eine Titer-Kontrolle statt und es wurde in Abhängigkeit von der Höhe des spezifischen Titers eine zweite Auffrischung mit Injektionen von 20 µg der in NaCl gelösten CLN6-Peptide pro Maus vorgenommen. Die Boosterung fand 1 Tag vor der Milzentnahme statt. Die Immunantwort wurde mittels eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) überprüft.

3.2.5 GEWINNUNG VON FEEDERZELLEN

Makrophagen haben vielfältige Eigenschaften, welche in der Zellkultur nutzbar sind. Sie phagozytieren Zelltrümmer und sezernieren proliferationsfördernde Faktoren, unter anderem B-Zell-stimmulierendes IL6. So konnte gezeigt werden, dass IL6 beim multiplen Myelom die Proliferation begünstigt (Kishimoto T., 1989). Die Makrophagen wurden aus dem Bauchraum einer Maus gewonnen. Der Bauchraum wurde inzidiert und der Peritonealraum mit HAT-Medium gespült. Die im wiedergewonnenen Medium befindlichen Makrophagen wurden isoliert gezählt und auf $1 \times 10^6/5$ mL RPMI 1640 eingestellt. 100 µL der Makrophagensuspension wurden in jede der 96 Kavitäten der Zellkulturplatten gegeben.

3.2.6 FUSION

Es wurden 4 Flaschen mit 50 mL RPMI 1640-Medium mit Myelomzellen P3X63Ag8.653 beschickt. Versorgt wurde mit RPMI 1640-Medium mit FKS (10%) 3 Tage und 1 Tag vor der Fusion, damit sich die Myelomzellen am Fusionstag in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Vorbereitend wurden die Tumorzellen am Fusionstag 4 x mit FKS-freiem Medium gewaschen und zur Reduzierung der Erythrozyten im Milzgewebe der Maus fand ca. 30 Minuten vor Entfernung der Milz eine Blutentnahme aus der Schwanzvene statt. Es wurden dabei ca. 0,5 mL Blut gewonnen. Nach Lagerung des geronnenen Blutes über Nacht bei 4°C wurde die Probe bei 3500 x g zentrifugiert und das gewonnene Serum zur weiteren Verwendung bei -20°C kryokonserviert. Die Mäuse wurden mit CO₂ eingeschläfert und das murine Abdomen unter sterilen Bedingungen mit einem medianen Schnitt geöffnet und die Milz freigelegt. Die Milzzellen wurden aus der Kapsel mit 2 x 10 mL sterilem RPMI 1640-Medium ohne FKS in einer sterilen 6 cm- Petrischale herausgespült. Die in der Suspension enthaltenen Milzzellen wurden isoliert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Danach wurden die Milzzellen 3 x gewaschen. Für die anschließende Fusion wurden diese Zellen und Zellen der Myelomzelllinie P3X63Ag8.653 im Verhältnis 1:2 in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben.

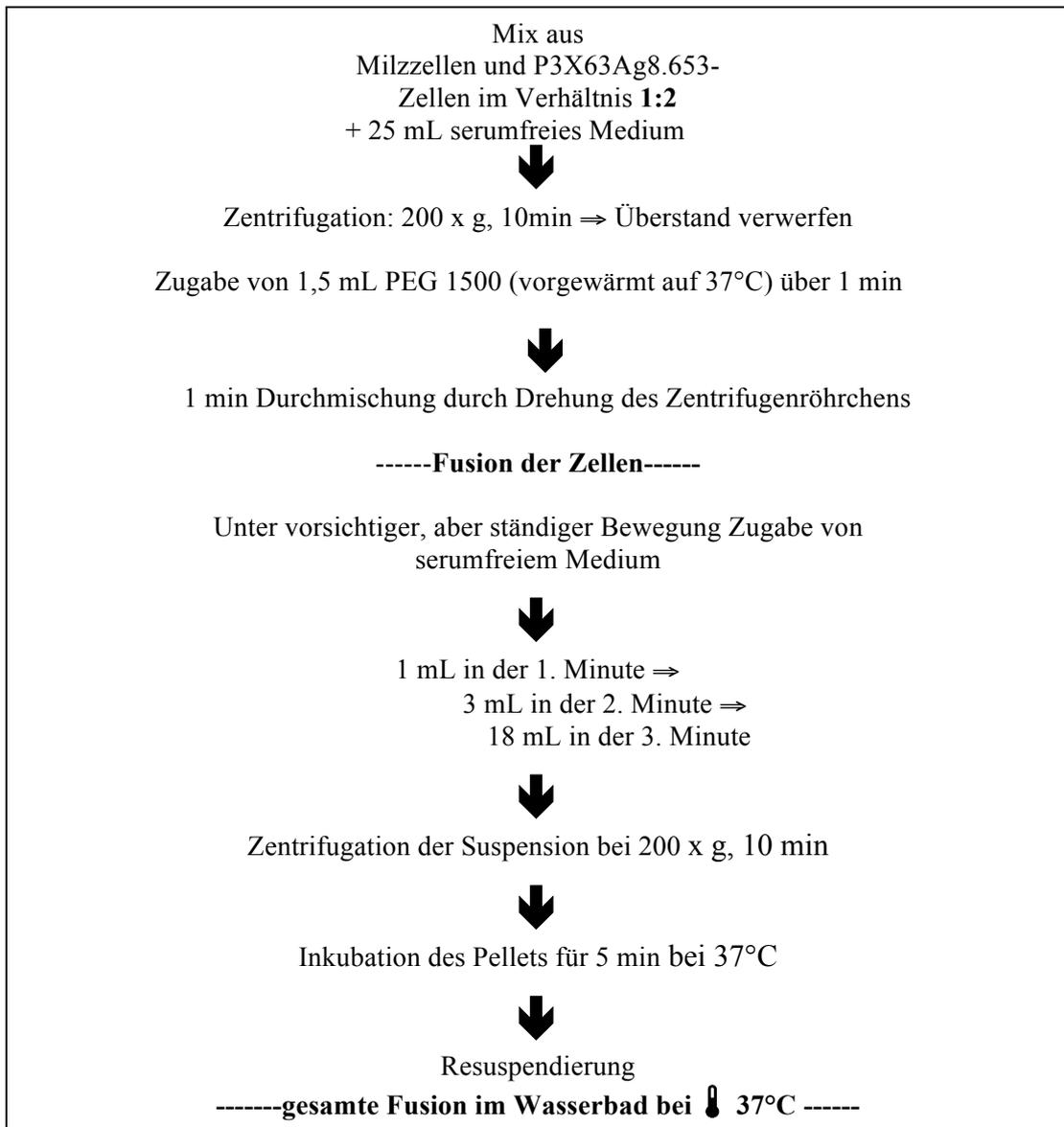


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Zellfusion.

25 ml serumfreies Medium (37°C) wurden dem Gemisch aus Milzzellen und P3X63Ag8.653-Myelomzellen beigefügt. Bei 200 x g wurde das Gemisch aus Milz- und Myelomzellen für 10 min sedimentiert. Das gewonnene Pellet ist im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert worden. Anschließend wurden innerhalb 1 min 1,5 mL PEG 1500 (37°C) in das Pellet kontinuierlich zugegeben und dabei das Gefäß vorsichtig gedreht. Nach Beendigung der PEG-Zugabe, wurde das Gefäß im Wasserbad noch eine weitere Minute gedreht. Das vorgewärmte Medium RPMI 1640 wurde anschließend, wie im Schema (Abb. 4) dargestellt, hinzugegeben. Anschließend wurde bei 200 x g zentrifugiert. Bevor der Überstand entfernt wurde, sind die Zellen für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert worden. Das Pellet wurde anschließend vorsichtig in 8 mL HAT-Medium resuspendiert. 1 mL dieser Zellsuspension wurde mit 39 mL Medium RPMI 1640 verdünnt. Diese Suspension wurde in 4 mit Makrophagen vorbeschichteten 96 well-Zellkulturplatten (50 µL pro Kavität) ausplattiert, welche als Mutterplatten bezeichnet wurden. Nicht sofort kultivierte Zellfusionsprodukte wurden kryokonserviert.

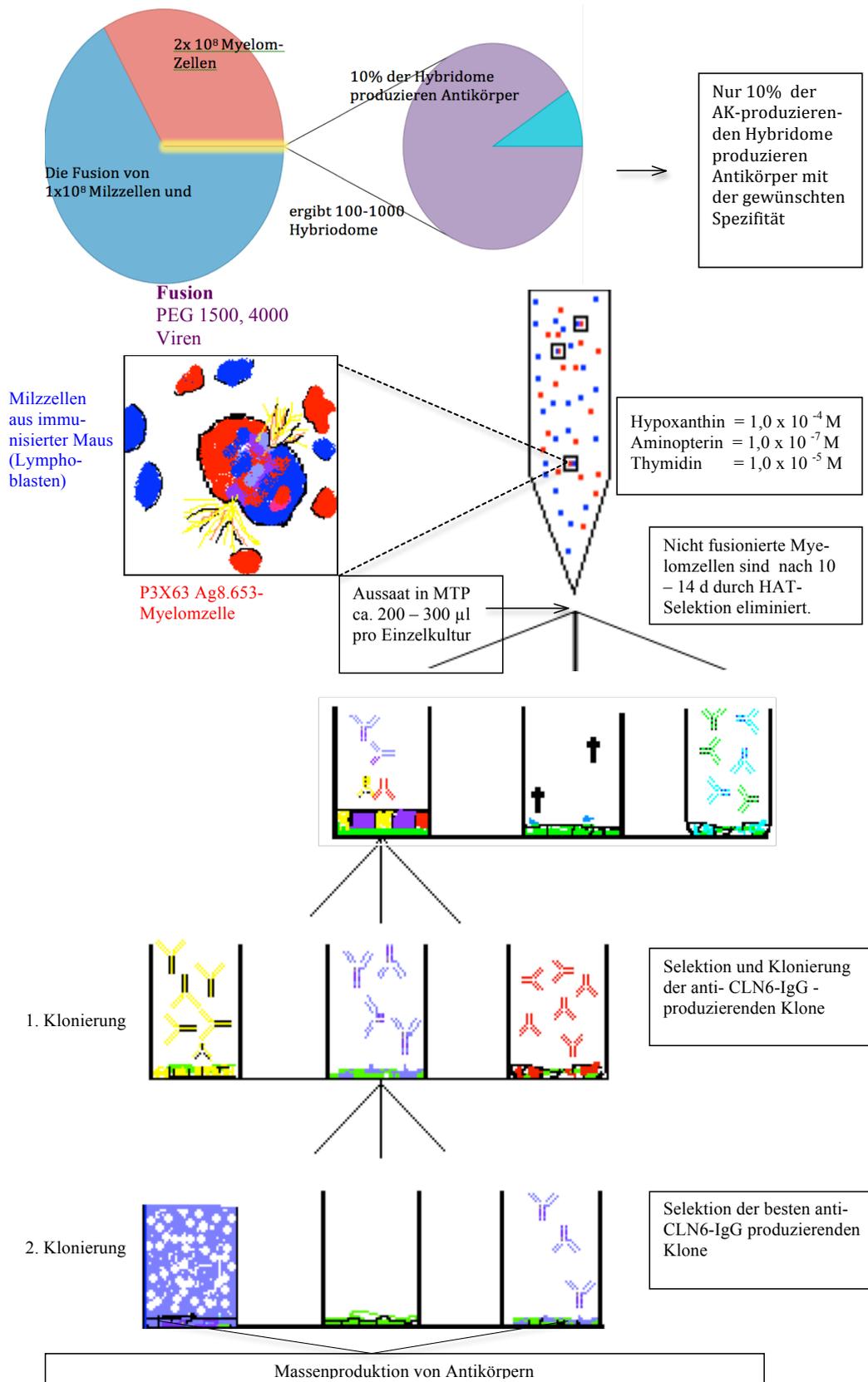


Abb. 5: Schematische Darstellung des Prinzips der Generierung monoklonaler Antikörper.

3.2.7 KLONIERUNG UND NOMENKLATUR

Nach 2-wöchiger Kultivierung der Mutterplatten wurden die Kavitäten auf spezifische CLN6-Antikörper-produzierende Hybridome im ELISA getestet. Um unerwünschte IgM-produzierende Hybridome zu eliminieren, wurde in den ELISAs ausnahmslos gegen den Fc γ -Teil der IgG getestet. Wurden in den einzelnen Kavitäten Zellkulturüberstände im indirekten ELISA positiv getestet, war von einem oder mehreren Klonen auszugehen, welche Anti-CLN6-AK produzieren. Um die Möglichkeit auszuschließen, mehrere Klone aus einer Kavität weiter zu kultivieren, wurden mittels *limiting dilution* Hybridome vereinzelt und damit kloniert. Nach ca. 14 Tagen Zellkultur in HAT-Medium war von einer völligen Eliminierung nicht fusionierter Myelom-Zellen auszugehen und es wurde auf HT-Medium umgestellt. Für die Klonierung in einer 96 well-Mikrotiter-Platte wurden pro Kavität 100 μ L Medium vorgelegt. In die erste Kavität wurden dann 100 μ L der Zellsuspension pipettiert. Nach Mischung mit den 100 μ L des vorgelegten Mediums wurden 100 μ L entnommen und in die nächste Kavität der Reihe überführt. Dies wurde identisch weitergeführt bis statistisch eine Vereinzelung der Zellen erreicht war.

Die Zellen wurden 2 Wochen mit HAT-Medium unter Zusatz von CS-Nutridoma Cloning Medium versorgt, um so weiterhin nur fusionierten Zellen ein Wachstum zu ermöglichen. Nach 2 Wochen konnte auf ein HT-Medium ohne Aminopterin, nach weiteren 7 Tagen auf Standard-Medium mit FKS (10%) umgestellt werden. Nach 2 Wochen wurden die in Kultur befindlichen Klone im ELISA auf spezifische Anti-CLN6-Antikörper kontrolliert. Positive Klone wurden ein zweites Mal kloniert. Die Klone, die anti-CLN6-Antikörper produzierten, wurden schrittweise in 24 well- und 6 well-Platten, später auch in Zellkulturflaschen von bis zu 500 mL Volumen umgesetzt. Schlecht wachsende oder nur wenig Antikörper-produzierende Klone wurden subkloniert, indem sie in Konzentrationen von 1 bis 10 Zellen pro Kavität in einer 96 well-Platte ausgesät und von diesen Klonen nur die am besten wachsenden und Antikörper produzierenden Zellen weiter kultiviert wurden. Die Nomenklatur der Klone erfolgte durch eine Zahlen-Buchstabenkombination. Am Anfang steht das Antigen, welches der Antikörper erkennt. Es folgt die Nummer der Fusion, welche in der Arbeitsgruppe fortlaufend nummeriert werden und anschließend die Nummer der Mutterplatte, auf welcher der Klon erstmalig nachgewiesen wurde. Danach wurden die genauen Koordinaten der Kavität angegeben. So entspricht Klon „CLN6-201-1D10“ der 1. Platte mit den Koordinaten D10 und er entstammte der 201. Fusion der Arbeitsgruppe.

3.3 KULTIVIERUNG UND KONSERVIERUNG VON ZELLINIEN

3.3.1 KULTIVIERUNG VON HYBRIDOMZELLEN UND TUMORZELLEN

Schnelles Auftauen der Zelllinien verhinderte schädigende Wirkungen des DMSO-Einfriermediums. Die Zellen wurden aus dem Einfriergefäß unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen überführt, gefüllt mit 250 mL RPMI 1640. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde mit den in Tab. 4 aufgeführten Zelllinien gearbeitet. Bei 80% Zellkonfluenz wurden die adhärenen Zellen mechanisch gelöst, in Kulturmedium resuspendiert und erneut kultiviert. Für die weitere Verwendung wurden die Tumorzellen mit PBS gewaschen oder ggf. der Kryokonservierung zugeführt.

3.3.2 KRYOKONSERVIERUNG

Von den nicht sofort benötigten Fusionsprodukten oder Zellen wurden 1×10^6 Zellen pro mL in Einfriereröhrchen gefüllt und mit 1 mL Einfriermedium (90 % [v/v] FKS und 10 % [v/v] DMSO) versetzt und schonend in einer Thermobox bei -196°C eingefroren. Dadurch konnte eine Temperaturabsenkung von ca. 1°C pro Minute erreicht werden. Beim Auftauen von kryokonservierten Zellen wurde in ein 15 mL -Zentrifugenröhrchen HAT-Medium vorgelegt. Die eingefrorenen Klone sind bei 37°C schnell aufgetaut worden und wurden in das vorbereitete HAT-Medium getropft. Nach Zentrifugation bei $300 \times g$ wurde der Überstand verworfen. Das Pellet ist mit 1 mL Medium resuspendiert worden und wurde in ein vorbereitetes Kölbchen mit HAT-Medium überführt.

3.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

3.4.1 ANTIKÖRPER-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

1987 konnte gezeigt werden, dass bestimmte bakterielle Proteine eine besonders ausgeprägte Affinität für Immunglobuline aufweisen (Nilson *et al.*, 1987). Zum Beispiel bilden Streptokokken der Serogruppe G das Protein G (47,5 kDa), welches aus 448 Aminosäuren aufgebaut ist (Uniprot P06654). Es besitzt am C-Terminus 2 oder 3 homologe Bindungsdomänen (Typ III Fc-Rezeptor) mit besonderer Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen, insbesondere zur Fc-Region des IgG. Die ebenfalls ausgeprägte Affinität des nativen Protein G zum Albumin konnte im rekombinanten Protein G (35kDa) deutlich reduziert werden, bei gleichzeitig erhaltener Affinität zum Fc-Teil der IgG. Durch Kopplung von Fc-Region-affinem Protein G an Sepharose ist es möglich, Antikörper mit Hilfe der Affinitätschromatographie zu binden und so aufzureinigen (Akerström *et al.*, 1985). Die verwendete Protein G-Sepharose weist eine Bindungskapazität von 25 mg humanem oder 7 mg murinem IgG pro mL Protein G-Sepharose auf. Für die Affinitätsreinigung der murinen Antikörper aus Zellkulturüberständen, wurde das *Low Pressure Liquid Chromatography System* (Bio-Rad Laboratories, München) verwendet. Die durch die Hybridomzellen gebildeten Antikörper wurden in das Zellkulturmedium abgegeben. Bei Durchfluss der gesammelten Hybridomkulturüberstände durch eine mit Protein G-Sepharose beladene Säule

werden die murinen IgG an das Protein gebunden, während andere Proteine und Substanzen nicht gebunden werden.

Tab. 7: Protein G-Affinitätschromatographie: Puffer.

Startpuffer	Neutralisationspuffer	Elutionspuffer
20 mM Na-Phosphatpuffer, (pH 7,0)	1 M Tris-HCl, (pH 9,0)	0,1 M Glycin-HCl, (pH 2,7)

Eine mit Protein G-Sepharose gefüllte Säule (1 ml) wurde mit 10 mL Startpuffer äquilibriert. Der gesammelte Zellkulturüberstand wurde bei 7000 x g für 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist mit dem 5 fachen Volumen Startpuffer (pH 7,0) verdünnt worden, bevor das Gemisch mit 1 mL pro Minute durch die mit Protein G-Sepharose geladene Säule gepumpt wurde. Nach Durchlauf der Probe wurde die Säule mit Startpuffer gespült. Unspezifisch gebundene Proteine wurden so weitestgehend entfernt. Die Elution der Immunglobuline erfolgte mit Glycin-HCl-Puffer (pH 2,7). Die eluierten Antikörper wurden in 50 µL Neutralisationspuffer (pH 9,0) fraktioniert aufgefangen. Die Elution des Antikörpers wurde photometrisch bei 278 nm registriert und dokumentiert. Das Eluat wurde bei 4°C für 48 h gegen PBS (pH 7,4) dialysiert (siehe Pufferlösungen in Abb. 7).

3.4.2 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die 1976 von M. Bradford (Bradford M, 1976) vorgestellte Methode der quantitativen Konzentrationsbestimmung von in Lösung befindlichen Proteinen beruht auf einer Veränderung des Absorptionsmaximums des Coomassie Brilliant Blau G-250 in Abhängigkeit von seiner Bindung an Proteine. Das Maximum der Absorption befindet sich bei Bindung an Proteine im Bereich von 595 nm (rot-braun) und ohne Bindung an Proteine bei einer Wellenlänge von 465 nm (blau). Es wurde der *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, München) nach Bradford verwendet. 10 µL Proteinlösung und 490 µL 1:5 verdünntes Dye-Reagenz wurden eingesetzt. Die Inkubation dauerte 5 min und danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Standardkurve wurde mit bovinem Gammaglobulin (0,04 mg/mL bis 1,34 mg/mL) erstellt. Zur Einstellung einer standardisierten Konzentration musste der gereinigte Antikörper eingeeengt bzw. verdünnt werden. Durch 15- bis 30-minütige Zentrifugation bei 5000 x g in *Amicon*® *ultra-15 50000* NMWL Zentrifugenröhrchen, bzw. durch Verdünnen mit PBS, wurde die Konzentration der Antikörper auf 1 mg/mL eingestellt. Durch Zugabe von Thimerosal (0,01%) ist die Konservierung über Monate möglich.

3.4.3 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Der indirekte ELISA (Tab. 8) wurde im Rahmen des Nachweises von IgG-produzierenden Hybridomzellen verwendet.

Tab. 8: Indirekter ELISA: Nachweis spezifischer anti-CLN6-mAk.

Ablauf		Puffer
Beschichtung Waschen	50 µL pro Kavität synthetischer CLN6-Peptide gelöst in TBS (5 µg/mL TBS) (über Nacht bei 4°C) 3 x mit Spülpuffer	TBS 20 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl (pH 7,5)
Blockierung Waschen	200 µL Blocklösung pro Kavität (30 min Raumtemperatur) 3 x mit Spülpuffer	Spülpuffer NaCl-Tween® 154 mM NaCl Tween® 20 (2% [v/v])
1. Immunreaktion Waschen	20 µL ELISA-Puffer vorlegen plus 30 µL Hybridom-Kulturüberstand pro Kavität (90 min, Raumtemperatur) 3 x Spülpuffer	ELISA-Puffer Tween® 20 (0,05% [v/v]) in TBS (pH 7,5)
2. Immunreaktion Waschen	50 µL pro Kavität anti-Maus-IgG-Fcγ-HRP (1:5000) gelöst in ELISA-Puffer (60 min, Raumtemperatur) 3 x Spülpuffer	Block-Puffer 3 g Magermilchpulver, 0,5 % Triton X-100 in 100 mL Spülpuffer
Quantifizierung Messwellenlänge 405 nm	50 µL pro Kavität ABTS-Chromogen-Lösung (45 min Raumtemperatur) Nachweis des Immunkomplexes	Substrat-Puffer 3,25 mM Na-Perborat 39,8 mM 2-Hydroxypropan-1,2,3-Tricarbonsäure, 60 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 4,4)

3.4.4 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wurde ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem gewählt (Laemmli, 1970). Durch den Molekularsiebeffekt kommt es in der Polyacrylamidmatrix zu einer Auftrennung der Proteinfractionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Mol-Massen. Zur Vorbereitung der Probe erfolgte die Zugabe von SDS-Probenpuffer (10% Glycerol[v/v]; 2,3% SDS [w/v]; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8). Danach wurden die Proben auf 95°C für 5 min erhitzt und damit die Proteine denaturiert. Zur Trennung von Disulfidbrücken wurde den Proben Mercaptoethanol (10 % [v/v]) hinzugefügt. Es wurden Gelelektrophoresen mit Probenauftragung über die gesamte Breite des Gels durchgeführt, sowie Auftrennungen von in Geltaschen aufgetragenen Proben. Bei Auftragung über die gesamte Breite wurden 500 µL Probe verwendet und für eine einzelne Geltasche 50 µL. Die Gele hatten unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen (7,5 bzw. 15% für die Trenngele und 5% für das Sammelgel (vgl. Tab 9 a). Die Auftrennung erfolgte unter den in Tab. 9 b dargestellten Bedingungen.

Tab. 9: Gelelektrophorese nach Laemmli: Reagenzien a) und Laufbedingungen. b).

a) Reagenzien	Sammelgel	Trenngel, 15,0 %	Trenngel, 7,5 %	b) Laufbedingungen
Acrylamid-Lösung Acrylamid 30 %; Bisacrylamid 0,8 %	1,5 mL	15 mL	7,5 mL	
Trenngelpuffer 1,5 M Tris / HCl (pH 8,8)		7,5 mL	7,5 mL	
Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/ HCl (pH 6,8)	2,5 mL			
Aqua dest.	6,0 mL	7,5ml	15 mL	
TEMED	10 µL	20 mL	20 µL	
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	60 µL	100 µL	100 µL	

Zeit: 90 min
Stromstärke: 20 mA
Puffer: 25 mM/200 mM
Tris-Glycin-Puffer
(pH 6,8)

3.4.5 NUPAGE®-GEL-SYSTEM

Es wurden auch NuPAGE®-Gradienten Gele der Firma Invitrogen verwendet. Durch die Verwendung von Gradientengelen wurde eine schärfere Trennung der Proteine in einem breiten Molmassenbereich möglich. Die Acrylamid-Konzentration lag zwischen 4 und 12 %. Es wurde im 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)-Puffer-System (pH 7,0) geblottet. Es wurde eine konstante Spannung von 200 V angelegt.

3.4.6 IMMUNOBLOT-ANALYSE

Der spezifische Nachweis von Proteinen nach elektrophoretischer Auftrennung gelingt mittels Immunoblot-Analyse. Die auf Towbin zurückgehende Methode (Towbin *et al.*, 1979) beruht auf der Visualisierung von Proteinen, welche nach Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen abgelagert werden. Es wurde dafür auf ein Tank-Blot-System (*Trans-Blot®*, *Electrophoretic System*, Bio-Rad, München) zurückgegriffen. Bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA wurde für 90 min im Eisbad geblottet. Der Transfer der Proteine wurde mit einer 2% Ponceau-Lösung überprüft. Anschließend wurden freie Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran für 1h mit Magermilchpulver in TBS 3% [w/v] mit 0,5% Triton-X-100 blockiert. Die Membran wurde mit dem Primäantikörper (1:50 in TBS) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3x mit TBS gewaschen und der in TBS gelöste HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde für 1 h auf die Membran gegeben. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Antikörper wurde die Nitrozellulose 3x gewaschen. Zum Nachweis eines Immunkomplexes wurde die Membran mit dem *Lumi-Light Immunoblotting Substrate* nach Herstellerangaben behandelt. Für die Nitro-Blue-Tetrazolium-Entwicklung wurde die Membran anschließend mittels TBS-Waschung von anhaftenden Lumineszenz-Reagenzien befreit. Es wurden 6 mg Nitro-Blue-Tetrazolium und 20 mg NADH₂ in je 10 mL TBS gelöst und im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach Zugabe von 10

μL Phenol und $10 \mu\text{L}$ H_2O_2 wurde die Membran unter Lichtausschluss für 7 Minuten entwickelt. Abgestoppt wurde die Reaktion mit der Zugabe von Leitungswasser. Ein Film (Hyperfilm) dokumentierte die Chemolumineszenz-Reaktion.

3.5 IMMUNZYTLOGIE

Die immunzytochemischen Untersuchungen wurden an einer Mamma-Karzinom-Zelllinie (SkBr3) durchgeführt. Es wurden Objektträger in sterilen Petrischalen platziert und mit je 1 mL Polylysin beschichtet und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Spülung der Objektträger mit Medium wurden die Zellen darauf ausgesät. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank waren die Objektträger mit Tumorzellen zu ca. 60 - 80% bewachsen. Danach wurde die Objektträger vorsichtig mit PBS gespült. Die Objektträger wurden mit $1000 \mu\text{L}$ einer PFA-Lösung (4%) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zur Zellfixierung benetzt. Die PFA-Wirkung wurde mit der Zugabe einer Glycinlösung abgestoppt. Nach Entfernung der Glycinlösung wurden die Zellen und die Zellorganellen durch Zugabe von 0,5% Triton in PBS für 20 min bei RT permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen mit 1% [v/v] Magermilch/PBS blockiert. $20 \mu\text{L}$ des gereinigten und in PBS gelösten Antikörpers wurden in den entsprechenden Verdünnungen aufgetragen und die Objektträger sind für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert worden. Nicht gebundene Antikörper wurden mit einer Magermilchspülung 1% [v/v] abgewaschen und danach der Sekundäantikörper (Alexa 488/Cy3-markiert) gelöst in Magermilch 1% [v/v]/ PBS aufgetragen. Die Reaktion erfolgte unter Lichtausschluss. Die anschließende Entwässerung der Präparate wurde durch Zugabe von Ethanol (96%) und Fixierung mit Mowiol (5% Mowiol [w/v] 30% Glycerol [v/v] 0,25% DABCO [w/v]) erreicht. Die Aushärtung erfolgte bei 4°C . Das Eindeckelungsmedium enthielt Hoechst 33258 für die Färbung der Zellkerne. Die Anfertigung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit einem Nikon Eclipse E 600 Mikroskop und einer Vosskühler CCD-1300-QLN-Kamera mit Apo TIRF-Objektiv (60 x/1,49 in Öl). Aufnahme und Speicherung erfolgten mit NIS-Elements AR 2.30 MuTech MV 1500, Lucia G/F Version 4.71.

Tab. 10: Immunzytologie: Reagenzien.

Poly-Lysin-Bromid 0,5 mg/mL Rabbit anti-human PDI AK P4HB Paraformaldehyd 4 % in PBS 50 mM Glycinlösung (PBS) Rabbit anti-Mouse IgG-Antibody, Cy3 conjugate	Magermilch 1% [v/v] in PBS anti-Rabbit-AK, Alexa- 488 Hoechst 33258
---	---

3.6 IMMUNHISTOLOGIE

3.6.1 IMMUNHISTOLOGISCHES VERFAHREN

Durch immunhistologische Färbungen und Untersuchungen können spezifische chemische Verbindungen insbesondere Peptide und Proteine sowie andere Strukturen in histologischen

Präparaten durch eine Antigen-Antikörper Reaktion nachgewiesen werden (Welsch, 2003). In den immunhistologischen Untersuchungen wurde der an das Antigen gebundene Antikörper CLN6-201-1D10 mit einem sekundären Antikörper anhand dessen Farbreaktion mit DAB und Hematoxylin visualisiert. Die verwendeten Präparate wurden aus dem Routine-Eingangsmaterial ausgewählt. Die OP-Präparate wurden mindestens 24h in gepufferter Formalinlösung fixiert. Danach wurde das zugeschnittene Gewebe im Einbettautomaten entwässert und in 60°C warmen Paraffin in Histokassetten eingebettet, geschnitten und auf Objektträger aufgezogen, bevor die Färbung automatisiert und reproduzierbar (Bond Max von Leica) durchgeführt wurde. Die Auswertung erfolgte am Durchlichtmikroskop. Die Präparate wurden vom Institut für Pathologie des Krankenhauses Martha-Maria Halle/Dörlau bereitgestellt.

3.6.2 AUSWAHL DER PRÄPARATE

Unter Berücksichtigung, dass Lipofuszinosen zur intrazellulären Speicherung proteolipoider Substanzen führen, könnte hypothetisch angenommen werden, dass die funktionellen Schwerpunkte der CLN-Proteine im Fett- oder Protein-Stoffwechsel liegen. Aufgrund dieser Annahme und des positiven immunzytochemischen Nachweises in der Mamma-CA-Zelllinie SkBr3 wurde die weibliche Brust für die immunhistologischen Untersuchungen ausgewählt. Daneben wurden weitere Gewebe ausgewählt, welche einerseits Funktionen im Lipid/Protein-Stoffwechsel aufweisen (Laktation der Mamma, Talgproduktion der Haut) und andererseits primär diese Funktion nicht haben. Deshalb wurden Gewebeschnitte der Haut und der weiblichen Brust herangezogen und diese vergleichend mit Gewebe der Glandula Parotis, des Magens, der Haut, der Hypophyse und des Colons immunhistologisch untersucht. Außerdem wurde cerebrales Gewebe des Kleinhirns aus Autopsiepräparationen verwendet, da Hirngewebe eine umfangreiche histologische Degeneration im Krankheitsverlauf aufweist. Daneben wurde auch Gewebe aus Niere, Skelettmuskel und Leber untersucht, da hier verstärkt Fragmente der CLN6-DNA nachgewiesen wurden (Gao *et al.*, 2002, Wheeler *et al* 2002).

3.6.3 ABLAUF DER IMMUNHISTOLOGIE

<ul style="list-style-type: none"> • Aufziehen der 5µm-Schnitte auf mit Gewebekleber beschichtete Objektträger (OT) 	<ul style="list-style-type: none"> • Trocknung bei 60°C (20 min)
--	--

Einlage in den Bond-Max-Immunfärbeautomaten

<ul style="list-style-type: none"> • Dewax Solution bei 72°C 3x • Entparaffinierung mit Isopropanol 3x • Bond wash solution 3x • Epitope Retrieval Solution 2 bei 100°C (1x 20 min) • Bond Wash Solution (3x 2 min) • Peroxidase Block (1x 5 min) • Bond Wash Solution (3x 2 min) • Primärantikörper 1D10 1:50 (1x 20 min) • Bond Wash Solution (1x 5 min) • Post Primary Solution (1x 8 min) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bond Wash Solution (3x 2 min) • Polymer Solution (1x 8 min) • Bond Wash Solution (2x 2 min) • Bond Wash Solution (3x 2 min) • Polymer Solution (1x 8 min) • Bond Wash Solution (2x 2 min) • Aqua dest.-Spülung • Mixed DAB Refine Solution (1x 10 min) • Aqua dest. -Spülung • Hematoxylin (1x 3 min) • Aqua dest.-Spülung (1x 3 min) • Bond Wash Solution • Aqua dest. Spülung
---	---

3.7 METHODEN DES ZELLAUFSCHLUSSES

Die Zellpermeabilisierung soll den Nachweis von Proteinen ermöglichen, welche in Membranen oder im Zytosol lokalisiert sind. Durch Permeabilisierung von Membranen der Zelle und der Zellorganellen werden intrazelluläre Proteine für Antikörper zugänglich. Es wurden mehrere Zellaufschlussverfahren im Rahmen der Untersuchungen angewendet.

3.7.1 ZELLAUFSCHLUSS MIT LYSIS-PUFFER

Durch das nichtionische Reagenz Triton X-100 können Zellmembranen permeabilisiert werden. Das durch Zentrifugation konzentrierte Zellpellet wurde mit PBS 3 x gewaschen und danach mit 4 mL Lysispuffer versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation stand der Überstand für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Tab. 11: Zellaufschluss mit Lysis-Puffer: Reagenzien.

Triton X 100 1 % [v/v], PIC, SDS 0,4 % [v/w], 10 mM Tris/HCl pH 8,0
--

3.7.2 ZELLAUFSCHLUSS MIT DIGITONIN

Durch Digitonin wird eine Permeabilisierung der Zellmembran erreicht. Durch höhere Konzentration des Digitonins kann die gesamte Zelle lysiert werden und es wird dadurch ein breiteres Spektrum an Proteinen frei. Das Zellpellet wurde 3 x mit Phosphatpuffer gewaschen

und danach bei 1200 x g zentrifugiert. Die gewaschenen Zellen sind mit dem Aufschlusspuffer versetzt worden und wurden anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C mit 10000 x g für 40 min. Der Überstand wurde für die Immunpräzipitation verwendet.

Tab. 12: Digitonin-Aufschlusspuffer (pH 7,5): Zusammensetzung.

250 mM Saccharose 20 mM HEPES 10 mM KCl 8 mM DTT	1,5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 Tablette PIC
Digitonin	20 mg pro mL Puffer für die Permeabilisierung von Membranen
	200 mg pro mL für die Zellyse

4. ERGEBNISSE

4.1 AUSWAHL DER PEPTIDE FÜR DIE IMMUNISIERUNG

Das Protein CLN6 wurde unter Berücksichtigung seiner Anordnung innerhalb der ER-Membran betrachtet. Es besteht aus 7 transmembranen Domänen. Die in das ER-Lumen oder ins Zytosol gerichteten Proteinabschnitte bieten sich für Immunisierungen an. Wie in Abb. 6 dargestellt wurde zusätzlich auf das Vorkommen von immunogenen aromatischen und aliphatischen Aminosäuren in den oberflächlichen Abschnitten des Proteins geachtet (z.B. Tryptophan oder Isoleucin). Peptide dieser als immunogen betrachteten Sequenzabschnitte wurden synthetisiert (Merrifield 1963, 1965; Merrifield und Stewart 1965). Gekennzeichnet sind die Peptidsequenzen, gegen die immunisiert wurde und gegen die Antikörper generiert wurden, in Abb.6. Die Sequenz von Peptid I ist rot gekennzeichnet, weil gegen das Peptid keine Antikörper generiert werden konnten.

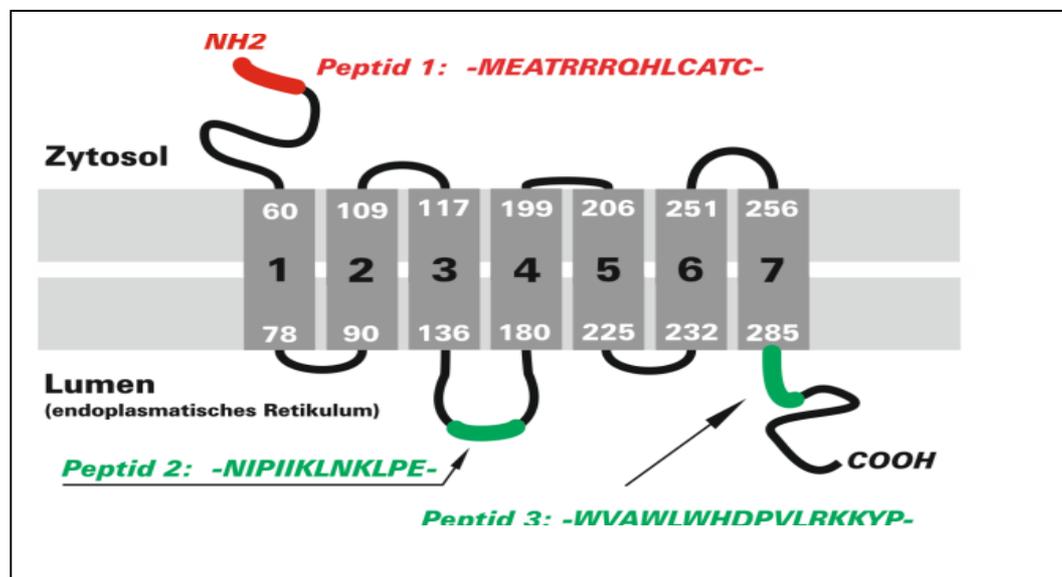


Abb. 6: Die Struktur von CLN6. Lokalisation der synthetisierten Peptide.
(Nach Wheeler *et al.*, 2002 und Heine, 2003)

4.2 MONOKLONALE ANTI-CLN6-ANTIKÖRPER

Die immunisierten Balb/C-Mäuse (vgl. 3.2.4) wiesen nach ca. 10 Wochen eine positive Immunantwort auf. Die mit der Tumorzelllinie P3X63Ag8.653 fusionierten Milzzellen wurden ausgesät und kultiviert (vgl. 3.2.5-3.2.7). Die Überstände der einzelnen Kavitäten wurden auf CLN6-Antikörper getestet. Um die Isolierung nicht gewünschter IgM- Klone auszuschließen, wurde ausnahmslos gegen Immunglobuline der Klasse G getestet. Es konnten in der Fusion 201 mehrere anti-CLN6-mAK-produzierende Hybridome identifiziert und anschließend kloniert werden. Die stabilsten Klone, CLN6-201-1D10, CLN6-201-2B2, CLN6-201- 3A10

der Fusion 201 und 147-CLN6-4D7 (vgl. Tab. 13) welche die reaktivsten Antikörper produzierten, wurden im Folgenden Funktionsnachweisen unterzogen.

Tab. 13: Generierte Antikörper

Antikörper	3A10	4D7	1D10	2B2
Isotyp	IgG2b/k	IgG1/k	IgG2b/k	IgG1/k
Detektierte AS-Sequenz	-NPIIKNLKPETLID- Peptid 2		-WVAWLWNDPVLRRKKYP- Peptid 3	

4.3 FUNKTIONSNACHWEISE DER ANTI-CLN6-ANTIKÖRPER

4.3.1 FUNKTIONSNACHWEIS IM ELISA

Nach Aufreinigung und Einstellung auf 1mg/mL wurden Funktionsnachweise durchgeführt. Bei Beginn der Arbeiten stand CLN6 nicht als Gesamtprotein zur Verfügung. Daher musste im ELISA gegen die Peptidsequenzen getestet werden, welche zur Immunisierung genutzt wurden.



Abb. 7: ELISA. Anti-CLN6-positive Hybridome der Fusion 201.

4.3.2 IMMUNOBLOTANALYSE

Im Immunoblot sollte zellulär vorkommendes CLN6 nachgewiesen werden. Besonders im Hinblick auf das Zellaufschlussverfahren wurden mehrfach Modifikationen vorgenommen. So wurde auch das Frier-Tau-Verfahren angewendet. Außerdem wurden membranauflösende Detergentien (u.a. Digitonin) eingesetzt. Dadurch wurden Immunoblots mit einem geringen Lysierungsgrad von Zellen und Zellorganellen durchgeführt, genauso wie vollständig lysierte

Zellen auf CLN6 untersucht wurden. Der Nachweis von CLN6 gelang in der humanen Nierenkarzinomzelllinie HEK-293 nach komplettem Aufschluss mit Digitonin. Begleitend wurde zur Generierung von CLN6 die Nierenkarzinom-Zelllinie HEK-293 mit einem CLN6/GFP-DNA-Konstrukt transfiziert, um eine vermehrte Expression von CLN6 zu erreichen. Das DNA-Konstrukt wurde von der Arbeitsgruppe von Sara Mole, Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London bereitgestellt. Die transfizierten Zellen sollten den Protein-Komplex aus CLN6 und GFP überexprimieren. Der Nachweis von GFP gelang fluoreszenzmikroskopisch nicht. Auch der Aufschluss der transfizierten Zellen erbrachte keine eindeutigen Hinweise darauf, dass CLN6 in den transfizierten HEK-293 überexprimiert wurde.

4.3.3 REAKTION MIT REKOMBINANTEM CLN6

Im Verlauf der Dissertationsarbeit wurde rekombinantes CLN6 erstmalig kommerziell angeboten. Dadurch bestand die Möglichkeit, CLN6-Antikörper hinsichtlich Ihrer Spezifität gegenüber dem CLN6-Protein zu testen. Es wurden dabei sowohl gereinigte Antikörper (AK) verwendet als auch Kulturüberstand (KÜ) von anti-CLN6-positiven Hybridomen. Die gereinigten Antikörper sowie die Kulturüberstände wurden in verschiedenen Verdünnungen aufgetragen.

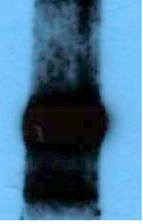
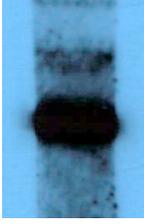
IMMUNOBLLOT				
Nachweis von rekombinantem CLN6 mit den generierten monoklonalen Antikörpern				
				- 75 - 55
(gereinigter AK) 1:30	(KÜ) 1:10	(KÜ) 1:10		
1D10	2B2	3A10	Konjugat-Kontrolle	kDa

Abb 8: Immunoblot: Nachweis von rekombinantem CLN6 mit anti-CLN6 mAK.

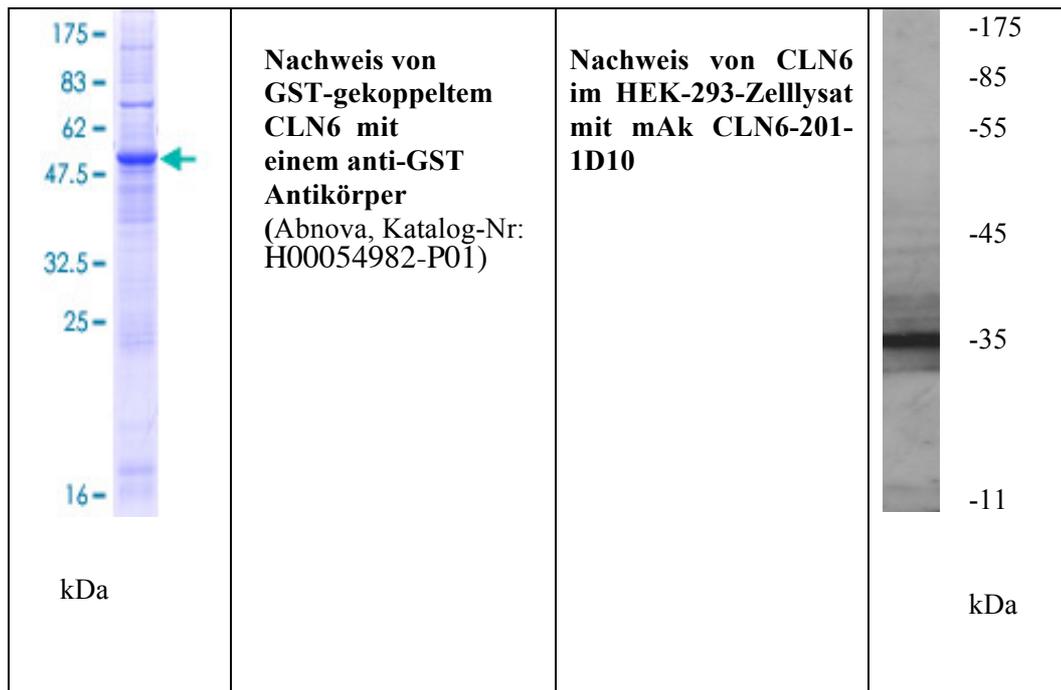


Abb. 9: Immunoblot. (v.l.n. r.) mit anti-GST-AK und mAk anti-CLN6-201-1D10.

4.3.4 IMMUNFLUORESCENZ-NACHWEIS VON CLN6

Dem Funktionsnachweis im Immunoblot folgten immunzytochemische Untersuchungen. Die anti-CLN6-Antikörper wurden hinsichtlich Ihrer Funktionalität in der Fluoreszenzmikroskopie getestet. Es wurde der mAk CLN6-201-1D10 für immunzytochemische Untersuchungen genutzt, weil dieser gegen rekombinantes CLN6 die beste Reaktivität zeigte. Die Zelllinie SkBr3 wurde für die Immunzytologie verwendet. Es handelt sich um die HER2-überexprimierende Zelllinie eines Adenokarzinoms der Mamma. Die Zellen wurden, wie beschrieben, mit PFA (4%ig) fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Der mAk CLN6-201-1D10 (1mg/mL) wurde in der Verdünnung 1 : 50 verwendet. Als Referenz wurde ein Antikörper gegen die ER-ständige Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) verwendet, um die Kollokalisierung von CLN6 und PDI im ER darzustellen. Für die Beurteilung eines lysosomalen Vorkommens von CLN6 wurden die Lysosomen mit Lysotracker angefärbt.

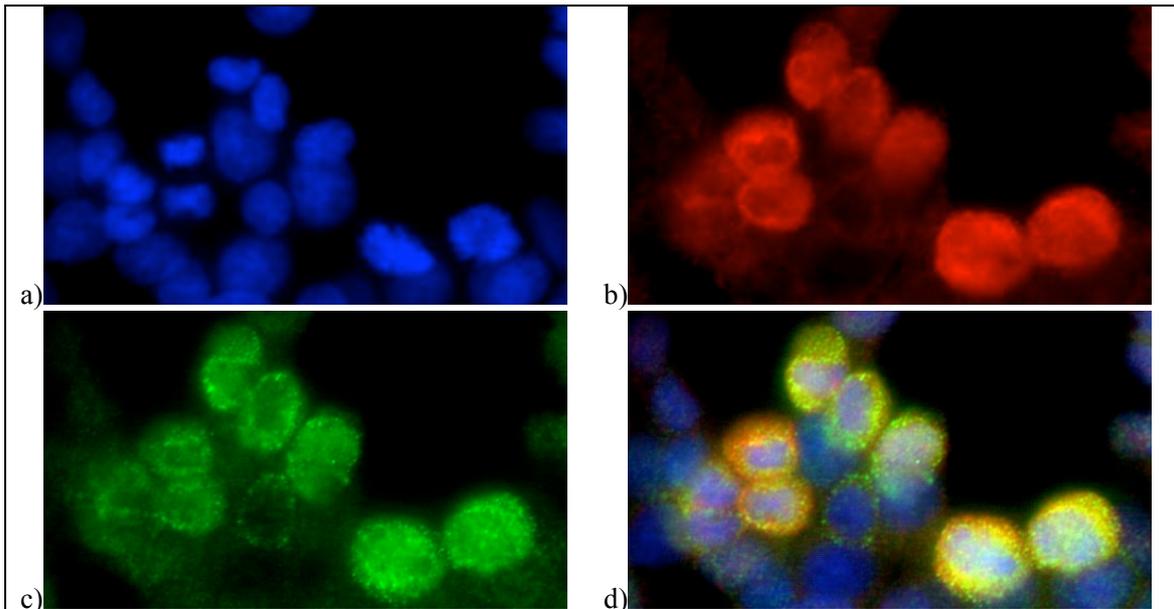


Abb. 10: Immunfluoreszenz: Nachweis der ER-Lokalisation von CLN6 in SkBr3-Zellen.

a) Kernfärbung mit Hoechst 33258, **b)** Immunzytochemischer Nachweis von CLN6 mit dem mAK CLN6-201-1D10. Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H+L)-Cy3 (Bioass), **c)** Immunzytochemischer Nachweis von PDI mit einem anti-PDI-mAK (ACRIS). Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H-L)-Alexa 488 (BioAss), **d)** Overlay von **a)**, **b)** und **c)** zum Nachweis der Kolokalisation von PDI und CLN6 im endoplasmatischen Retikulum.

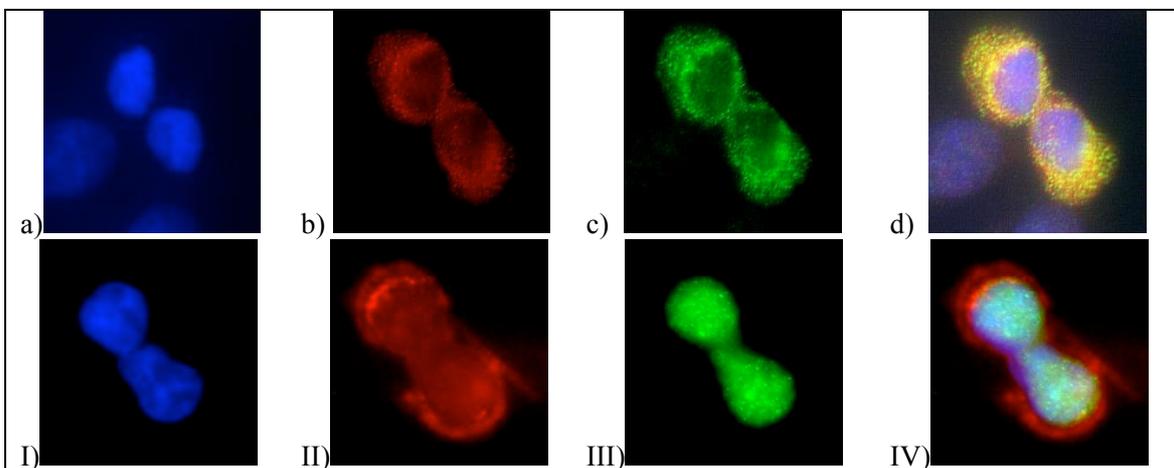


Abb. 11: Immunfluoreszenz: Nichtlysosomale Lokalisation von CLN6 in SkBr3-Zellen

a) Kernfärbung mit Hoechst 33258, **b)** Immunzytochemischer Nachweis von CLN6 mit dem mAK CLN6-201-1D10. Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H+L)-Cy3 (Bioass), **c)** Immunzytochemischer Nachweis von PDI mit einem anti-PDI-mAK (ACRIS). Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H-L) Alexa 488 (BioAss), **d)** Overlay von **a)**, **b)** und **c)** zum Nachweis der Kolokalisation von PDI und CLN6 im endoplasmatischen Retikulum.

I) Kernfärbung mit Hoechst 33258, **II)** Immunzytochemischer Nachweis von CLN6 mit dem mAK CLN6-201-1D10. Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H+L)-Cy3 (Bioass), **III)** Lysosomenmarkierung mit Lysotracker (grün), **IV)** Overlay von I, II, III

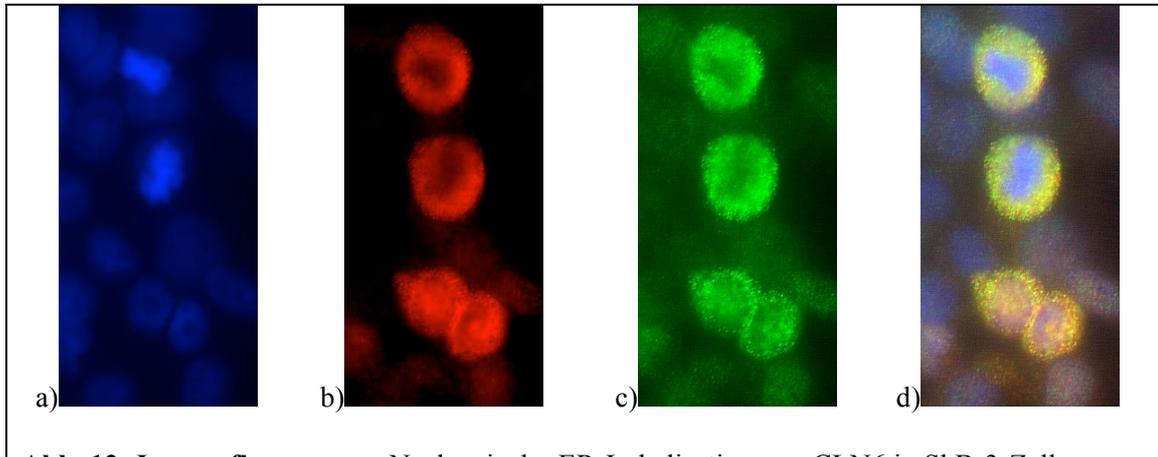


Abb. 12: Immunfluoreszenz: Nachweis der ER-Lokalisation von CLN6 in SkBr3-Zellen.

a) Kernfärbung mit Hoechst 33258, **b)** Immunzytochemischer Nachweis von CLN6 mit dem mAK CLN6-201-1D10. Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H+L)-Cy3 (Bioass), **c)** Immunzytochemischer Nachweis von PDI mit einem anti-PDI-mAK (ACRIS). Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H-L)-Alexa 488 (BioAss), **d)** Overlay von **a)**, **b)** und **c)** zum Nachweis der Kolokalisation von PDI und CLN6 im endoplasmatischen Retikulum.

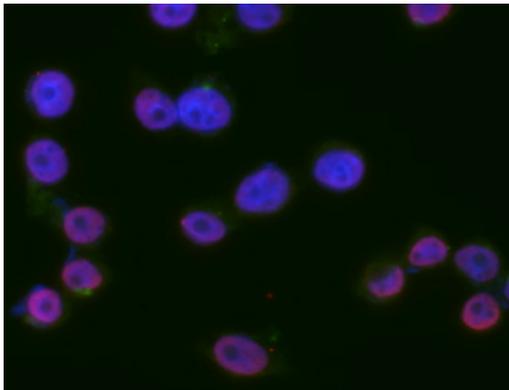


Abb. 13: Immunfluoreszenz: SkBr3-Zellen als Konjugat-Kontrolle.

4.3.5 IMMUNHISTOLOGIE

Als weitere Funktionsnachweise wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Das Gen für CLN6 scheint ubiquitär exprimiert zu werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CLN6 auf mRNA-Ebene in Skelett- und Herzmuskel, in Leber und Niere verstärkt exprimiert wird (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002). Ausgehend von diesen Befunden wurden Gewebe der Niere, der Leber, sowie Schnitte des Skelettmuskels für die Immunfärbungen genutzt. Zusätzlich wurden aufgrund des immunzytochemischen Nachweises des CLN6-Proteins in HER2-positiven SkBr3-Zellen histologische Präparate der humanen Mamma für die Immunhistologie genutzt. Es handelte sich um Schnitte, welche gesunde Mammastrukturen aufwiesen sowie Anteile eines duktales Mamma-CA. Um einen Überblick über die Expression von CLN6 im humanen Organismus zu gewinnen, wurden zusätzlich weitere Organe ausgewählt, um ein möglichst differenziertes Bild der CLN6-Expression zu erhalten. Es wurden dafür Präparate von Schleimhaut der Nasennebenhöhle, von Magen, Colon, Hypophyse sowie der Haut untersucht.

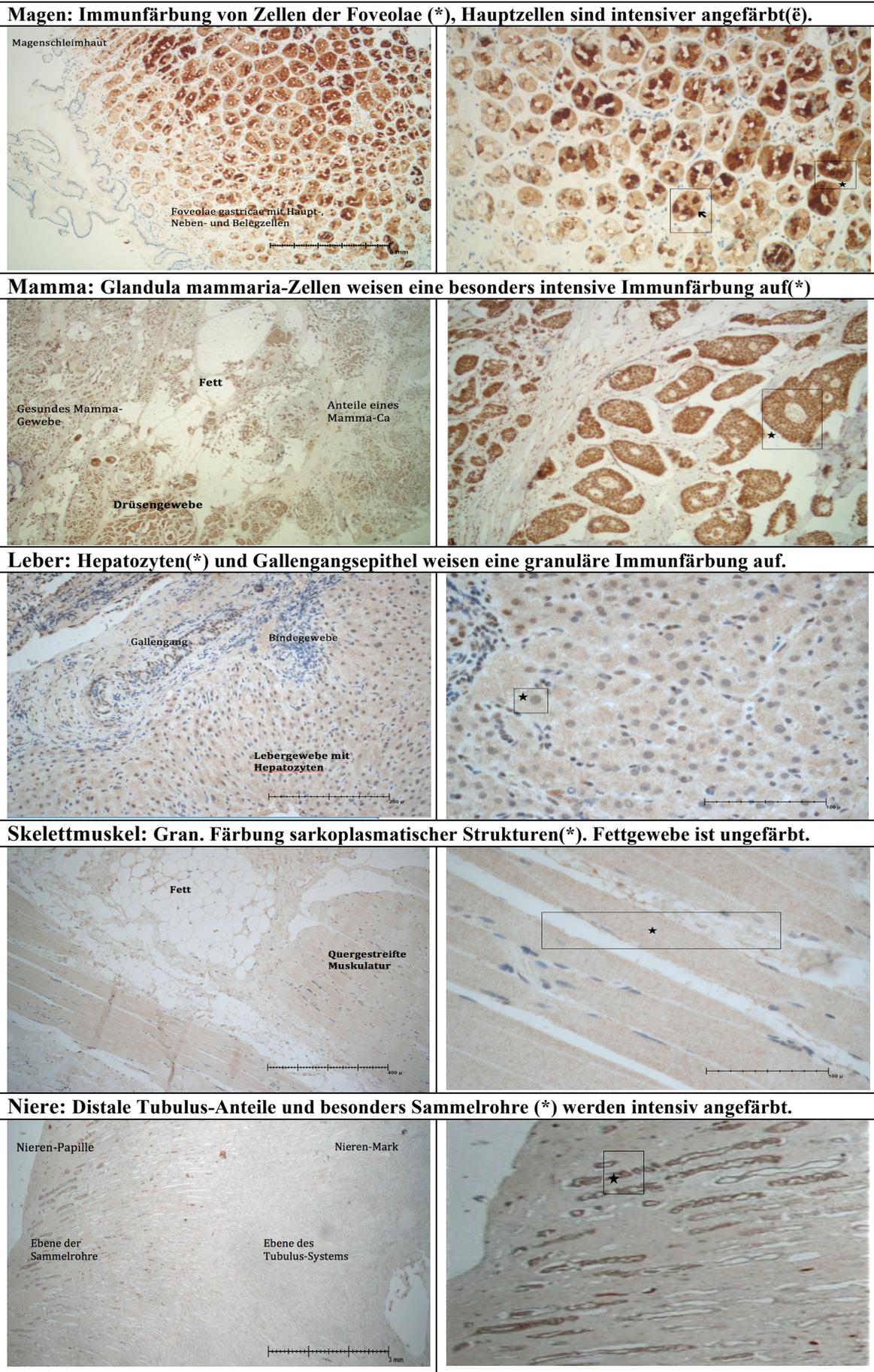


Abb. 14: Immunhistologie: mAk CLN6-201-1D10 (Verdünnung 1:50): Übersicht.

4.3.6 NACHWEIS VON CLN6 IN DER IMMUNHISTOLOGIE

Magen: In den Präparaten des Magen-Corpus konnte mit mAk CLN6-201-1D10 eine intensive spezifische Immunfärbung beobachtet werden. Auffällig war, dass zum Teil direkt benachbarte Zellen unterschiedlich intensiv angefärbt wurden. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen damit die unterschiedlichen Zellarten der Foveolae gastricae einen differierenden Gehalt an CLN6 aufzuweisen. Vorrangig werden das Zytoplasma und vesikuläre Strukturen in den Zellen der Foveolae gastricae spezifisch angefärbt. Aufgrund der anatomischen Verteilung im Magen, sowie in den Foveolae gastricae im Speziellen, scheint es sich bei den Zellen mit intensiver Immunfärbung um die Hauptzellen des Magens zu handeln.

Mamma: In den histologischen Präparaten der Mamma konnte eine spezifische Reaktion im Bereich der Drüsenläppchen, sowie im Bereich der Ductus lactiferi nachgewiesen werden. Es wurde vorrangig Zytoplasma angefärbt. Da in der Zelllinie SkBr3 in der Immunfluoreszenz CLN6 im ER nachgewiesen werden konnte, spricht die zytoplasmatische Färbung der Glandulae mammae und der Milchgangzellen für die Expression von CLN6 auf Protein-Ebene in der Mamma.

Leber: Die immunhistologische Färbung zeigt eine granuläre Zytoplasma-Färbung der Hepatozyten. Das im Gallengang ebenfalls angeschnittene Gallengangsepithel zeigt ebenfalls eine Färbung des Zytoplasmas. Bindegewebsstrukturen weisen keine Immunfärbung auf.

Skelettmuskel: Das Sarkoplasma der Skelletmuskelzellen wies eine spezifische Immunfärbung auf. Bindegewebe und Fettgewebe waren ohne spezifische Färbung.

Hypophyse: Die Adenohypophyse wies eine schwache Färbung auf, was für eine geringe CLN6-Expression spricht.

Niere: Besonders die Sammelrohre und die distalen Tubuli-Anteile wiesen eine intensive Färbung auf.

Die Präparate der Schleimhaut der Nasennebenhöhlen, des Colons, des Kleinhirns, der Neurohypophyse sowie der Haut zeigten keine spezifische Färbung in der Immunhistologie. Es ist zu vermuten, dass CLN6 hier auf Proteinebene nicht oder nur schwach exprimiert wird.

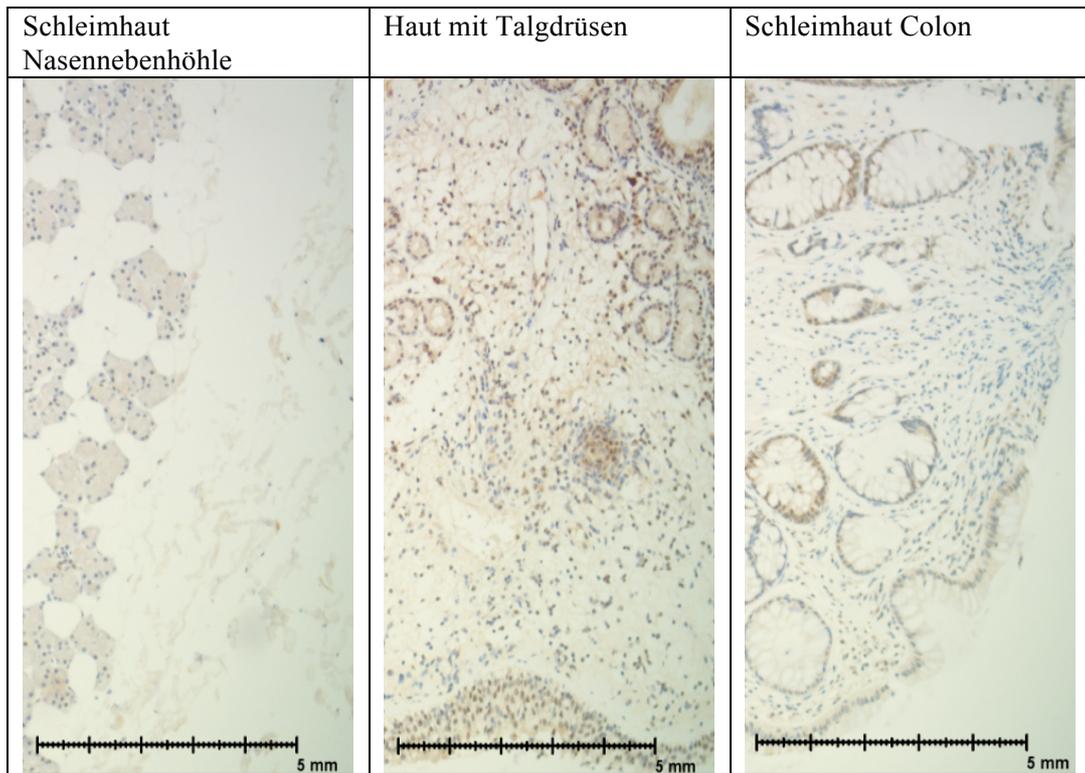


Abb.15: Immunhistologie: Gewebe-Präparate ohne CLN6-Nachweis.

5. DISKUSSION

5.1 ANTIKÖRPER GEGEN HUMANES CLN6

Für die CLN6-Erkrankung ursächlich sind Mutationen im CLN6-Protein. Bisher sind in der Gruppe der CLN-Erkrankungen funktionsgestörte Proteine bekannt, die einerseits Enzyme darstellen, wie z.B. Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 bei CLN1 (Vesa *et al.*, 1995), andererseits existieren auch Membranproteine wie CLN6, bei denen die Funktion weitestgehend unbekannt ist. 1997 wurden erstmalig Mutationen im Gen für das CLN6-Protein als Ursache einer Neuronalen Ceroid Lipofuszinose veröffentlicht (Sharp *et al.*, 1997). Aktuell sind 132 Patienten mit CLN6 in einer Datenbank erfasst, bei denen die Gendefekte analysiert wurden. 71 Mutationen im CLN6-kodierenden Chromosom 15q23 konnten nachgewiesen werden. CLN6 ist ein membranständiges ER-Protein (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002; Heine *et al.*, 2007). Das Protein könnte mit dem Mikrotubuli-Bindungsprotein Kinesin I interagieren (Fukata *et al.*, 2002) und damit einen Einfluss auf den intrazellulären Protein-Transport haben oder bei Segregation von Zellorganellen eine Rolle spielen. Außerdem wurde berichtet, dass Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) und das CLN6-Protein komplexieren können (Liu & Strittmatter., 2001; Charrier *et al.*, 2003; Schmidt & Strittmatter, 2007; Hou *et al.*, 2008; Benedict *et al.*, 2009). Weitere Interaktionspartner von CLN6 sind bisher nicht sicher identifiziert worden und über weitere intrazelluläre Funktionen von CLN6 gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse. Bisher wurden keine Ergebnisse immunzytochemischer Untersuchungen veröffentlicht, in denen monoklonale anti-CLN6-Antikörper Anwendung fanden. Ebenso sind bisher keine immunhistochemischen Untersuchungen von Geweben humaner Organe veröffentlicht worden. Die Bedeutung der einzelnen mutierten CLN-Proteine hinsichtlich des klinischen Bildes der verschiedenen Varianten der Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen konnte bisher nicht geklärt werden. Die generierten Antikörper könnten zu weiterführenden Erkenntnissen über die CLN6-Erkrankung beitragen. Bei Beginn dieser Arbeit existierten keine spezifischen monoklonalen Antikörper gegen CLN6.

5.2 GEWINNUNG SPEZIFISCHER MONOKLONALER ANTI-CLN6 ANTIKÖRPER

In der ER-Membran wurde das Vorkommen von CLN6 bestätigt (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002; Heine *et al.*, 2007). In den oberflächlich und außerhalb der ER-Membran gelegenen AS-Sequenzen der transmembranen Domänen wurden immunogene Peptide im Rahmen dieser Arbeit identifiziert. Diese wurden mit Alignment-Programmen mit anderen Proteinen verglichen, um mögliche Kreuzreaktivitäten auszuschließen. Dadurch wurden Abschnitte der CLN6-Aminosäuresequenz identifiziert, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit für einen Antikörper erreichbar sind. Zur Verbesserung der Immunantwort wurden in dieser Arbeit an Carrier gekoppelte Peptide sowie Freund's Adjuvans eingesetzt. Komplettes Freund's Adjuvans (KFA) ist ein Gemisch, das bei Immunisierungen das Immunsystem am effektivsten

stimuliert (van der Eyn, 2002). Bei der Verwendung des KFA in der primären Immunisierung werden die ausgeprägten immunmodulatorischen Eigenschaften der enthaltenen bakteriellen Proteine (u.a. von *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*) genutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten synthetisierten Peptide waren an den Carrier PamCys gekoppelt, um die Immunogenität zu erhöhen, da kleine Moleküle, wie Haptene oder kleine Peptide, nur eine geringe immunogene Potenz aufweisen (Revillard J-P, 1995). Je größer die Moleküle und je komplexer die Strukturen von Antigenen sind, umso ausgeprägter sind die immunogenen Eigenschaften (Janeway C und Travers P, 1997). So kann bei wenig immunogenen Peptiden oder kleinen Molekülen mit Peptid-Carrier-Konjugaten (z.B. Pam-Cys) eine Steigerung der Peptid-Immunogenität erreicht werden (Kellner *et al.*, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Klone generiert und identifiziert, welche Antikörper gegen die ausgewählten Peptid-Sequenzen 2 und 3 produzierten. Die anti-CLN6-Antikörper 1D10 und 2B2 detektierten das Peptid 2 und die Antikörper 3A10 und 4D7 detektierten das Peptid 3. Die Antikörper 2B2 und 1D10 zeigten die höchste Reaktivität im Immunoblot (vgl. Abb 8 und Abb. 9). Sowohl im ELISA als auch im Immunoblot konnte der Antikörper 1D10 bis zu einer Verdünnung von 1:4000 das rekombinante CLN6-Protein detektieren.

5.3 SPEZIFITÄT MONOKLONALER ANTI-CLN6-ANTIKÖRPER

Die generierten monoklonalen anti-CLN6-Antikörper detektieren anhand der nachfolgend aufgeführten Kriterien CLN6 spezifisch:

- Die Antikörper wurden mit Hilfe, von spezifischen CLN6-Aminosäure-Sequenzen generiert.
- Die CLN6-Spezifität der genutzten AS-Sequenzen wurde mit Alignment-Programmen überprüft, um Kreuzreaktivitäten der zu gewinnenden Antikörper auszuschließen. Die genutzten Aminosäuresequenzen der Peptide sind nur im CLN6-Protein vorhanden.
- Die Antikörper reagieren mit den synthetisierten Peptiden im ELISA.
- Die generierten Antikörper reagieren im Immunoblot mit rekombinantem CLN6.
- CLN6 ist ein Protein der ER-Membran. Die Antikörper reagieren in der Immunfluoreszenz mit einem ER-ständigen Protein, was durch die Kollokalisierung mit PDI nachgewiesen wurde.
- Die verstärkte Expression von CLN6 auf mRNA-Ebene in verschiedenen Geweben (Gao *et al.*, 2002; Wheeler *et al.*, 2002), konnte mit dem generierten Antikörper anti-CLN6-201-1D10 auf Proteinebene bestätigt werden.

5.4 IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CLN6

5.4.1 IMMUNZYTOCHEMIE MIT ZELLEN DER TUMORZELLINIE SKBR3

In Ermangelung spezifischer Antikörper gegen CLN6 sind in der Literatur bisher nur immunzytochemische Untersuchungen von CLN6 beschrieben worden, in denen Proteine nachgewiesen wurden, die in transfizierten Zellen an CLN6 gekoppelt waren (Heine *et al* 2004). Es wurden beispielsweise transfizierte BHK-Zellen verwendet, welche an GST gebundenes CLN6 überexprimierten. In den transfizierten BHK-Zellen konnte damit eine Kolokalisation mit PDI im ER nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunzytochemische Untersuchungen mit der nativen Tumorzelllinie SkBr3 durchgeführt. Der generierte Antikörper CLN6-201-1D10 detektierte CLN6 spezifisch. Es wurde die Lokalisation des CLN6-Proteins im endoplasmatischen Retikulum durch die Kolokalisation der ER-spezifischen PDI bestätigt.

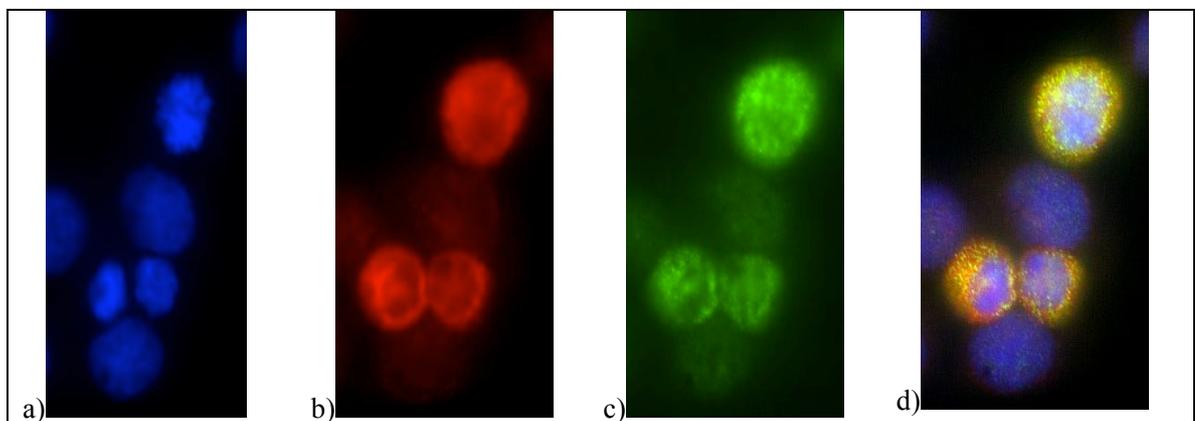


Abb. 16: Immunfluoreszenz: SkBr3-Zellen: Kolokalisation von CLN6 und PDI im ER.

a) Kernfärbung mit Hoechst 33258, **b)** Immunzytochemischer Nachweis von CLN6 mit dem mAK CLN6 -201-1D10.

Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H+L)-Cy3 (Bioass), **c)** Immunzytochemischer Nachweis von PDI mit einem anti-PDI-mAK (ACRIS). Sekundär-AK: anti-Maus IgG (H-L)-Alexa 488 (BioAss), **d)** Overlay von a), b) und c) zum Nachweis der Kolokalisation von PDI und CLN6 im endoplasmatischen Retikulum.

5.5 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CLN6

Es wurden verschiedene Organe auf das Vorkommen von CLN6 untersucht. Wheeler (2002) und Gao (2002) konnten CLN6 auf mRNA-Ebene bereits in verschiedenen Geweben nachweisen. Aufgrund des vermehrten Vorkommens auf mRNA-Ebene im Leber-, Skelettmuskel- und Nierengewebe wurden Präparate dieser Organe für die Immunhistologie im Rahmen dieser Arbeit genutzt. Außerdem wurde cerebrales Gewebe (Kleinhirn) untersucht, da die ZNS-Strukturen bei CLN-Patienten ausgeprägte Destruktionen aufweisen. Zusätzlich wurden Gewebe mit einem ausgeprägten Lipid/Protein-Stoffwechsel untersucht und Gewebe, in denen dieser nur eine untergeordnete Rolle spielt.

5.5.1 IMMUNHISTOLOGIE DER LEBER

Die Leber ist ein Stoffwechselorgan mit vielfältigen Funktionen. Unter anderem produziert die Leber den Gallensaft. Sie sorgt für die Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichts, ist aktiv in Entgiftungs- und Ausscheidungsfunktionen und produziert lebenswichtige Substanzen (Hormone, Gerinnungsfaktoren, Albumin, Glykogen und Lipoproteine). Sezernierende Zellen, beispielsweise Hepatozyten, weisen viel endoplasmatisches Retikulum auf. Eine starke Expression von CLN6 auf mRNA-Ebene wurde bereits nachgewiesen. Die erhöhte CLN6-Expression im Lebergewebe konnte anhand der immunhistologischen Ergebnisse, welche im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, bestätigt werden. Die genaue Funktion von CLN6 ist unbekannt. Abbildung 17 zeigt die spezifische Färbung von CLN6 in Hepatozyten und Zellen des Gallengangs.

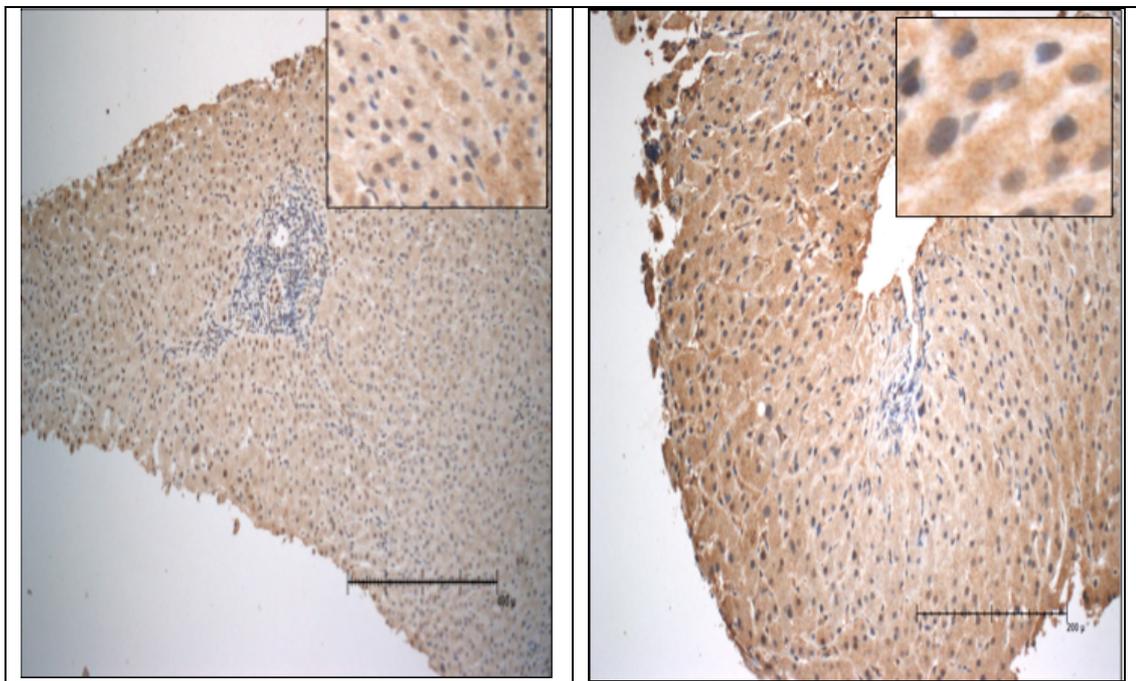


Abb. 17: Immunhistologie: Leber mit Gallengang: mAκ CLN6-201-1D10.

Bindegewebe und Hepatozyten: Granuläre CLN6-Anfärbung Bindegewebe weist keine Färbung auf.

Gallengangszellen und Hepatozyten: CLN6-Anfärbung.

5.5.2 IMMUNHISTOLOGIE DER NIERE

Anatomisch besteht die Niere aus der Nierenrinde und dem Nierenmark. Sie ist beteiligt an der Kontrolle des Wasser- und des Salzhaushalts, weist Funktionen im Säure-Basen-Haushalt auf und übernimmt einen erheblichen Anteil an Ausscheidungsfunktionen von Stoffwechsel-Endprodukten. Zusätzlich werden Stoffwechselfunktionen und Synthesefunktionen (z.B. Hormon-Synthese) sowie Kontrollfunktionen (u.a. Blutdruck) übernommen.

Die Ausscheidung beginnt in den Nierenkörperchen, wo Wasser und alle gelösten Stoffe bis zum Molekulargewicht von 5 kDa frei filtriert werden. In den nachgeschalteten Tubuli und den Sammelrohren, welche zusammen das Nephron bilden, sorgen zelluläre Transporter für

eine Aufrechterhaltung von Konzentrationsgefällen sowie für einen aktiven Transport zur Filtration und Rückresorption von Wasser und ausscheidungspflichtigen Substanzen. Nach der Filtration in den Nierenkörperchen (Ultrafiltration) werden im proximalen Tubulus 70-80% des Wassers sowie Natrium zurückresorbiert. Im distalen Tubulus findet eine intensivierete Rückresorption von Na^+ und Cl^- statt. Ca. 10 Verbindungstubuli münden in ein Sammelrohr, welche den Urin in den Nierenpapillen in das Nieren-Kelchsystem leiten. Neben der aldosteronabhängigen Na^+ -Rückresorption bei gleichzeitiger Kaliumausscheidung werden in den Sammelrohren 20-30% des filtrierte Wassers zurückresorbiert (Welsch, 2003). Die Niere zeigte in der Immunhistologie eine spezifische Färbung. Wie in Abb. 18 deutlich zu erkennen ist, weisen neben den distalen Tubuli die Sammelrohrstrukturen eine intensive Immunfärbung auf. Die Endstrecken der Nephronen weisen eine umfangreiche Ausstattung mit Transportern auf, um gegen das Konzentrationsgefälle Elektrolyte zu resorbieren oder auszuscheiden. Da bereits bei CLN3 eine Interaktion mit der Na^+ - K^+ -ATPase vermutet wird (Uusi-Rauva *et al.*, 2008), könnte bei CLN6 ein ähnlicher Zusammenhang bestehen. Die bei CLN6-Patienten abgelagerten intrazellulären Ceroid-Lipofuszin-Verbindungen bestehen zum großen Teil aus der Subunit C der ATP-Synthase. Die ATPasen und ATP-Synthase besitzen prinzipiell die gleiche Funktion und sie sind evolutionär eng verwandt.

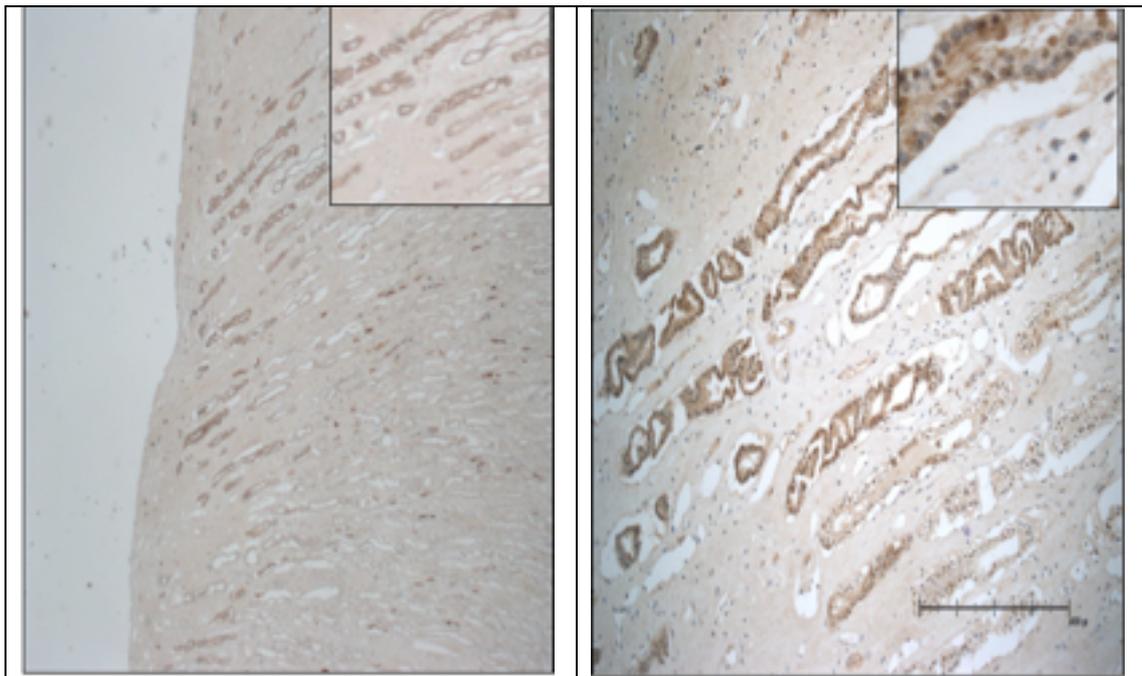


Abb. 18: Immunhistologie: Niere: Färbung mit mAk CLN6-201-1D10.

Niere: Intensive CLN6-Anfärbung in den Endstrecken der Nephronen.

Niere: Intensive CLN6-Anfärbung in Epithelzellen der distalen Tubuli und Sammelrohre.

Jedoch haben die ATPasen die Möglichkeit der ATP-Produktion verloren (Müller *et al.*, 2010). Die ATPasen dienen damit ausschließlich als ATP-getriebene Ionenpumpen zur Aufrechterhaltung der zellulären Ionen-Konzentrationsgefälle zwischen Kompartimenten (Forgac, 2007). Eine kräftige Expression des CLN6-Proteins in der Niere könnte ein Indiz für

eine Interaktion von CLN6 und der ATP-Synthase bzw. mit ATPasen sein. ATPasen sind in der Niere reichlich vorhanden und es könnte sich damit um ein Beispiel für die Expression von CLN6 in Geweben mit einer hohen Dichte von zellulären Transportern handeln.

5.5.3 IMMUNHISTOLOGIE DES SKELETTMUSKELS

In der Immunhistochemie des Skelettmuskelgewebes zeigt sich eine granuläre Färbung im Zytoplasma (vgl. Abb 19). Das ER, welches im Muskel sarkoplasmatisches Retikulum genannt wird, ist in der Literatur als ein parallel zur Zell-Längsachse angeordnetes Zellorganell beschrieben (Welsch, 2003). Gemäß den Literaturangaben ist die Muskelzelle, verglichen mit anderen Zellen, umfangreich mit ER ausgestattet und deshalb ist ein hohes CLN6-Vorkommen wahrscheinlich. An der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums wird u.a. Ca^{2+} durch den

Ca^{2+} - Mg^{2+} -Transporter in das Lumen gepumpt, welches für die Kontraktion benötigt wird. Im ZNS existiert ein Ca^{2+} -vermittelter Regulationsprozess mit Calsenilin, welcher eine Rolle im Ca^{2+} -vermittelten Zelltod spielt (Carrion *et al.*, 1999). Es werden Komplezierungen aus Calsenilin, Ca^{2+} , sowie CLN3 vermutet (Chang *et al* 2007). Hypothetisch könnte auch das CLN6-Protein mit Ca^{2+} interagieren, was die Expression von CLN6 im Ca^{2+} -reichen sarkoplasmatischem Retikulum erklären könnte.

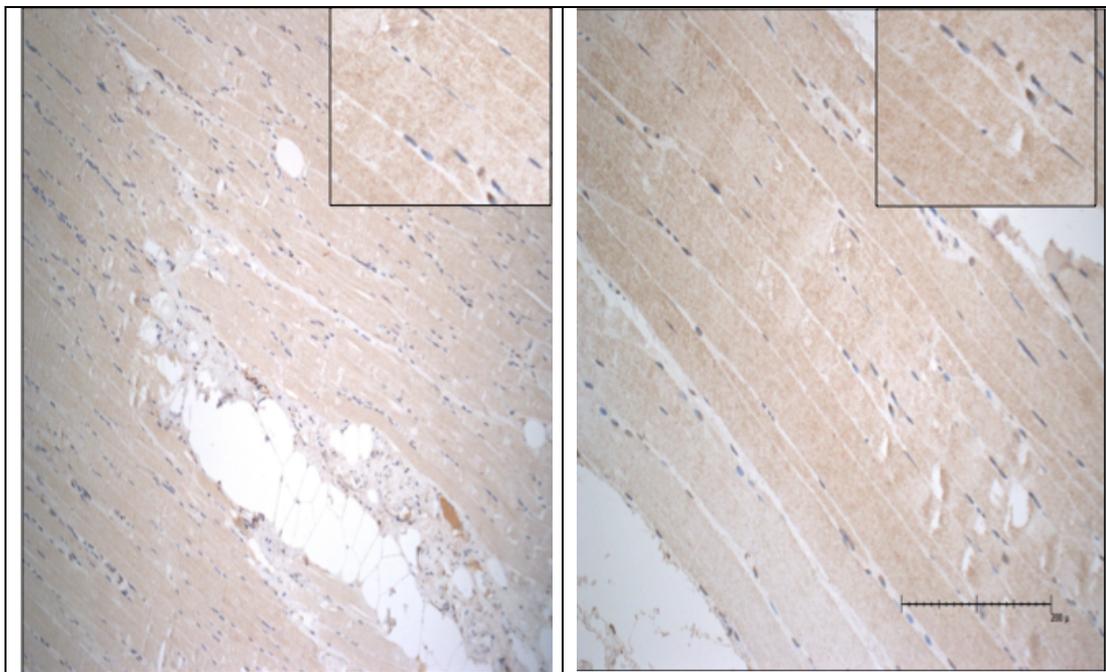


Abb. 19: Immunhistologie: Skelettmuskel: Färbung mit mAk CLN6-201-1D10-Färbung.

Skelettmuskel: Intensive CLN6-Anfärbung im Sarkoplasma.

Skelettmuskel: granuläre CLN6-Anfärbung des Zytoplasmas.

5.5.4 IMMUNHISTOLOGIE DES MAGENS

Die Magenpräparate aus dem Corpus sowie aus der Pars cardiaca wiesen eine spezifische Immunfärbung auf und hier besonders im Bereich der Foveolae gastricae. Es sind verschiedene Zellarten unterschiedlich intensiv angefärbt (vgl. Abb 20). Ausgehend von der Morphologie und Lokalisation dieser intensiv gefärbten Zellen handelt es sich hier wahrscheinlich um die Hauptzellen der Magenschleimhaut. Diese weisen ein signifikant stärkeres Signal im Gegensatz zu angrenzenden Zellen auf. Anatomisch sind die Hauptzellen im Hauptteil sowie in den basalen Bereichen der Foveolae gastricae lokalisiert. Die Hauptzellen produzieren Pepsinogen, das Zymogen des proteolytischen Enzyms Pepsin. Bei einzelnen Zellen sind kleinste, vesikelartige Strukturen sichtbar. Dabei könnte es sich um angefärbte Pepsinogen-Zymogengranula handeln. Es ist bekannt, dass die Hauptzellen vesikuläre Sekretgranula aufweisen können, die bei Bedarf sezerniert werden (Luellmann-Rauch, 2006). Die Hauptzellen weisen als sezernierende Zellen viel raues endoplasmatisches Retikulum auf. Damit sind Nachweise des CLN6-Proteins in Zellen mit viel endoplasmatischem Retikulum zu erklären. Ebenso weisen die Zellen des Magens viele Iontentransporter auf, was ggf. im Zusammenhang mit einer CLN6-Expression stehen könnte. Die intensive Immunfärbung von sezernierenden Zellen, u.a. von Hauptzellen, weist auf die Expression von CLN6 hin.

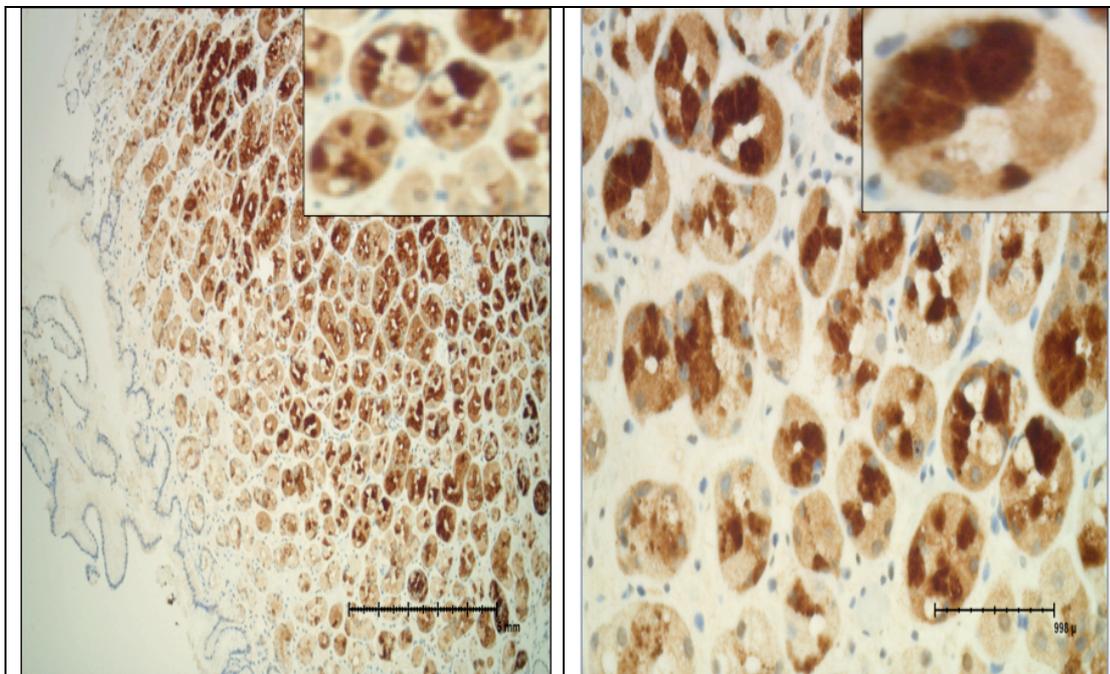


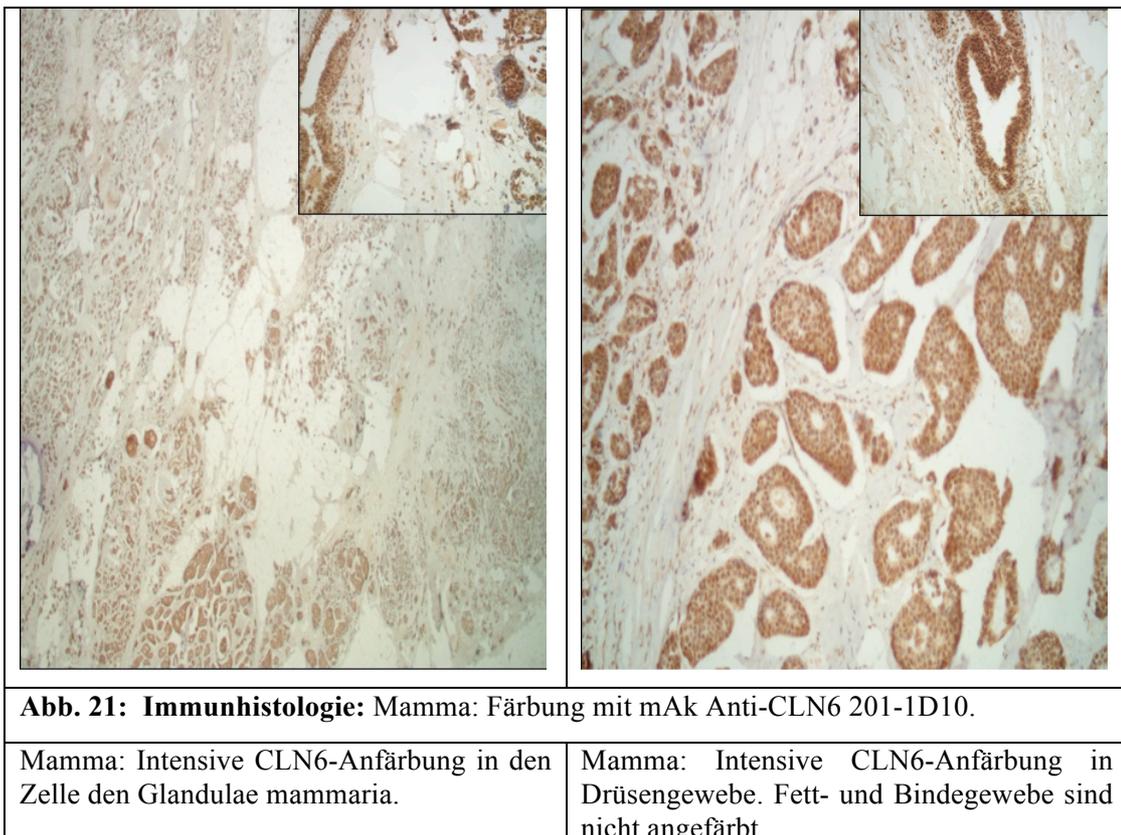
Abb. 20: Immunhistologie: Magenschleimhaut: Färbung mit mAk CLN6-201-1D10.

Magen: Intensive CLN6-Anfärbung in der Magenschleimhaut.

Magen: Intensive CLN6-Anfärbung der Hauptzellen der Foveolae gastricae.

5.5.5 IMMUNHISTOLOGIE DER MAMMA

Präparate der humanen Mamma wurden für die Untersuchungen herangezogen, da bereits mit der HER2-positiven Zelllinie SkBr3 der Nachweis von CLN6 in der Immunzytologie gelang. Abb. 21 zeigt spezifische Immunfärbungen in einem Mamma-Präparat mit Mamma-CA. Es zeigt vorrangig die Milchdrüsenzellen der Glandulae mammariae und Milchgangzellen des Ductus lactifer. Fett- und Bindegewebe weisen keine spezifische Färbung auf. Da die Gewebsstrukturen (Bindegewebe, Drüsengewebe, Fettgewebe) sehr unterschiedlich angefärbt werden, spricht dies für eine spezifische Immunfärbung. Die im Präparat vorhandenen Strukturen des Mamma-Ca wiesen keine abweichenden Färbeeigenschaften auf und werden nicht verstärkt angefärbt. Mamma-Zellen, die proteinreiche Sekrete produzieren können (Jenness R. 1979), weisen eine umfangreiche ER-Ausstattung auf, was nach den vorliegenden Ergebnissen für eine verstärkte CLN6-Expression spricht. Zellen ohne Produktion von proteinreichen Sekreten weisen keine erhöhte spezifische Färbung auf (vgl. Abb. 21).



5.5.6 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN WEITERER ORGANE

Es wurden verschiedene Organe und Organsysteme ausgewählt, um einen Überblick über das Vorkommen von CLN6 in verschiedenen Organen zu erhalten. Es wurden Präparate der Glandula parotis, der Schleimhaut der Nasennebenhöhle, ein Hautpräparat mit Talgdrüsen, ein

Colonpräparat, Gewebe der Hypophyse sowie des Kleinhirns untersucht. In den in Abb. 18 dargestellten Organen konnte keine spezifische Immunfärbung mit dem anti-CLN6-Antikörper nachgewiesen werden.

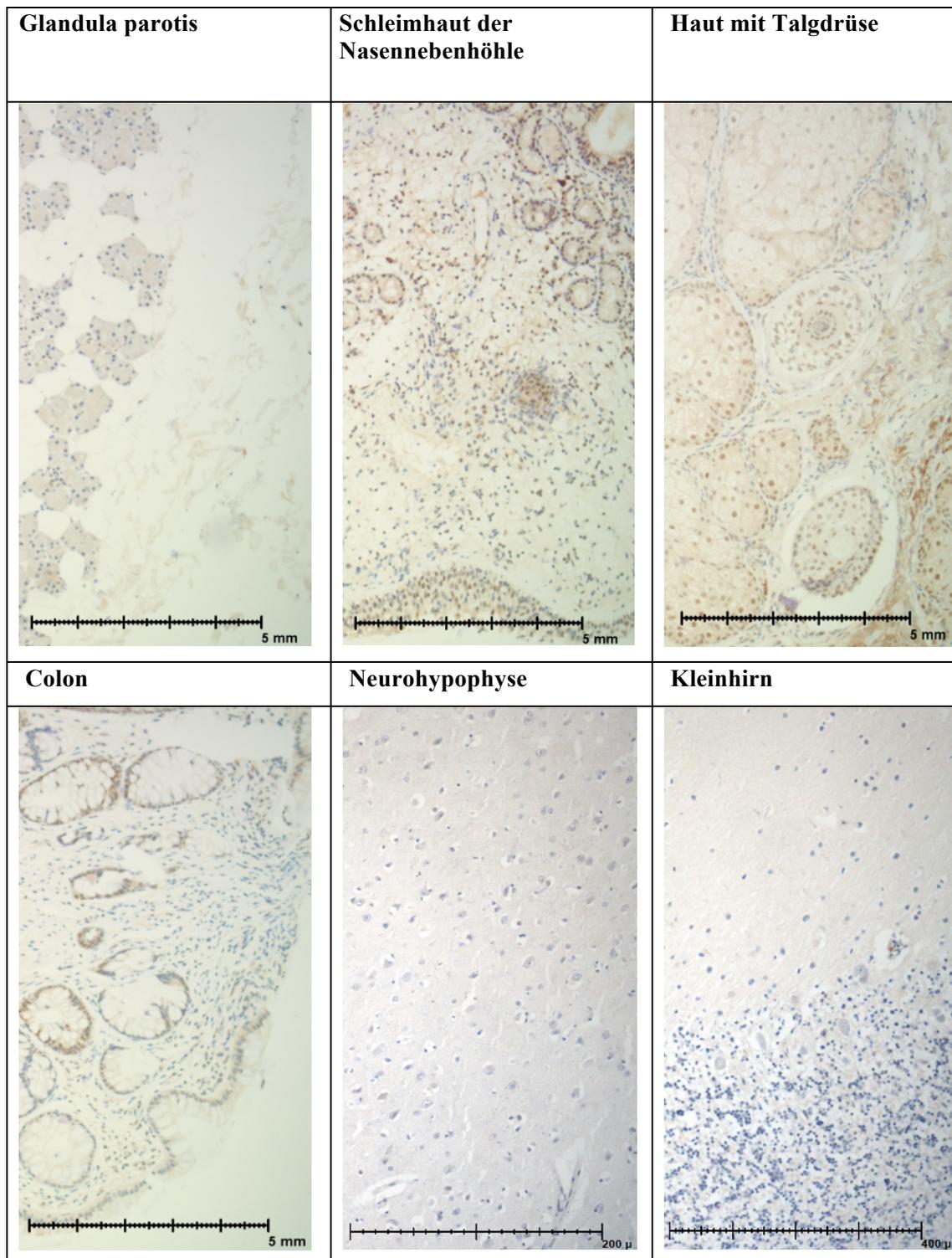


Abb. 18: Immunhistologie: Organe ohne CLN6-Nachweis.

5.6 AUSBLICK

Die dargestellten Resultate dieser Dissertation tragen zur Aufklärung der Rolle des Proteins CLN6 im Proteinstoffwechsel bei, denn seine Funktionen sind bisher nicht bekannt. Bisher gab es auch keine verlässlichen Daten zur Expression von CLN6 auf Proteinebene. Es bedarf dahingehend weiterführender Untersuchungen, wofür auch die im Rahmen dieser Arbeit generierten spezifischen Antikörper zur Anwendung kommen können. Die Ergebnisse der Arbeit sollen publiziert werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bei den Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen (NCL/CLN) handelt es sich um eine Gruppe tödlich verlaufender Speicherkrankheiten im Kindesalter, welche durch Mutationen in den CLN-Proteinen ausgelöst werden. Pathognomonisch bei allen Neuronalen Ceroid Lipofuszinosen ist die intrazelluläre Ablagerung von Ceroid-Lipofuszin. Dabei handelt es sich um Komplexe aus Lipoproteinen, bestehend aus der Subunit C der ATP-Synthase, Sphinglipid-Aktivatoren (SAPs) und weiteren Lipoproteinen. Bisher sind nur von wenigen CLN-Proteinen die Funktionen bekannt. Beispielsweise führt die Mutation im Gen für das CLN1-Protein zu einer eingeschränkten Funktion der Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1). Bei CLN2 ist das Enzym Tripeptidyl-Peptidase 1 (TTP1) eingeschränkt funktionsfähig. Über das CLN6-Protein ist bisher nur wenig bekannt. Es gab zu Beginn dieser Arbeit keine monoklonalen Antikörper, welche eine nähere Untersuchung des Proteins CLN6 ermöglicht hätten. Bisherige Untersuchungen belegen, dass CLN6 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Die CLN6-Erkrankung beginnt im Kleinkindalter und führt zum Tode in der 2.-3. Lebensdekade. Anhand der bekannten Aminosäuresequenz und der Struktur des Proteins wurden die außerhalb der ER-Membran lokalisierten Proteinanteile mit immunogenen AS-Sequenzen identifiziert. Die Aminosäuresequenzen des Proteins CLN6 wurden mit Alignementprogrammen mit denen anderer Proteine verglichen, um Kreuzreaktivitäten auszuschließen. Aus 3 Abschnitten der AS-Sequenz wurden nach den festgelegten Kriterien Peptide synthetisiert und für die Immunisierung von BalbC-Mäusen genutzt. Nach dem Prinzip von Köhler und Milstein wurden durch Zellfusion von murinen Splenozyten und Myelom-Zellen Hybridome generiert. Es konnten 4 Hybridome isoliert werden, welche anti-CLN6-Antikörper produzierten. Die Antikörper der Klone CLN6-201-1D10, CLN6-201-2B2, CLN6-201-3A10 und CLN6-147-4D7 konnten im ELISA CLN6-Peptide und rekombinantes CLN6 spezifisch detektieren. Der reaktivste Antikörper, CLN6-201-1D10, wurde für immunzytologische und für immunhistologische Untersuchungen genutzt. In der Immunzytologie mit der Tumorzelllinie SkBr3 konnte CLN6 im ER durch Nachweis der Kolo-kalisation mit der ER-spezifischen Protein Disulfid Isomerase (PDI) bestätigt werden. In der Immunhistologie wurden OP-Präparate humaner Organe ausgewählt, in denen die verstärkte CLN6-Expression auf mRNA-Ebene bereits nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurden Organe untersucht, welche einen ausgeprägten Lipid/Protein-Stoffwechsel aufweisen und andere Gewebe, welche primär nur einen wenig ausgeprägten Lipid/Protein-Stoffwechsel aufweisen. Die Expression von CLN6 auf Proteinebene konnte im Skelettmuskel, in der Niere sowie in der Leber bestätigt werden, nachdem dies bereits auf mRNA-Ebene bekannt war (Gao *et al.*, 2002, Wheeler *et al.*, 2002). Obwohl es sich bei den CeroidLipofuszinosen um neurodegenerative Erkrankungen handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass CLN6 in cerebralem Gewebe (Kleinhirn), übereinstimmend mit den Untersuchungen von 2002, auf Proteinebene wenig

exprimiert wird. CLN6 konnte immunhistochemisch auch in der Magenschleimhaut und im Mamma-Gewebe nachgewiesen werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Akerström B, Brodin T, Reis K, Björck L (1985). Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 135(4): 2589-2592.

Arsov TI, Smith KR, Damiano J, Franceschetti S, Canafoglia L, Bromhead CJ, Andermann E, Vears DF, Cossette P, Rajagopalan S, McDougall A, Sofia V, Farrell M, Aguglia U, Zini A, Meletti S, Morbin M, Mullen S, Andermann F, Mole SE, Bahlo M, Berkovic SF (2011). Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6. *Am J Hum Genet* 88(5): 566-573. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.04.004.

Autefage H, Albinet V, Garcia V, Berges H, Nicolau ML, Therville N, Altie MF, Caillaud C, Levade T, Andrieu-Abadie N (2009). Lysosomal serine protease CLN2 regulates tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in a Bid-dependent manner. *J Biol Chem* 284: 11507-11516.

Autti T, Raininko R, Launes J, Nuutila A, Santavuori P (1992). Jansky-Bielschowsky variant disease: CT, MRI, and SPECT findings. *Pediatr Neurol* 8: 121-126.

Autti T, Raininko R, Vanhanen SL, Santavuori P (1996). MRI of neuronal ceroid lipofuscinosis. I. Cranial MRI of 30 patients with juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neuroradiology* 38: 476-482.

Barohn RJ, Dowd DC, Kagan-Hallet KS (1992). Congenital ceroid lipofuscinosis. *Pediatr Neurol* 8: 54-59.

Benedict JW, Getty AL, Wishart TM, Gillingwater TH, Pearce DA (2009). Protein product of CLN6 gene responsible for variant late-onset infantile neuronal ceroid lipofuscinosis interacts with CRMP-2. *J Neurosci Res* 87: 2157-2166.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38: 3751-3757.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254.

Bellizzi JJ 3rd, Widom J, Kemp C, Lu JY, Das AK, Hofmann SL, Clardy J (2000). The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proc Natl Acad Sci* 97: 4573.

Berkovic SF, Andermann F, Andermann E, Carpenter S, Wolfe L (1988). Kufs disease: clinical features and forms, *Am J Med Genet Suppl* 5, 105-109.

Bessa C, Teixeira CA, Mangas M, Dias A, Mirinda MC, Guimaraes A, Ferreeira JC, Canas N, Cabral P, Ribeiro MG (2006). Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency. *Mol Genet. Metab* 89: 245-253.

Bible E, Gupta P, Hofmann SL, Cooper JD (2004). Regional and cellular neuropathology in the palmitoyl protein thioesterase-1 null mutant mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 16: 346-359.

Bronson RT, Lake BD, Cook S, Taylor S and Davisson MT (1993). Motor neuron degeneration of mice is a model of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *Ann. Neurol* 33: 381-385.

Bronson RT, Donahue LR, Johnson, KR, Tanner A, Lane PW, Faust JR (1998). Neuronal ceroid lipofuscinosis (nclf), a new disorder of the mouse linked to chromosome 9. *Am J Med Genet* 77: 289-297.

Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398: 80-84.

Chang J, Choi H, Kim H, Jo D, Jeon Y, Noh J, Park W, Jung Y (2007). Neuronal vulnerability of CLN3 deletion to calcium-induced cytotoxicity is mediated by calsenilin. *Hum Mol Genet* 16(3): 317-26.

Charrier E, Reigel S, Rogemend V, Aguera M, Thommaset N, Honnorat J (2003). Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 28(1): 51-64.

Cialone JI, Augustine EF, Newhouse N, Adams H, Vierhile A, Marshall FJ, de Blicke EA, Kwon J, Rothberg PG, Mink JW (2011). Parent-reported benefits of flupirtine in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease; CLN3) are not supported by quantitative data. *J Inher Metab* 34(5): 1075-1081.

Claussen M, Heim P, Knispel J, Goebel HH, Kohlschütter A (1992). Incidence of neuronal ceroid-lipofuscinoses in West Germany: variation of a method for studying autosomal recessive disorders. *Am J Med Genet* 42: 536-538.

Cooper JD (2003). Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis. *Curr Opin Neurol* 16(2): 121-128.

Cooper JD, Messer A, Feng AK, Chua-Couzens J, Mobley WC (1999). Apparent loss and hypertrophy of interneurons in a mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis: Evidence for partial response to insulin-like growth factor-1 treatment. *J Neurosci* 19: 2556–2567.

Cook RW, Jolly R, Palmer DN, Tammen I, Broom MF, McKinnon R (2002). Neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep. *Aust Vet J* 80: 292-297.

de Gregorio N (2010). Etablierung eines Systems zur regulierbaren Expression des adenoviralen E1A zur Untersuchung seines Einflusses auf die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen; Dissertation vorgelegt 2010 der Universität Ulm.

Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Oda K, Kominami E (2000). Characterization of endopeptidase activity of tripeptidyl peptidase-I/CLN2 protein which is deficient in classical late infantile neuronal lipofuscinosis. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 904-908.

Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Koiki M, Ohsawa Y, Taka H, Mineki R, Murayama K, Uchiyama Y, Ueno T, Kominami E (2003). Characterisation of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J Neurochem* 87: 1296-1308.

Felbor U, Kessler B, Mothes W, Goebel HH, Ploegh HL, Bronson RT, Olsen BR (2002). Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12): 7883-7888.

Frattini A1, Pangrazio A, Susani L, Sobacchi C, Mirolo M, Abinun M, Andolina M, Flanagan A, Horwitz EM, Mihci E, Notarangelo LD, Ramenghi U, Teti A, Van Hove J, Vujic D, Young T, Albertini A, Orchard PJ, Vezzoni P, Villa A (2003). Chloride channel ClCN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res* 18(10): 1740-1747.

- Forgacs M (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 917–929.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58: 209-214.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4: 583-591.
- Gachet Y1, Codlin S, Hyams JS, Mole SE (2005). Btn1, the *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the human Batten disease gene CLN3, regulates vacuole homeostasis. *J Cell Sci* 118: 5525-5536.
- Gao H, Boustany RM, Espinola JA, Cotman SL, Srinidhi L, Antonellis KA, Gillis T, Qin X, Liu S, Donahue LR, Bronson RT, Faust JR, Stout D, Maines JL, Lerner TJ, MacDonald ME (2002). Mutations in a novel CLN6-encoded transmembrane protein cause variant neuronal ceroid lipofuscinosis in man and mouse. *Am J Hum Genet* 70: 324-335.
- Goebel HH & Wisniewski KE (2004). Current state of clinical and morphological features in human NCL. *Brain Pathol* 14, 61-69.
- Golabek AA, Kida E, Walus M, Wujek P, Metha P, Wisniewski KE (2003). Biosynthesis, glycolisation and enzymatic processing in vivo of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* 278: 7135-7145.
- Guillas I, Jiang JC, Vionnet C, Roubaty C, Uldry D, Chuard R, Wang J, Jazwinski SM, Conzelmann A (2003). Human homologues of LAG1 reconstitute Acyl-CoA-dependent ceramide synthesis in yeast. *J Biol Chem* 278: 37083-37091.
- Gupta P, Soyombo AA, Atashband A, Wisniewski KE, Shelton JM, Richardson JA, Hammer RE, Hofmann SL (2001). Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13566–13571.
- Haltia M (2003). The neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1-13.
- Heine C, Tyynela J, Cooper JD, Palmer DN, Elleder M, Kohlschütter A, Bräulke T (2003). Enhanced expression of manganese-dependent superoxide dismutase in human and sheep CLN6 tissues. *Biochem J* 376: 369–376.
- Heine C, Koch B, Storch S, Kohlschütter A, Palmer DN, Bräulke T (2004). Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN 6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A. *J Biol Chem* 279: 22347-22352.
- Heine C, Quitsch A, Storch S, Martin Y, Lonka L, Lehesjoki AE, Mole SE, Bräulke T (2007). Topology and endoplasmic reticulum retention signals of the lysosomal storage disease-related membrane protein CLN6. *Mol Membrane Biol* 24: 74-87.
- Hermansson M, Kakela R, Berghall M, Lehesjoki AE, Somerharju P, Lathinen U (2005). Mass spectrometric analysis reveals changes in phospholipid, neutral sphingolipid and sulfatide molecular species in progressive epilepsy with mental retardation, EMPR, brain: a case study. *J Neurochem* 95: 609-617.
- Hirvasniemi A, Lang H, Lehesjoki AE, Leisti J (1994). Northern epilepsy syndrome: an inherited childhood onset epilepsy with associated mental deterioration. *J Med Genet* 31: 177-182.

- Hirvasniemi A, Herrala P, Leisti J (1995). Northern epilepsy syndrome: clinical course and the effect of medication on seizures. *Epilepsia* 36: 792-797.
- Holmberg V, Jalanko A, Isosomppi J, Fabritius AL, Peltonen L, Kopra O (2004). The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glyco-protein expressed in the developing brain. *Neurobiol Dis* 16: 29-40.
- Hou ST, Jiang SX, Smith RA (2008). Permissive and repulsive cues and signaling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *International Review of Cell and Molecular Biology* 267: 125–181.
- Hoffmann, Georg Friedrich, Assmann, Birgit,
Thieme Verlag, Stuttgart 2004 S. 86 Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie
- Isosomppi J, Vesa J, Jalanko A, Petlonen L (2002). Lysosomal localisation of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. *Hum Mol Genet* 11: 885-891.
- Järplid B, Haltia M (1993). An animal model of the infantile type of neuronal Ceroid lipofuscinosis. *J Inher Metab Dis* 16(2): 274-277.
- Jalanko A and Braulke T (2009). Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793: 697- 709.
- Janeway CA and Travers P: *Immunologie*. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford, 1997, S. 85-122.
- Janes RW, Munroe PB, Mitchison HM, Gardiner RM, Mole SE, Wallace BA (1996). A model for Batten disease protein CLN3: functional implications from homology and mutations. *FEBS Lett* 399: 75-77.
- Jenness R (1979). The composition of human milk. *Semin Perinatol* 3(3): 225-39.
- Jennings VM (1995). Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR J* 37: 119-125.
- Jolly RD, Shimada A, Dopfner I, Slack PM, Birtles MJ, Palmer DN (1989). Ceroidlipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis and sequential neuropathological changes in the ovine model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 15: 371-83.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23.
- Kanninen K, Grubman K, Meyerowitz J, Duncan C, Tan JL, Parker SJ, Crouch PJ, Paterson BM, Hickey JL, Donnelly PS, Volitakis I, Tammen I, Palmer DN, White AR (2013). Increased Zinc and Manganese in Parallel with Neurodegeneration, Synaptic Protein Changes and Activation of Akt/GSK3 Signaling in Ovine CLN6 Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *PLoS One* 8(3): e58644.
- Katz ML, Shibuya H, Johnson GS (2001). Animal models for the ceroid lipofuscinoses. *Adv Genet* 45: 183-203.
- Kellner J, Erhard M, Schraner I, Löscher U (1992). The influence of various adjuvants on antibody synthesis following immunization with an hapten. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373: 51-55.

- Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K, (1979). New Mouse Myeloma Cell-Line that has lost Immunoglobulin Expression but permits the Construction of Antibody secreting Hybrid Cell-Lines“. *Journal of Immunology* 123 (4): 1548-1550.
- Khanna R, Wilson SM, Brittain JM, Weimer J, Sultana R, Butterfield A, Hensley K (2012). Opening Pandora's jar: a primer on the putative roles of CRMP2 in a panoply of neurodegenerative, sensory and motor neuron, and central disorders. *Future Neurol* 7(6): 749–771.
- Kim SJ, Zhang Z, Hitomi E, Lee YC, Mukherjee AB (2006). Endoplasmatic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet* 15: 1826-1834.
- Kim SJ, Zhang Z, Hitomi E, Lee YC, Mukherjee AB (2006). Palmitoylprotein thioesterase -1 deficiency leads to the activation of caspase-9 and contributes to rapid neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet* 15: 1580-1586.
- Kishimoto T (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74: 1-10.
- Kitzmüller C1, Haines RL, Codlin S, Cutler DF, Mole SE (2008). A function retained by the common mutant CLN3 protein is responsible for the late onset of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet* 17(2): 303-312.
- Köhler G & Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497. Nachdruck in: *J. Immunol* 174: 2453–2455.
- Kyttala A, Yliannala K, Schu P, Jalanka A, Luzio JP (2005). AP-1 and AP-3 facilitate lysosomal targeting of Batten disease protein CLN3 via its dileucine motif. *J Biol Chem* 280: 10277-10283.
- Kyttala, Ihrke G, Vesa J, Schell MJ, Luzio JP (2004). Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected non-neuronal and neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15: 1313-1323.
- Kurachi Y, Oka A, Itoh M, Mizuguchi M, Hayashi M, Takashima S (2001). Distribution and development of CLN2 protein, the late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product. *Acta Neuropathol* 102: 20-26.
- Lake BD, Henderson DC, Oakhill A, Vellodi A (1995). Bone marrow transplantation in Batten disease (neuronal ceroid lipofuscinosis). Will it work? Preliminary studies on coculture experiments and on bone marrow transplants in late infantile Batten disease. *Am J Med Genet* 57(2): 369-373.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lebrun AH, Storch S, Ruschendorf F, Schmiedt ML, Kyttalaa, Mole SE, Kitzmüller C, Saar K, Mewasingh LD, Boda V, Kohlschütter A, Ullrich K, Bräulke T, Schulz A (2009). Retention of lysosomal protein CLN5 in the endoplasmatic reticulum causes neuronal lipofuscinosis in Asian sibship. *Hum Mutat* 30: E651-E661.
- Lin L, Sohar I, Lackland H, Lobel P (2001). The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *J Biol Chem* 276: 2249-2255.
- Liu BP & Strittmatter SM (2001). Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13(5): 619-626.

- Lonnqvist T, Vanhanen SL, Vettenranta K, Autti T, Rapola J, Santavuori P, Saarinen-Pihkala (2001). Hematopoietic stem cell transplantation in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *UM.Neurology* 57(8): 1411-1416.
- Lonka L, Kyttala A, Ranta S, Jalanko A, Lehesjoki AE (2000). The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet* 9: 1691-1697.
- Lonka L (2004). Neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 - from gene to protein. Academic Dissertation, October 2004. University of Helsinki, Faculty of Medicine, Haartman Institute and Folkhälsan Institute of Genetics and Neuroscience Center and Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology.
- Lonka L, Salonen T, Siintola E, Kopra O, Lehesjoki AE, Jalanko A (2004). Localization of wild-type and mutant neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 proteins in non-neuronal and neuronal cells. *J Neurosci Res* 76: 862-871.
- Lorenz Friederike: Ein bisschen Unsterblichkeit – über die Zellen von Henrietta Lacks. In: *Die Zeit* Nr. 52, 2006, vom 20. Dezember 2006.
- Luellmann-Rauch R (2015). Taschenlehrbuch Histologie, 5. vollständig überarbeitete Auflage. Thieme (Verlag).
- Lu JY, Verkruyse LA, Hoffmann SL (2002). The effects of lysosomotropic agents on normal and INCL cells provide further evidence for the lysosomal nature of palmitoyl-protein thioesterase function. *Biochem Biophys Acta* 1583: 35-44.
- Lyly A, von Schantz C, Heine C, Schmiedt ML, Sipila T, Jalanko A, Kyttala A (2009). Novel interactions of CLN5 support molecular networking between neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biol.* 10: 83.
- Macauley SL, Roberts MS, Wong AM, McSloy F, Reddy AS, Cooper JD, Sands MS (2012). Synergistic effects of central nervous system-directed gene therapy and bone marrow transplantation in the murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Ann Neurol* 71(6): 797-804. doi: 10.1002/ana.23545. Epub 2012 Feb 24.
- Malatack JJ, Consolini DM, Bayever E (2003). The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. *Pediatr Neurol* 29(5): 391-403.
- Martin JJ, Gottlob I, Goegbel HH, Mole SE. (1999). CLN4. Adult NCL. Amsterdam: IOS press. 1999:77-90
- Mayhew IG, Jolly R, Pickett BT, Slack PM. (1985). Ceroid lipofuscinosis (Batten's disease): pathogenesis in blindness in the ovine model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 11, 273-290.
- Merrifield RB (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Amer Chem Soc* 85: 2149-2154.
- Merrifield RB and JM Stewart (1965). Automated peptide synthesis. *Nature* 207: 522-523.
- Merrifield RB (1965). Automated synthesis of peptides. *Science* 150: 178-185.
- Mitchison HM, Lim MJ, Cooper JD (2004). Selectivity and types of cell death in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Brain Pathol* 14(1): 86-96.
- Mole SE (2004). The genetic spectrum of human neuronal ceroid lipofuscinoses. *Brain Pathol* 14(1): 70-76.

- Mole SE, Michaux G, Codlin S, Wheeler RB, Sharp JD, Cutler DF (2004). CLN6, which is associated with a lysosomal storage disease, is an endoplasmic reticulum protein. *Exp Cell Res*. 298(2): 399-406.
- Müller V, Pisa K, Vonck J. ATP-Synthase der Archäen. Neue Einblicke in die Struktur und Funktion eines Energiewandlers. *BIOspektrum* 01/10. 16. Jahrgang S. 19-21.
- Munk K, Abröhl C, Kurth T, Langer T, Nethe-Jaenchen R, Schlatter H, Wolf K (2008). *Biochemie Zellbiologie* 165: 368-371.
- Nijssen PC, Brusse E, Leyten AC, Martin JJ, Teepen JL, Roos RA (2002): Autosomal dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis: parkinsonism due to both striatal and nigral dysfunction. *Mov Disord* 17: 482-487.
- Nijssen PC, Ceuterick C, van Diggelen OP (2003). Autosomal dominant adult neuronal ceroid lipofuscinosis: a novel form of NCL with granular osmiophilic deposits without palmitoyl protein thioesterase 1 deficiency. *Brain Pathol* 13: 574–581.
- Nilson K & Mosbach K (1987). Affinity purification of natural ligands. *Biochemistry* 102: 449-457.
- Osmak M, Kapitanovic S, Vrhovec I, Beketic-Oreskovic L, Jernej B, Eljuga D, Skrk J (1997). Characterization of human breast adenocarcinoma SK-BR-3 cells resistant to doxorubicin. *Neoplasma* 44(3): 157-162.
- Oswald MJ, Palmer DN, Kay GW, Shemilt SJ, Rezaie P, Cooper JD (2005). Glial activation spreads from specific cerebral foci and precedes neurodegeneration in presymptomatic ovine neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6). *Neurobiol Dis* 20: 49-63.
- Palmer DN, Fearnley IM, Walker JE, Hall NA, Lake BD, Wolfe LS, Haltia M, Martinus RD, Jolly RD (1992). Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Med Genet* 42: 561-567.
- Pearce D, Sherman F (1998). A yeast model for the study of Batten disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(12): 6915–6918.
- Pearce D, Ferea T, Nosel S, Das B, Sherman F (1999). Action of BTN1, the yeast orthologue of the gene mutated in Batten disease. *Nat Genet* 22(1): 55–58.
- Persaud-Sawin DA, Mousallem T, Wang C, Zucker A, Kominami E, Boustany RMN (2007). Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: A Common Pathway? *Pediatric Research* 61: 146-152.
- Peters JH, Gieseler RKH (1990). „Selektionsprinzipien“ in Peters JH, Baumgarten H „Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung“, Springer-Verlag. S. 141-149.
- Phillips SN, Benedict JW, Weimer JM, Pearce DA (2005). CLN3, the protein associated with Batten disease: structure, function and localisation. *J Neurosci Res* 79: 573-583.
- Pineda-Trujillo N, Cornejo W, Carrizosa J, Wheeler RB, Munera S, Valencia A, Agudelo-Arango J, Cogollo A, Anderson G, Bedoya G, Mole SE, Ruiz-Linares A (2005). A CLN5 mutation causing an atypical neuronal ceroid lipofuscinosis of juvenile onset. *Neurology* 64: 740-742,
- Pingoud A and Urbanke C (1997). *Arbeitsmethoden der Biochemie*. 1. Aufl. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1997, S. 209-228.

Pontikis CC, Cotman SL, MacDonald ME, Cooper JD (2005). Thalamocortical neuron loss and localized astrocytosis in *Cln3deltaex7/8* knock-in mouse model of Batten disease. *Neurobiol Dis* 20: 823-836.

Pontikis CC, Cella CV, Parihar N, Lim MJ, Chakrabarti S, Mitchinson HM, Mobley WC, Rezaie P, Pearce DA, Cooper JD (2004). Late onset neurodegeneration in the *Cln3*^{-/-} mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis is preceded by low level glial activation. *Brain Res* 1023: 231-242.

Ranta S, Zhang Y, Ross B, Lonka L, Takkunen E, Messer A, Sharp J, Wheeler R, Kusumi K, Mole S, Liu W, Soares MB, de Fatima Bonaldo M, Hirvasniemi A, Chappelle ADL, Gilliam TC, Lehesjoki AE (1999). The neuronal ceroid lipofuscinoses in human EPMR and *mnd* mutant mice are associated with mutations in *CLN8*. *Nat Genet* 23: 233-236.

Revillard J-P: Immunologie. 2nd ed. De Boeck & Larcier SA, Bruxelles, 1995, 367 pp.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santavuori P, Rapola J, Sainio K, Raitta C (1982). A variant of Jansky-Bielschowsky disease. *Neuropediatrics* 13(3): 135-41.

Santavuori P, Lappi M, Raitta C, Sainio K, Duodecim (1989). Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Duodecim* 1989 105(3): 273-279.

Santavuori P1, Rapola J, Nuutila A, Raininko R, Lappi M, Launes J, Herva R, Sainio K (1991). The spectrum of Jansky-Bielschowsky disease. *Neuropediatrics* 22(2): 92-96.

Schmidt EF & Strittmatter SM (2007). The CRMP-Family of roteins and their role in Sema3A Signaling. *Adv Exp Med Biol* 600: 1-11.

Schmiedt ML, Bessa C, Heine C, Ribeiro MG, Jalanko A, Kyttala A (2010). The neuronal ceroid lipofuscinosis protein *CLN5*: new insights into cellular maturation, transport, and consequences of mutations. *Hum Mutat* 31: 356-365.

Selden NRI, Al-Uzri A, Huhn SL, Koch TK, Sikora DM, Nguyen-Driver MD, Guillaume DJ, Koh JL, Gultekin SH, Anderson JC, Vogel H, Sutcliffe TL, Jacobs Y, Steiner RD (2013). Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosurg Pediatr* 11(6): 643-652. doi: 10.3171/2013.3.PEDS12397.

Sharp JD, Wheeler RB, Lake BD, Savukoski M, Jarvela IE, Peltonen L, Gardiner RM, Williams RE (1997). Loci for classical and a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis map to chromosomes 11p15 and 15q21-23. *Hum Molec Genet.* 6: 591-595.

Sharp JD, Wheeler RB, Lake BD, Fox M, Gardiner RM, Williams RE (1999). Genetic and physical mapping of the *CLN6* gene on chromosome 15q21-23. *Mol Genet Metab* 66: 329-331.

Siintola E, Partanen S, Strömme P, Haapanen A, Haltian M, Maehlen J, Lehesjoki AE, Tyynela J (2006). Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroidlipofuscinosis. *Brain.* 2006 Jun;129(Pt 6):1438-45. Epub 2006 May 2.

Siintola E, Topcu M, Aula N, Lohi H, Minassian BA, Paterson AD, Liu XQ, Wilson C, Lahtinen U, Anttonen AK, Lehesjoki AE (2007). The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene *MFSD8* encodes a putative lysosomal transporter. *Am J Hum Genet* 81: 136-146.

Sleat DE, Sohar I, Lackland H, Majercak J, Lobel P (1996). Rat brain contains high levels of mannose-6-phosphorylated glycoproteins including lysosomal enzymes and palmitoyl-protein thioesterase, an enzyme implicated in infantile neuronal lipofuscinosis. *J Biol Chem* 271: 19191–19198.

Sleat DE, Donnelly RJ, Lackland H, Liu CG, Sohar I, Pullarkat RK, Lobel P (1997). Associations of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science* 277: 1802-1805.

Sleat DE, Gin RM, Sohar I, Wieniewski K, Slower-Brooks S, Pullarkat RK, Plamer DN, Lerner TJ, Boustany RM, Uldall P, Siakotos AN, Donnelly RJ, Lobel P (1999). Mutational analysis of the defective protease in classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, a neurodegenerative storage disorder. *Am J Hum Genet* 64: 1511-1523.

Sleat DE, Ding L, Wang S, Zhao C, Wang Y, Xin W, Zheng H, Moore DF, Sims KB, Lobel P (2009). Mass spectrometry-based protein profiling to determine the cause of lysosomal storage diseases of unknown etiology. *Mol Cell Proteomics* 8: 1708-1718.

Smith KRI, Dahl HH, Canafoglia L, Andermann E, Damiano J, Morbin M, Bruni AC, Giaccone G, Cossette P, Saftig P, Grötzinger J, Schwake M, Andermann F, Staropoli JF, Sims KB, Mole SE, Franceschetti S, Alexander NA, Cooper JD, Chapman HA, Carpenter S, Berkovic SF, Bahlo M (2013). Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet* 22(7): 1417-23. doi: 10.1093/hmg/dds558.

Steenhuis P, Herder S, Gelis S, Braulke T, Storch S (2010). Lysosomal targeting of the CLN7 membrane glycoprotein and transport via the plasma membrane require a dileucine motif. *Traffic*. 2010 Jul 1;11(7):987-1000. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01073.x. Epub 2010 Apr 16.

Steinfeld R, Steinke HB, Isbrandt D, Kohlschütter A, Gartner J (2004). Mutations in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase I to lysosomes. *Hum Mol Genet* 13: 2483-2491.

Steinfeld R, Fuhrmann JC, Gartner J (2006). Detection of tripeptidyl peptidase I activity in living cells by fluorogenic substrates. *J Histochem Cytochem* 54: 991-996.

Steinfeld R (2010). Diagnostics and treatment of neuronal ceroid lipofuscinoses from the viewpoint of neuropediatricians. *Ophthalmologie* 107(7): 616-620.

Stogmann E, El Tawil S, Wagenstaller J, Gaber A, Edris S, Abdelhady A, Assem-Hilger E, Leutmezer F, Bonelli S, Baumgartner C, Zimprich F, Strom TM, Zimprich A (2009). A novel mutation in the MFSD8 gene in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurogenetics* 10: 73-77.

Storch S, Pohl S, Quitsch A, Falley K, Braulke T (2007). C-terminal prenylation of the CLN3 membrane glycoprotein is required for efficient endosomal sorting to lysosomes. *Traffic* 8: 431-444.

Storch S, Pohl S, Braulke T (2004). A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmatic domain of the Batten disease-related CLN3 protein is required for efficient lysosomal targeting. *J Biol Chem* 279: 53625-53634.

Tammen I, Houweling PJ, Frugier T, Mitchell NL, Kay GW, Cavanagh JAL, Cook RW, Raadsma HW, Palmer DN (2006). A missense mutation (c.184C>T) in ovine CLN6 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep whereas affected South Hampshire sheep have reduced levels of CLN6 mRNA. *Biochem Biophys Acta* 10: 898-905.

- Tang CH, Lee JW, Galvez MG, Robillard L, Mole SE, Chapman HA (2006). Murine cathepsin F deficiency causes neuronal lipofuscinosis and late-onset neurological disease. *Mol Cell Biol* 26(6): 2309-16.
- Tsiakas K, Steinfeld R, Storch S, Ezaki J, Lukacs Z, Kominami E, Kohlschütter, Ulrich K, Braulke T (2004). Mutation of the glycosylated asparagine residue 286 in human CLN2 protein results in loss of enzymatic activity. *Glycobiology* 14: 1C-5C .
- Topcu M, Tan H, Yalnizoglu D, Usubutun A, Saatci I, Aynac M, Anlar B, Topaloglu H, Turanli G, Kose G , Aysun S (2004). Evaluation of 36 patients from Turkey with neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical, neurophysiological, neuroradiological and histopathologic studies. *Turk J Pediat* 46: 1-10.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9): 4350-4354.
- Uusi-Rauva K, Liiro K, Tanhuanpää K, Kopra O, Martin-Vasallo P, Kyttälä A, Jalanko A (2008). Novel interactions of CLN3 protein link Batten disease to dysregulation of fodrin- Na^+ , K^+ -ATPase complex. *Exp Cell Res* 314: 2895-2905.
- Van der Ven H (2002). Zur Wirksamkeit verschiedener Adjuvantien in bakteriellen bestandsspezifischen Vakzinen für Puten. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Vanhanen SL, Raininko R, Autti T, Santavuori P (1995). MRI evaluation of the brain in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Part 2: MRI findings in 21 patients. *J Child Neurol* 10: 444-450.
- Vesa J, Hellsten E, Verkruyse LA, Camp LA, Rapola J, Santavuori P, Hofmann SL, Peltonen L (1995). Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* 376: 584–587.
- Vesa J and Peltonen L (2002). Mutated genes in juvenile and variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinoses encode lysosomal proteins. *Curr Mol Med* 2: 439-444.
- Vesa J, Chin MH, Oelschlager K, Isosomppi J, DellAngelica EC, Jalanko A, Peltonen L (2002). Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol Biol Cell* 13: 2410-2420.
- von Bülow R, Schmidt B, Dierks T, Schwabauer N, Schilling K, Weber E, Usón I, von Figura K (2002). Defective Oligomerization of Arylsulfatase A as a cause of its stability in Lysosomes and Metachromatic Leukodystrophy. *J Biol Chem* 277: 9455-9461.
- Waguespack SG, Koller DL, White KE, Fishburn T, Carn G, Buckwalter KA, Johnson M, Kocisko M, Evans WE, Foroud T, Econs MJ (2003). Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations and autosomal dominant osteopetrosis, type II. *J Bone Miner Res* 18(8): 1513-1518.
- Waguespack SG, Hui SL, Dimeglio LA, Econs MJ (2007). Autosomal dominant osteopetrosis: clinical severity and natural history of 94 subjects with a chloride channel 7 gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 92(3): 771-778.
- Welsch Lehrbuch Histologie Urban & Fischer 2003 S.1 - 13, 141 - 149, 405 – 413.
- Wheeler RB, Sharp JD, Schultz RA, Joslin JM, Williams RE, Mole SE (2002). The gene mutated in variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6) and in *nclf* mutant mice encodes a novel predicted transmembrane protein. *Am J Hum Genet* 70: 537-542.

Williams R, Santavuori P, Peltonen L, Gardiner RM, Jarvela I (1994). A variant form of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN5) is not an allelic form of Batten (Spielmeyer-Vogt-Sjogren, CLN3) disease: exclusion of linkage to the CLN3 region of chromosome 16. *Genomics* 20: 289-290.

Winter E, Ponting CP (2002). "TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains ?". *Trends Biochem Sci* 27: 381–383.

Wisniewski KE, Kida E, Walu M, Wujek P, Kaczmarski W, Golabek AA (2001). Tripeptidyl-peptidase I in neuronal ceroid lipofuscinosis and other lysosomal storage disorders. *Eur J Paediatr Neurol* 5(Suppl A): 74-79.

8. THESEN

1. Mutationen im CLN6-Gen führen in allen Körperzellen zu Ablagerungen von Lipoproteinen, was zu einer CLN6-Protein-assoziierten Neuronalen Ceroid Lipofuszinose führt.
2. Die Funktion des Proteins CLN6 ist ungeklärt. CLN6 konnte bisher nur auf Transkriptionsebene in Leber, Niere, Herz und Skelettmuskel nachgewiesen werden.
3. Im Rahmen dieser Dissertation sind spezifische monoklonale Antikörper gegen AS-Sequenzen des humanen CLN6-Proteins generiert und charakterisiert worden.
4. Es konnten 4 Hybridome gewonnen werden. Die Hybridome CLN6-201-1D10 und CLN6-201-2B2 produzieren AK, welche an die Aminosäuresequenz im Bereich $_{151}\text{NPIIKNLKPETLID}_{164}$ binden, CLN6-147-4D7 und CLN6-201-3A10 Antikörper, welche das Peptid mit der AS-Sequenz $_{275}\text{WVAWLWNDPVLRRKKYP}_{291}$ erkennen.
5. Diese 4 monoklonalen Antikörper konnten im ELISA und im Immunoblot rekombinantes CLN6-Protein detektieren.
6. Der Antikörper CLN6-201-1D10 wies im Immunoblot die höchste Empfindlichkeit auf.
7. mAK CLN6-201-1D10 konnte in der Immunzytologie das Protein CLN6 in der Tumorzelllinie SKBR3 detektieren.
8. Immunzytologisch konnte durch Kolo-kalisation mit PDI bestätigt werden, dass das CLN6-Protein im ER lokalisiert ist.
9. In immunhistologischen Untersuchungen wurden in der Niere, der Leber und im Skelettmuskel spezifische Anfärbungen nachgewiesen, was die Expression von CLN6 auf Proteinebene bestätigt. Untersuchungsergebnisse, nach denen CLN6 auf Transkriptionsebene in cerebralen Geweben vermindert exprimiert wird konnten auf Proteinebene bestätigt werden.
10. In den Foveolae des Magen-Corpus, sowie in Zellen von weiblichen Mamma-Präparaten konnte eine spezifische granuläre zytoplasmatische Färbung nachgewiesen werden, welche auf Expression von CLN6 schließen lässt.

LEBENS LAUF:

Auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes wird aus Datenschutz-Gründen verzichtet.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, den 23. August 2016

Thomas Cramer

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertationsarbeit bisher keiner anderen Prüfungsbehörde in gleicher oder abgewandelter Form vorgelegt wurde.

Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Halle/Saale, den 23. August 2016

Thomas Cramer

DANKSAGUNG

Diese Dissertation war für mich umfangreich an Arbeit und notwendigem Engagement. Das gelungene Abschlusswerk rechtfertigte alle Bemühungen aber für meine liebe Frau und für meine Kinder bedeutete diese Arbeit ein hohes Maß an Belastung und Verzicht. Ich danke aber im besonderen meiner lieben Frau Anna, die sich in Zurückhaltung in eigenen Wünschen übte und dadurch häufig meine familiären Aufgaben übernahm. Teilweise tat sie das auch über lange Zeiträume und damit unterstützte sie meine berufliche und wissenschaftliche Arbeit entscheidend. Für unsere Kinder, unsere Familie, für mich, meinen Beruf und meine Dissertation setzte Sie Ihre Belange und Ihre wissenschaftliche Arbeit zurück, was ich Ihr nie vergesse. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich liebe Dich und danke dafür.

Auch für meine Freunde wurde durch diese Arbeit abverlangt, viele Stunden auf mich zu verzichten, in welchen ich mich meiner wissenschaftlichen Arbeit widmete. Das bedeutete für für unsere Freundschaft fehlende Zeit die ich für die Arbeit investieren musste und somit nicht mit meinen Freunden verbringen konnte. Trotzdem war gerade auch ihr Engagement, ihre Hingabe und ihre Zuarbeit für diese Arbeit unschätzbar wichtig gewesen und ein paar anerkennende Worte sollen Ausdruck meiner tiefen Dankbarkeit gegenüber ihnen sein.

Unzählige Stunden sowie viel Freiraum zum wissenschaftlichen Arbeiten, Motivation sowie weitere Unterstützung z.B. in Korrekturfragen wurden mir auch durch meine Familien in Köthen und Potsdam ermöglicht, was hier dankend erwähnt werden muss.

Das Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten wurde während des Studiums im „Seminar der Biochemie“ bei Dr. E. Weber während meines Medizinstudiums gelegt, woraufhin die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe begann.

Für die Bereitstellung des Themas bin ich ihm bis heute sehr dankbar. Die Arbeit mit ihm und seinen Mitarbeitern insbesondere Frau Medek, Gerit und Andreas hat mir viel Freude bereitet und sie war immer von Freundschaft und großer Hilfsbereitschaft und den ein oder anderen politisch-gesellschaftlich ausführlich geführten Konversationen geprägt. Und wahrscheinlich waren es genau die stundenlangen Erörterungen ebenso wissenschaftlich wie teilweise Gesellschaftskritisch, sowie die Erklärungen und die Motivivation zur Fortsetzung der wissenschaftlichen Tätigkeit von Dr. Weber und Frau Medek, was den Fortschritt der Arbeit entscheidend positiv beeinflusst hat. Dies bedeutete gerade aufgrund meinen langandauernden beruflich veranlassten Abwesenheiten mit der Deutschen Marine und daraus bedingten sehr großen Entfernungen zum Institut in Halle einen erheblichen Stabilitätsfaktor für die Fortführung der wissenschaftlichen Tätigkeit. Auch Rückschläge im Rahmen der Untersuchungen konnten dadurch „verdaut“ werden. Großen Dank gebührt Frau Medek und Herrn Dr. Weber für die dadurch gewonnene „Innere Größe“, wissenschaftliche Kompetenz und den vermittelten Blick auf Gesellschaft und Politik. Danke auch für die vielen, vielen Stunden für mich und für meine Arbeit gerade in den zurückliegenden 6 Monaten. Frau Dr. Rank aus dem Institut für Pathologie im Martha-Maria-Krankenhaus Halle/Dörlau hat mir durch Ihr Vertrauen und unsere gemeinsamen Untersuchungen zum entscheidenden

Durchbruch mit meiner Arbeit verholfen. Vielen Dank dafür. Ich danke auch ausdrücklich dem dortigen Institutsdirektor für seine Unterstützung.

Ich danke Professor Dr. Hollemann ausdrücklich für die Übernahme der Dissertation und dem Direktor des Instituts für Physiologische Chemie, Professor Dr. Posern, für seine Unterstützung. Rainer und Hans Joachim Euch gebührt Dank für den Blick auf Orthographie und für eure Gestaltungshinweise. Danke an alle die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.