Aus der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
(Prof. Dr. med. J. Gärtner)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Auswirkung verschiedener Cathepsin D Mutationen auf die zelluläre Autophagie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ole Lenard Lehmbäcker

aus

Berlin

Göttingen 2025

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer:	Prof. Dr. Dr. med. R. Steinfeld
Ko-Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. M. Thumm

Prüfungskommission

Referent	Prof. Dr. Dr. med. R. Steinfeld
Ko-Referent:	Prof. Dr. rer. nat. R. Kehlenbach
Drittreferentin:	Prof. Dr. med. H. Hahn

Datum der mündlichen Prüfung: 10.07.2025

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Auswirkung verschiedener Cathepsin D Mutationen auf die zelluläre Autophagie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 22.06.2024 ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

Abbildungsverzeichnis ..... **IV**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Neuronale Ceroidlipofuszinosen (NCL) - klinische Manifestation und genetische Heterogenität 1

1.2 Cathepsin D-Defizienz als Ursache der NCL Typ 10 3

1.2.1 Biogenese von Cathepsin D 3

1.2.2 Bekannte Mutationen des *CTSD*-Gens 5

1.2.3 Tiermodelle der Cathepsin D-Defizienz 7

1.3 Zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration bei Cathepsin D-Defizienz 7

1.4 Autophagie 9

1.4.1 Formen und biologische Funktionen der Autophagie 9

1.4.2 Autophagozytotischer Fluss – ein mehrschrittiger Prozess 10

1.5 Autophagiedefekte und Neurodegeneration 13

1.6 Messung des autophagozytotischen Flusses 13

1.7 Zielsetzung der Arbeit 14

2 Material und Methoden **16**

2.1 Material 16

2.2 Verwandte Oligonukleotide (Primer) 24

2.3 Verwandte Plasmide 24

2.4 Enzyme 25

2.5 Antikörper 26

2.6 Zelllinien 27

2.7 Verwandte Software 27

2.8 Mutationen im *CTSD*-Gen 28

2.9 Molekularbiologische Methoden 28

2.9.1 Plasmide 28

2.9.2 Ortsgerichtete Mutagenese-Polymerasekettenreaktion (PCR) 28

2.9.3 Transformation kompetenter Bakterien 29

2.9.4 Minipräparation von Plasmid-DNS aus bakterieller Übernachtkultur 30

2.9.5 Sequenzierung von Plasmid-DNS 31

2.9.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNS 32

2.9.7 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion von DNS-Fragmenten 33

2.9.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen 33
2.9.9 Ligation 34
2.9.10 Midikultur transformierter, kompetenter *E. coli* 34
2.10 Zellkultivierung 35
2.10.1 Kulturbedingungen der Zellen 35
2.10.2 Anfertigung von Kryostocks und Auftauen der Zellen 35
2.10.3 Transfektionen und Transduktionen 36
2.11 Proteinbiochemische Methoden 38
2.11.1 Zelllyse zur Proteinextraktion 38
2.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay 38
2.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 39
2.11.4 *Semi-Dry-Blotting* und Immundetektion von Proteinbanden 39
2.12 Fluoreszenzmikroskopie 40
2.12.1 Intrazellulärer Nachweis des Cathepsin D-Wildtyps und der verschiedenen Cathepsin D-Mutanten 40
2.12.2 Untersuchung der Kolokalisation von Cathepsin D und LAMP I 41
2.12.3 Kultivierung der mCherry-GFP-LC3 transfizierten MEF zur Untersuchung der autophagozytotischen Flussdynamik 43
2.13 Bestimmung der Cathepsin D-Enzymaktivität 43

3 Ergebnisse 45

3.1 Generierung und Charakterisierung stabiler Cathepsin D-Mutanten in Cathepsin D-defizienten MEF 45
3.1.1 Heterologe Expression des Cathepsin D-Wildtyps und der verschiedenen Mutanten in Cathepsin D-defizienten MEF 45
3.1.2 Vergleich verschiedener Antikörper zur Immundetektion von Cathepsin D im Western Blot 46
3.1.3 Cathepsin D-Enzymaktivität der verschiedenen Cathepsin D-Mutanten in stabil transfizierten Cathepsin D-defizienten MEF 47
3.1.4 Intrazelluläre Lokalisation der Cathepsin D-Mutanten und des -Wildtyps in stabil transfizierten MEF 48
3.2 Autophagiedynamik in den Cathepsin D-Wildtyp- und Mutanten-exprimierenden MEF nach Transduktion mit mCherry-GFP-LC3 52
3.2.1 Vergleich verschiedener Serumentzugs- und Rekonvaleszenzzeiten zur Behandlung der mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF 52
3.2.2 mCherry-GFP-LC3 als funktionelles Konstrukt zur Untersuchung der Autophagiedynamik in den transfizierten MEF 54
3.2.3 Autophagolysosomendynamik in mCherry-GFP-LC3 transduzierten Cathepsin D-Wildtyp und -Mutanten stabil exprimierenden MEF 56

4 Diskussion 61

4.1 Proteinstrukturelle Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Enzymaktivitätsniveaus der untersuchten Cathepsin D-Mutanten 61
4.1.1 Auswirkung der p.F229I-Mutation auf pH-abhängige Konformitäts-änderungen von Cathepsin D 61
4.1.2 Kompletter Aktivitätsverlust der p.F229del-Mutante 62
4.1.3 Auswirkungen der p.G149V-Mutation auf den Substratbindungsprozess von Cathepsin D 63

4.1.4 Lage der p.K331del-Mutation in einer für die intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin D kritischen Domäne 65
4.1.5 Interaktionspotenzial der p.R399H-Mutante mit pH-abhängigen Konformitätsänderungen von Cathepsin D 66
4.1.6 Kritische Lage der p.S100F-Mutation nahe dem aktiven Zentrum von Cathepsin D 67
4.1.7 Fehlende Nachweisbarkeit der c.insC268_269-Mutante in der Immunfluoreszenz und im Western Blot 69
4.1.8 Mögliche Auswirkungen der p.W383C-Mutation auf intramolekulare Disulfidbrückenbindungen 69
4.2 Beeinträchtigung des autophagozytotischen Flusses in mit den Cathepsin D-Mutanten transfizierten MEF 70
4.2.1 Limitationen bei der Beurteilung des autophagozytotischen Flusses 71
4.2.2 Vergleich mit anderen Modellen der Cathepsin D-Defizienz 72
4.2.3 Autophagie-unabhängige Zelltodmechanismen bei Cathepsin D-Defizienz und Übertragbarkeit auf die in-vivo-Situation 75
4.2.4 Methodische Limitationen des verwandten mCherry-GFP-LC3-Konstruktes bei der Untersuchung des autophagozytotischen Flusses 77
4.2.5 Weiterführende Untersuchung zur Charakterisierung des autophagozytotischen Flusses und zur proteolytischen Redundanz von Cathepsin D 79
4.3 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse 80

5 Zusammenfassung 83

6 Literaturverzeichnis 86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genstruktur des Cathepsin D-Gens. 6
Abbildung 2: Schematischer Ablauf des autophagozytotischen Flusses als Mehrschrittprozess (in Anlehnung an Choi et al. 2013). 12
Abbildung 3: Western Blot der heterologen Expression des Cathepsin D-Wildtyps und der Cathepsin D-Mutanten in Cathepsin D-defizienten MEF. 45
Abbildung 4: Western Blot zum Vergleich verschiedener Antikörper zur Cathepsin D-Immundetektion. 46
Abbildung 5: Cathepsin D-Enzymaktivität in stabil transfizierten MEF. 48
Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie des Cathepsin D-Wildtyps und der unter (a)-(e) genannten -Mutanten. 50
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie der unter (f)-(j) genannten Cathepsin D-Mutanten. 51
Abbildung 8: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF zu verschiedenen Serumentzugs- und Rekonvaleszenzzeiten. 54
Abbildung 9: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF nach dreistündiger Kultivierung in serumfreiem Medium (EBSS) mit Bafilomycin A1. 55
Abbildung 10: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF unter Basalbedingungen (Kultivierung in DMEM). 57
Abbildung 11: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF nach Kultivierung in EBSS für 3 h. 58
Abbildung 12: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF nach Kultivierung in EBSS für 3 h und anschließender Kultivierung in DMEM für 1h. 60
Abbildung 13: Lage der p.F229I-Mutation innerhalb Cathepsin D. 62
Abbildung 14: Lage der p.G149V-Mutation innerhalb Cathepsin D. 64
Abbildung 15: Lage der p.K331del-Mutation innerhalb Cathepsin D. 66
Abbildung 16: Lage der p.R399H-Mutation innerhalb Cathepsin D. 67
Abbildung 17: Lage der p.S100F-Mutation innerhalb Cathepsin D. 68
Abbildung 18: Detailansicht des aktiven Zentrums von Cathepsin D. 69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Formen der neuronalen Ceroidlipofuszinosen....2
Tabelle 2: Geräte mit jeweiliger Herstellerangabe....16
Tabelle 3: Materialien mit jeweiliger Herstellerangabe....18
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien mit jeweiliger Herstellerangabe....19
Tabelle 5: Pufferlösungen und Medien mit jeweiliger Zusammensetzung....22
Tabelle 6: Kits mit jeweiliger Herstellerangabe....23
Tabelle 7: Cathepsin D - Mutageneseprimer....24
Tabelle 8: Sequenzierungsprimer....24
Tabelle 9: Plasmide mit jeweiliger Funktion und Herkunft....24
Tabelle 10: Enzyme mit jeweiliger Funktion und Herstellerangabe....25
Tabelle 11: Antikörper mit jeweiliger Spezieshherkunft, Herstellerangabe und Anwendung....26
Tabelle 12: Eingesetzte Zelllinien mit Bezeichnung und Herkunft....27
Tabelle 13: Software mit jeweiliger Herstellerangabe....27
Tabelle 14: Pipettierschema für den Ansatz der ortsgerichteten Mutagenese-PCR....29
Tabelle 15: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese-PCR....29
Tabelle 16: Pipettierschema für den Ansatz zur Sequenzierungs-PCR....31
Tabelle 17: PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR....32
Tabelle 18: Pipettierschema für den Ansatz des Restriktionsverdaus....32

Abkürzungsverzeichnis

Atg	*autophagy related protein*
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure, *bicinchoninic acid*
CTSD	Cathepsin D-Gen
Da	Dalton
DAPI	4´, 6-Diamidin-2-phenylindol
del	Deletion
DMEM	*Dulbecco´s modified eagle medium*
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
EBSS	Earle-Salze, *Earle´s balanced salt solution*
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	Erdbeschleunigung, Ortsfaktor
GABA	gamma-Aminobuttersäure, *gamma amino buteric acid*
GFP	grün fluoreszierendes Protein, *green fluorescent protein*
IgG	Immunglobulin G
ins	Insertion
kbp	Kilo-Basenpaare
LAMP I	lysosomal assoziiertes Membranprotein 1 (CD 107a)
LC3	Mikrotubuli-assoziierte Proteine 1A/1B, leichte Kette 3B, *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*
LC3 I	Mikrotubuli-assoziierte Proteine 1A/1B, leichte Kette 3B, *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B,* zytoplasmatische Form
LC3 II	Mikrotubuli-assoziierte Proteine 1A/1B, leichte Kette 3B, *microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B,* Autophagosomen-assoziierte Form
MEF	murine embryonale Fibroblasten, *murine embryonic fibroblasts*
mCherry	monomer rot fluoreszierendes Protein (mCherry)
mTOR	mTOR, *mechanistic target of rapamycin*
NCL	neuronale Ceroidlipofuszinose
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, *phosphate buffered saline*
PCR	Polymerasekettenreaktion, *polymerase chain reaction*
PI3KC3	*phosphatidylinositol 3-kinase katalytic subunit type 3*
p62	Sequestosom 1, *sequestosome 1*
rpm	Rotationen pro Minute, *revolutions per minute*
SDS	Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecylsulfate*
ULK1	*Unc 51 – like kinase 1*
v/v	Volumenprozent, *volume by volume*
w/v	Masse pro Volumen, *weight by volume*
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Neuronale Ceroidlipofuszinosen (NCL) - klinische Manifestation und genetische Heterogenität

Mit einer weltweiten Inzidenz von 1-3:100.000 (jeweils Betroffene bezogen auf lebende Neugeborene) stellen alle Formen der Neuronalen Ceroidlipofuszinose (NCL) kumulativ die häufigste erbliche Ursache einer progredienten Enzephalopathie im Kindesalter dar (Haltia 2006; Simonati und Williams 2022). Die Definition von NCL beruht auf pathologischen Kriterien, nämlich dem Vorhandensein von charakteristischem, ultrastrukturellem Speichermaterial und von autofluoreszierendem Lipofuszin. Zeman und Kolleg*innen führten den Begriff "Neuronale Ceroidlipofuszinose" auf der Grundlage der histochemischen und ultrastrukturellen Merkmale in Abgrenzung gegen andere Erkrankungen, die mit einer Neurodegeneration im Kindesalter einhergehen, ein (Zeman und Dyken 1969). Die NCL werden in Abhängigkeit ihres klinischen Manifestationsalters in infantile, spät-infantile, juvenile und adulte Formen klassifiziert (Jalanko und Braulke 2009; Simonati und Williams 2022). Während bei Verlaufsformen mit frühem Krankheitsbeginn im Säuglings- und Kindesalter ein Verlust kognitiver und motorischer Funktionen, eine retinale Degeneration und das Auftreten epileptischer Anfälle charakteristische klinische Symptome sind, zeigen die selteneren Formen mit Manifestation im Erwachsenenalter überwiegend Symptome einer langsam fortschreitenden demenziellen Erkrankung (Haltia 2003). Trotz ihrer ähnlichen klinischen Phänotypen zeigen die Formen der NCL eine genetische Heterogenität mit derzeit 13 bekannten zugrunde liegenden Gendefekten (University College London 2019). Die entsprechenden Genprodukte sind subzellulär in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert, unter anderem dem Endoplasmatischen Retikulum, Endosomen und Lysosomen, und stellen sowohl lösliche als auch membrangebundene Proteine dar (Kyttälä et al. 2006).

Namensgebend für die NCL ist die histopathologische Akkumulation von lipopigmentartigem Speichermaterial in Neuronen sowie in Zellen anderer nicht-neuronaler Gewebe (Jalanko und Braulke 2009). Als biochemische Hauptbestandteile des Speichermaterials wurden unter anderem die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthetase und die Sphingolipidaktivatorproteine A und D identifiziert (Palmer et al. 1992; Tyynelä et al. 1993). Neben dem Proteinanteil von ca. 60% besteht das Speichermaterial unter anderem aus Dolichol, Lipiden und Metallen, darunter vorwiegend Eisen (Seehafer und Pearce 2006). Dabei ist das vorrangig im zellulären Einschlussmaterial vorliegende Protein vom Subtyp der NCL abhängig (Jalanko und Braulke 2009). Einhergehend mit der Akkumulation dieses Proteinmaterials zeigt sich im zentralen Nervensystem eine frühe Gliaaktivierung mit konsekutivem, vornehmlich kortikalem Neuronenverlust. Hierbei ist

eine regionale Betonung im Bereich der Großhirn- und nur im Fall einiger Subtypen der NCL im Bereich der Kleinhirnrinde unter weitestgehender Aussparung subkortikaler Strukturen auffällig (Haltia 2003; Mitchison et al. 2004). Im limbischen System wurde jedoch neurohistopathologisch eine auf spezifische Subareale des Hippokampus beschränkte Neurodegeneration für einige Subtypen der NCL identifiziert, wobei hinsichtlich der betroffenen Neuronenpopulation vorrangig GABA-erge Interneurone beschrieben wurden (Mitchison et al. 2004). Ferner wurde für einige NCL-Formen eine thalamische Gliose beschrieben, die dem kortikalen Neuronenverlust zeitlich vorausgeht (Simonati und Williams 2022).

In der Vergangenheit wurden die neuronalen Ceroidlipofuszinosen basierend auf dem klinischen Manifestationsalter der Betroffenen oder der ultrastrukturellen Beschaffenheit des zellulären Einschlussmaterials klassifiziert (Haltia 2003). Dabei wurden spezielle ultrastrukturelle Einschlusskörperchen jeweils mit einem bestimmten NCL-Subtyp korreliert. Diese Einteilung wurde jedoch zugunsten einer genetisch basierten Klassifikation verlassen (Jalanko und Braulke 2009). Mit einer Ausnahme, der NCL Typ 4, folgen alle Formen der NCL einem autosomal-rezessiven Erbgang. Zusätzlich wurde ein multiaxiales Klassifikationssystem auf genetischer Basis in Kombination mit dem Manifestationsalter vorgeschlagen (Williams und Mole 2012). Mit Ausnahme der NCL Typ 2, für die eine kausale und krankheitsmodifizierende Therapie mit Cerliponase alpha existiert, bestehen zur Behandlung der verschiedenen NCL-Subtypen lediglich symptomatische Ansätze (Schulz et al. 2018). Mutationen der Aspartatprotease Cathepsin D wurden als ursächlich für die neuronale Ceroidlipofuszinose Typ 10 identifiziert (Siintola et al. 2006; Steinfeld et al. 2006).

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die verschiedenen Formen der neuronalen Ceroidlipofuszinosen. NCL-Unterform mit jeweils zugehörigem Gen, zugehörigem Genprodukt und lebenszeitlichem Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation.

Typ	Betroffenes Gen	Genprodukt	Manifestationsalter
NCL 1	*PPT1*	Palmitoyl-Protein-Thioesterase	infantil bis adult
NCL 2	*TPP1*	Tripeptidylpeptidase 1	spät-infantil, selten juvenil
NCL 3	*CLN3*	Golgi-lysosomales transmembranöses Protein	juvenil, selten adult
NCL 4	*DNAJC5*	*DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C5*, auch *cystein string*	adult

		protein genannt, Co-Chaperon	
NCL 5 finnische Variante	*CLN5*	Cysteine-basierte S-Depalmitoylase	spät-infantil, selten später
NCL 6	*CLN6*	transmembranes Protein; ER	spät-infantil, adult
NCL 7 türkische Variante	*MFSD8*	Lysosomales Membranprotein MFSD8	spät-infantil, selten später
NCL 8	*CLN8*	transmembranes Protein; ER, ER-Golgi, intermediärer Komplex	spät-infantil, nordische Epilepsie
NCL 10	*CTSD*	Cathepsin D, lysosomale Protease	neonatal bis adult
NCL 11	*GRN*	Progranulin	adult
NCL 12	*ATP13A2*	p-Typ ATPase 13A2	juvenil
NCL 13	*CTSF*	Cathepsin F, lysosomale Protease	adult
NCL 14	*KCTD7*	Kaliumkanalprotein KCTD 7d	infantil

1.2 Cathepsin D-Defizienz als Ursache der NCL Typ 10

1.2.1 Biogenese von Cathepsin D

Cathepsin D ist eine ubiquitär exprimierte Aspartatprotease, die zur Familie der Pepsinproteasen gehört und als prepro-Cathepsin D am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert wird. Nach Entfernung der N-terminalen Presequenz entsteht die Proform des Enzyms (Molekülmasse 53 kDa), die über eine Intermediärform (48 kDa) im endolysosomalen Zellkompartiment in eine aus zwei Polypeptidketten bestehende reife Form (je 33 und 13 kDa) prozessiert wird (Hasilik und Neufeld 1980).

Unter Translokation des entstehenden prepro-Cathepsin D in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wird die 20 Aminosäurereste umfassende Presequenz

entfernt und es entsteht pro-Cathepsin D (Erickson et al. 1981). Bei dem entstehenden pro-Cathepsin D handelt es sich um ein Glykoprotein, das an zwei Asparaginatresten an Position 134 und 263 (Nummerierung nach der Aminosäuresequenz von prepro-Cathepsin) glykosyliert ist. Dabei findet sich je eine Glykosylierungsstelle im Bereich der späteren leichteren N-terminalen bzw. der schwereren C-terminalen Polypeptidkette. Die Oligosaccharidketten werden im ER N-glykosidisch angeknüpft. Eine mindestens einfache Glykosylierung ist für die spätere subzelluläre Sortierung nach intralysosomal notwendig (Fortenberry et al. 1995). Für die sich anschließende Phosphorylierung dieser Mannose-reichen Oligosaccharidseitenketten durch die Phosphotransferase im ER wurde eine minimale Peptiderkennungssequenz, bestehend aus den Aminosäureresten an Position 329-356 und einem Lysinrest an Position 267 identifiziert (Baldwin et al. 1993). Der intrazelluläre Transport in die Lysosomen erfolgt anschließend größtenteils über die Bindung an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren im trans-Golgiapparat und Trennung vom Rezeptor in einem prälysosomalen Kompartiment, wobei zwei unterschiedliche Rezeptortypen beschrieben sind (von Figura und Hasilik 1986). Neben dem Mannose-6-Phosphat-abhängigen Weg wurde, zuerst in einer humanen Leberkrebszelllinie, ein Mannose-6-Phosphat-unabhängiger intrazellulärer Sortiermechanismus identifiziert. Dabei scheint eine transiente Membranassoziation von Cathepsin D für den Transport in die Lysosomen relevant zu sein (Rijnboutt et al. 1991). Auch in bestimmten Brustkrebszelllinien wurde diese Mannose-6-Phosphat-unabhängige Sortierung beobachtet (Capony et al. 1994). Die Membranassoziation scheint bei der Mannose-6-Phosphat unabhängigen Prozessierung durch vorübergehende Komplexbildung von pro-Cathepsin D mit verschiedenen glykosylierten Formen von Saposin zu entstehen (Zhu und Conner 1994). Neben Saposin wurde für Cathepsin D auch für das Protein Sortilin eine Rolle im Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Transport in die Lysosomen beschrieben (Canuel et al. 2008).

Nach Eintritt in das endolysosomale Kompartiment entsteht durch Abtrennung des 44 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Propeptids eine bereits enzymatisch aktive, aus einer Polypeptidkette bestehende Intermediärform des Cathepsin D mit einem Molekulargewicht von 48 kDa (Erickson et al. 1981; Follo et al. 2007; Vidoni et al. 2016). Diese Intermediärform findet sich vorwiegend in Endosomen, während die reife, aus zwei Polypeptidketten bestehende Form von Cathepsin D in Lysosomen zu finden ist (Follo et al. 2007). Die aus einer Polypeptidkette bestehende Intermediärform wird intralysosomal in die reife, aus einer 33 kDa carboxyterminalen und 14 kDa N-terminalen Polypeptidkette bestehende Form umgewandelt (Horst und Hasilik 1991). Diese Umwandlung in die reife Form ist auf die Anwesenheit anderer lysosomaler Proteasen angewiesen (Gieselmann et al. 1985); insbesondere scheinen die Cysteinproteasen Cathepsin H, B und L an diesem Umwandlungsschritt proteolytisch beteiligt zu sein (Samarel et al. 1989; Takahiko et al. 1992; Laurent-Matha et al. 2006). Dabei begünstigt Progranulin die autokatalytische Spaltung von pro-Cathepsin D zu Cathepsin D (Butler et al. 2019). Bei der intralysosomalen Konversion

in die doppelkettige Form werden sieben Aminosäurereste aus einer elf Aminosäurereste umfassenden Sequenz entfernt (Yonezawa et al. 1988).

Während die einkettige Intermediärform von Cathepsin D im pH-Bereich 5,5-6,5 ihr Aktivitätsmaximum hat und in den Endosomen beispielsweise an der partiellen Hydrolyse von Prohormonen beteiligt ist, zeigt die reife Form des Cathepsin D ein pH-Optimum im saureren pH-Bereich (pH 3,5-4,5) und bewirkt eine komplette proteolytische Spaltung von Peptidbindungen bei einer geringen Substratspezifität (Vidoni et al. 2016). Die zwei Fragmente des reifen Cathepsin D werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten; beide enthalten je einen Aspartatrest an den Positionen 97 bzw. 295, die an der Bildung des zwischen den beiden Fragmenten gelegenen aktiven Zentrums des Enzyms beteiligt sind (Baldwin et al. 1993). Proteolytisch spaltet Cathepsin D bevorzugt Peptidbindungen mit flankierenden hydrophoben Aminosäureresten (Scarborough und Dunn 1994).

1.2.2 Bekannte Mutationen des *CTSD*-Gens

Cathepsin D wird durch das *CTSD*-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p.15.5) codiert. Es umfasst neun Exone und ist zwischen 1,75 Mbp und 1,76 Mbp lokalisiert (Redecker et al. 1991).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Mutationen im *CTSD*-Gen identifizieren, die beim Menschen einem NCL-Phänotyp zugrunde liegen. Erstmals wurde eine Cathepsin D-Defizienz als Ursache einer Neurodegeneration im Kindesalter durch Steinfeld et al. beschrieben (Steinfeld et al. 2006). In einem Patientenkollektiv von 25 Säuglingen und Kindern mit einem klinisch vorliegenden NCL-Phänotyp konnte eine compound heterozygote Patientin identifiziert werden, bei der die missense-Mutationen p.F229I bzw. p.W383C im *CTSD*-Gen vorlagen. Die heterologe Expression dieser Mutanten in murinen Cathepsin D-defizienten embryonalen Fibroblasten (MEF), die von *CTSD* -/- Mäusen stammten, zeigte eine deutlich reduzierte Cathepsin D-Aktivität bei korrekter Prozessierung in die reife, intralysosomale Proteinform im Fall der p.F229I-Mutante. Die p.W383C-Mutante wies demgegenüber eine veränderte intrazelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum bei nahezu gänzlichem katalytischen Funktionsverlust auf. Nahezu zeitgleich beschrieben Siintola et al. die homozygote nonsense-Mutation p.Y255X bei einem Patienten pakistanischer Abstammung. In einem heterologen Expressionssystem in BHK-Zellen zeigte sich diese Cathepsin D-Mutante katalytisch inaktiv bei intakter Prozessierung in die reife Proteinform, wohingegen sie sich in vivo instabil zeigte (Siintola et al. 2006). Bei den beschriebenen Mutationen wurden unterschiedliche lebenszeitliche Manifestationsalter der Erkrankung beobachtet. Während einige Patient*innen erst im frühen Schulkindalter Symptome einer Neurodegeneration zeigten (Steinfeld et al. 2006), äußerten sich andere Mutationen in einem bereits kongenital auftretenden Phänotyp (Siintola et al. 2006).

Im Verlauf wurden weitere Mutationen im *CTSD*-Gen, die mit einem NCL-Phänotyp assoziiert sind, identifiziert. So konnte bei einer weiteren Patientin mit kongenitalem Phänotyp die Mutation p.S100F gefunden werden. Bei der zwei Tage nach Geburt verstorbenen Patientin zeigte sich in der Magnetresonanztomographie eine globale zerebrale und zerebelläre Atrophie (Fritchie et al. 2008). Ferner konnte in einer Exom-weiten Sequenzierungsstudie in einer aus konsanguinen Verwandtschaftsverhältnissen stammenden Nachkommenschaft, in der im Jugendalter eine progrediente Ataxie, eine Retinitis pigmentosa, eine sensorische axonale Polyneuropathie sowie zunehmende kognitive Defizite auftraten, die homozygote Mutation p.G149V im *CTSD*-Gen identifiziert werden. Bei Untersuchung eines weiteren Patientenkollektives mit vergleichbarem Symptomkomplex konnte in der gleichen Studie die homozygote Mutation p.R399H bei einem bereits im Kindesalter Betroffenen gefunden werden (Hersheson et al. 2014). Die *CTSD*-Mutation p.F229del konnte bei einer kurz nach der Geburt verstorbenen Patientin mit ausgeprägter Mikrozephalie, korrespondierender Hirnventrikelvergrößerung sowie klinisch insuffizienter Atmung und andauernden epileptischen Anfällen als krankheitsauslösend erfasst werden (Varvagiannis et al. 2018). Bei einem Geschwisterpaar mit ebenso postnatal einsetzender Krankheitssymptomatik konnte das homologe Vorliegen der Mutation c.insC268_269 festgestellt werden (Meyer et al. 2015). Daneben wurden weitere Mutationen mit unmittelbar kongenital einsetzendem Symptomkomplex und sogar erst im fortgeschrittenen Erwachsenenalter eintretender Krankheitsmanifestation berichtet (Doccini et al. 2016; Regensburger et al. 2020; Chartier et al. 2021). Es wurde spekuliert, dass das Restaktivitätsniveau von Cathepsin D möglicherweise mit dem lebenszeitlichen Zeitpunkt des Einsetzens neurologischer Phänotypen korreliert.

Über die identifizierten Mutationen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, und ihre Lokalisation auf dem *CTSD*-Gen gibt Abbildung 1 einen Überblick. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Mutation p.K331del wurde hingegen noch nicht beschrieben.

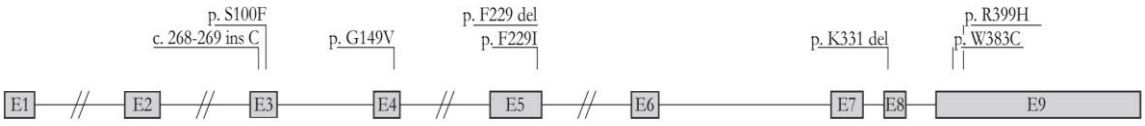


Abbildung 1: Genstruktur des Cathepsin D-Gens. Struktur des Cathepsin D-Gens mit Lokalisation der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutationen. Exons als graue Kästen, Introns als Linien dargestellt.

1.2.3 Tiermodelle der Cathepsin D-Defizienz

Vor der Beobachtung, dass Mutationen im *CTSD*-Gen einem NCL-Phänotyp beim Menschen zugrunde liegen, wurden verschiedene Cathepsin D-defiziente Tiermodelle beschrieben. Bei Schafen konnte eine mit Mikrozephalie, histopathologisch ausgeprägtem Neuronenverlust und der intraneuronalen Akkumulation autofluoreszenten Materials einhergehende Form der Neurodegeneration, die als kongenitale ovine neuronale Ceroidlipofuszinose (CONCL) bezeichnet wurde, auf eine missense-Mutation im ovinen *CTSD*-Gen zurückgeführt werden. Dabei bewirkt die Mutation p.D293N im aktiven Zentrum des ovinen Cathepsin D einen katalytischen Funktionsverlust bei in-vivo-Stabilität (Tyynelä et al. 2000). Fliegen der Art *Drosophila melanogaster* zeigten nach Deletion von über 70% der für das Cathepsin D-Homolog codierenden DNS-Sequenzen Merkmale einer progredienten Neurodegeneration. Die Cathepsin D-defizienten Fliegen zeigten intraneuronal eine über ihre Lebensspanne progrediente Akkumulation von autofluoreszentem Material sowie apoptotische Neurone (Myllykangas et al. 2005). Im Mausmodell zeigten Cathepsin D-defiziente Mäuse eine normale Entwicklung bis zwei Wochen postpartal mit Wachstumsstörung ab der dritten Woche infolge einer beobachteten Atrophie der Darmmukosa. Ferner zeigten sich Thromboembolien und eine Lymphozytendepletion in Thymus und Milz. Dort wurde für Cathepsin D unter anderem eine Rolle in der limitierten Proteolyse noch nicht weiter charakterisierter Proteine mit Effekt auf den Zellzyklus angenommen (Saftig et al. 1995). Ferner wiesen Cathepsin D-defiziente Mäuse einen den humanen NCL ähnlichen Phänotyp mit Erblindung und Entwicklung epileptischer Anfälle ca. vier Wochen postpartal auf. (Koike et al. 2000). Bei Amerikanischen Bulldoggen konnte eine mit einer enzymatischen Cathepsin D-Restaktivität von 36% gegenüber gesunden Kontrolltieren einhergehende p.M199I Mutation nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum beobachteten ovinen Krankheitsverlauf fielen psychomotorische Defizite bei dieser caninen Form milder aus und ähnelten stärker dem humanen Verlauf (Awano et al. 2006).

1.3 Zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration bei Cathepsin D-Defizienz

Die beobachtete Neurodegeneration bei Cathepsin D-Defizienz wird im Tiermodell auf unterschiedliche zelluläre Prozesse zurückgeführt (Shacka und Roth 2007). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die unspezifische Proteolyse bei Cathepsin D-Defizienz unbeeinträchtigt ist (Saftig et al. 1995). Obwohl die Identifikation spezifischer Cathepsin D-Substrate, die bei der Pathogenese der NCL Typ 10 durch intrazelluläre Proteinakkumulation relevant sein könnten, bisher nicht gelungen ist, konnte die Bedeutung von Cathepsin D bei neurodegenerativen Prozessen bestätigt werden. Cathepsin D baut Aggregate und Monomere von α-Synuclein ab, das bei der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung eine entscheidende Rolle spielt. Weiterhin spaltet Cathepsin D Prosaposin in die aktiven Formen

Saposin A-D auf, welche für die Aktivierung verschiedener lysosomaler Sphingolipidasen notwendig sind (Tayebi et al. 2020). Hierbei ist Saposin C an der intralysosomalen Aktivierung der α-Synuclein abbauenden Glucocerebrosidase beteiligt, wodurch wiederum Cathepsin D durch Spaltung von Prosaposin eine redundante Funktion im α-Synucleinabbau zukommt (Tayebi et al. 2020). Auf zellbiologischer Ebene wurden insbesondere Hinweise auf eine Beteiligung von Cathepsin D sowohl an der Apoptose als auch an der zellulären Autophagie identifiziert (Koike et al. 2003; Koike et al. 2005; Shacka et al. 2007).

Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltods dar und ist eine wesentliche Ursache des Verlusts von neuronalem Gewebe bei verschiedenen Subtypen der NCL, insbesondere mit Hinblick auf den Untergang von retinalen Zellen (Mitchison et al. 2004). Auch im murinen Modell der Cathepsin D-Defizienz konnte die vorliegende retinale Atrophie sowohl auf eine Mikroglia-vermittelte Stickstoffmonoxidfreisetzung als auch auf eine Induktion der zellulären Apoptose, ausgedrückt in einer vermehrten Aktivierung Apoptose-relevanter Caspasen, zurückgeführt werden. Dabei zeigte sich für unterschiedliche retinale Zellschichten jeweils eine Dominanz des einen oder des anderen Zelltodmechanismus (Koike et al. 2003). Ebenso fand sich in Cathepsin D-defizienten Fruchtfliegen der Gattung *Drosophila* eine gesteigerte Anzahl an Neuronen, die biochemische Hinweise auf ablaufende Apoptose zeigten. Dabei erwies sich die Bedeutung der Apoptose in der beobachteten Neurodegeneration bei Apoptose-untypischer Zellmorphologie jedoch als uneindeutig (Myllykangas et al. 2005). Zur Evaluation des Beitrages des intrinsischen Signalweges der Apoptose an der bei Cathepsin D-Defizienz vorliegenden Neurodegeneration wurde ein kombiniert Cathepsin D- und Bax-defizientes Mausmodell generiert. Hierbei wurde mit Ausnahme bestimmter hippokampaler Regionen trotz Deletion des für den intrinsischen Apoptoseweg kritischen Mediatorproteins Bax eine Persistenz der Cathepsin D-induzierten Neurodegenration und des Neuronenverlustes beobachtet (Shacka et al. 2007). Gleichzeitig zeigte sich in dem Cathepsin D- und Bax-doppeldefizienten Mausmodell eine deutliche Akkumulation von autofluoreszentem zellulären Einschlussmaterial und Autophagosomen zeitlich noch vor dem Einsetzen der Apoptose (Shacka et al. 2007). Hier ergaben sich somit Hinweise auf einen wesentlichen Beitrag Caspase- und somit Apoptose-unabhängiger Zelltodmechanismen an der durch Cathepsin D-Defizienz ausgelösten Neurodegeneration, unter anderem auf Autophagie.

Aufgrund der Tatsache, dass bei verschiedenen NCL die pathologisch veränderten Proteine im endo-/lysosomalen Stoffwechselweg lokalisiert sind, wurde eine Beteiligung der zellulären Autophagie an deren Pathogenese hypothetisiert (Mitchison et al. 2004; Kyttälä et al. 2006). Die Beobachtung, dass die Behandlung humaner Fibroblasten mit dem Autophagieinhibitor 3-Methyladenin zu einer progredienten histopathologischen Akkumulation von (Ceroid-) Lipofuszin führt, legt ebenso eine mögliche Beteiligung der Autophagie an der Pathogenese der NCL nahe (Stroikin et al. 2004). So konnte eine Beeinträchtigung der zellulären Autophagie auch als möglicher Pathomechanismus der NCL Typ 10 identifiziert werden. Im bereits genannten Cathepsin D-defizienten Mausmodell konnte mit zunehmendem Alter der

Tiere eine deutliche Ansammlung von doppelmembranösen Zellorganellen beobachtet werden, die aufgrund ihrer typischen elektronenmikroskopischen Morphologie als Autophagosomen und Autophagolysosomen betrachtet wurden (Koike et al. 2000). In einem weiteren murinen Modell, in dem sowohl Cathepsin D- als auch Cathepsin B/L-doppeldefiziente Mäuse untersucht wurden, zeigte sich eine erhöhte Konversion eines Markerproteins (LC3) in seine Autophagosomen-gebundene Form in Zellen aller Cathepsin-defizienter Tiere bei gegenüber dem Wildtyp unveränderter Gesamtexpression (Koike et al. 2005). Diese Beobachtung bestätigte sich sowohl für periphere Gewebe als auch für Nervengewebe.

1.4 Autophagie

1.4.1 Formen und biologische Funktionen der Autophagie

Die Autophagie stellt einen evolutionär hochkonservierten zellulären Adaptationsvorgang dar. Es werden drei Formen der Autophagie unterschieden: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie. Allen drei Formen der Autophagie ist die abschließende Degradation zytoplasmatischer Bestandteile in Lysosomen gemein (Glick et al. 2010). Im Fall der Mikroautophagie kommt es zur unmittelbaren Aufnahme zytoplasmatischer Bestandteile durch Invagination der Lysosomenmembran. Im Zuge Chaperon-vermittelter Autophagie führt die zytosolische Erkennung eines KFERQ-Peptidmotivs in zu degradierenden Proteinen durch das Hitzeschockprotein 70 zu deren vermittelter Translokation in die Lysosomen (Cuervo und Wong 2014). Hingegen beschreibt Makroautophagie, im Rahmen dieser Arbeit in der Folge als Autophagie bezeichnet, den Einschluss zytoplasmatischer Bestandteile in von einer Doppelmembran umgebenden Autophagosomen und deren konsekutive Fusion mit Lysosomen.

Autophagie erfüllt verschiedene biologische Funktionen: Während zellulärer metabolischer Stresssituationen, z. B. bei Nährstoffmangel oder in Abwesenheit zellulärer Wachstumsfaktoren, kann Autophagie der Bereitstellung freier Aminosäuren oder Fettsäuren im Rahmen einer Wiederverwertung intrazellulärer Strukturen dienen (Levine und Kroemer 2008). Bestimmte für die zelluläre Autophagie relevante (Atg-)Proteine wurden dabei als Effluxsysteme für freie Aminosäuren aus den Autophagolysosomen nach erfolgter autophagozytotischer Degradation von Proteinen identifiziert (Yang et al. 2006). Auf diese Weise können zur Stressadaptation notwendige Proteine de novo synthetisiert werden oder die intrazelluläre ATP-Produktion durch Einspeisen freier Nährstoffe in den Zitratzyklus aufrecht erhalten werden (Levine und Kroemer 2008). Ferner dient die zelluläre Autophagie auch der Degradation ganzer Zellorganellen, da Autophagie im Gegensatz zu dem anderen wesentlichen intrazellulären Proteindegradationssystem, dem Ubiquitin-Proteasom-System, keinen sterischen Beschränkungen unterliegt (Choi et al. 2013).

Eine wesentliche biologische Funktion von Autophagie liegt darüber hinaus in der intrazellulären Proteinhomöostase. In Mausmodellen, in denen ein Knock-out der Autophagie-relevanten Atg-Proteine 5 und 7 erfolgte, zeigte sich eine ausgeprägte Akkumulation polyubiquitinylierter Proteinaggregate (Mizushima und Klionsky 2007). Ebenso zeigte sich in einem Mausmodell mit einem spezifischen Knock-Out eines an der basalen Autophagie beteiligten Proteins (Atg 7) in Nervengewebe eine ausgeprägte Neurodegeneration. Da auch in diesem Modell polyubiquitinylierte Proteinaggregate akkumulierten, wurde für die zelluläre Autophagie eine wesentliche, Proteasom-unabhängige Rolle in der intrazellulären Proteinhomöostase neuronalen Gewebes nachgewiesen (Komatsu et al. 2006).

1.4.2 Autophagozytotischer Fluss – ein mehrschrittiger Prozess

Die Degradation von zellulären Komponenten durch Autophagie stellt einen mehrschrittigen Prozess dar, der in seiner Gesamtheit als autophagozytotischer Fluss (engl. *autophagic flux*) bezeichnet wird. Auf die Initiationsphase, bei der sich die Autophagosomenmembran bildet, folgt eine Elongationsphase, während der die wachsende Membran unter Einschluss zytoplasmatischer Komponenten expandiert und schließlich ein von einer Doppelmembran umschlossenes Vesikel bildet. Diese Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen unter Bildung von Autophagolysosomen, deren Inhalt proteolytisch abgebaut wird (Mizushima 2007; Glick et al. 2010). Ebenso ist eine Fusion von Autophagosomen mit Endosomen auf prälysosomaler Ebene unter Bildung sogenannter Amphisomen möglich (Gordon und Seglen 1988). An Autophagie beteiligte Proteine werden als Atg-Proteine bezeichnet und wurden erstmals in Hefen identifiziert.

1.4.2.1 Initiationsphase und Nährstoff-abhängige Regulation von Autophagie

Initial beginnt die Autophagosomenbildung in Säugetierzellen an der Isolationsmembran. Dort bildet sich der Ursprung der doppelmembranösen Autophagosomenmembran (Mizushima et al. 2001). Die Zellmembran zur Entstehung der Isolationsmembran stammt von verschiedenen zellulären Kompartimenten, wie dem Golgiapparat, den Mitochondrien, Mitochondrien-assoziierten Membranen und gegebenenfalls auch späten Endosomen (Lamb et al. 2013). Insbesondere für das raue endoplasmatische Retikulum wurde elektronenmikroskopisch eine Verbindung zur Isolationsmembran nachgewiesen (Ylä-Anttila et al. 2009).

In die Initiationsphase fällt die Regulation der nicht-selektiven Autophagie in Abhängigkeit des vorhandenen zellulären Nährstoffangebots, wobei Nährstoffentzug maßgeblich zu einer Hochregulierung der nicht-selektiven Autophagie führt. Entscheidende Funktionen in der Nährstoff-abhängigen Regulation kommen dabei dem ULK1 (*Unc 51-like kinase 1*)- und dem Beclin-PI3KC3 (Phosphatidylinositol 3-Kinase, katalytische Untereinheit 3)-Komplex zu (Wirth et al. 2013). Posttranslatorische Proteininteraktionen bewirken die Nährstoff-abhängige Regulation der Autophagie, wobei insbesondere regulatorische Signale des

mTOR-Komplexes und der AMP (Adenosinmonophosphat)-abhängigen Kinase auf den ULK1-Komplex konvergieren (Hosokawa et al. 2009; Lee et al. 2010; Wirth et al. 2013).

Der Beclin-PI3KC3-Komplex stellt wie der ULK1-Komplex einen ternären Proteinkomplex dar, der für die Autophagosomennukleation essenzielles Phosphatidylinositoltrisphosphat bereitstellt (Wirth et al. 2013). Die Anwesenheit von Phosphatidylinositoltrisphosphat an der Isolationsmembran ist dabei für die Rekrutierung weiterer Atg-Proteine relevant (Choi et al. 2013).

Im Gegensatz zur nicht-selektiven Autophagie erfolgt selektive Autophagie konsekutiv und unabhängig vom Nährstoffangebot der Zelle. Als selektiv wird die Autophagie spezifischer zellulärer Organellen oder zellfremder Organismen, nach dem jeweiligen Organell auch Mitophagie, Lysophagie, Pexiphagie usw. oder im Fall zellfremder Organismen Xenophagie genannt, bezeichnet (Vargas et al. 2023). Hierbei konnte für Mitophagie und Pexiphagie gezeigt werden, dass die Markierung von Mitochondrien und Peroxisomen mit einem selektiven Autophagiemarker zur Rekrutierung des ULK1-Komplexes und Bildung einer Isolationsmembran unabhängig vom zellulären Nährstoffangebot führt (Vargas et al. 2019). Die Markierung spezifischer Organellen zur autophagozytotischen Degradation erfolgt oftmals durch Ubiquitinylierung (Vargas et al. 2023). Spezielle Markerproteine, die unter anderem LC3 an die ubiquitinylierten Organellen rekrutieren können, umfassen unter anderem p62, Optineurin oder NDP52 (Vargas et al. 2023). Der selektiven Autophagie kommt eine spezielle Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen zu. So konnte unter anderem für das Protein PINK1, das die Ubiquitinylierung äußerer mitochondrialer Membranproteine geschädigter Mitochondrien katalysiert, eine Rolle in der hereditären Form der Parkinson-Erkrankung nachgewiesen werden (Lizama und Chu 2021).

1.4.2.2 Elongationsphase – Membranassoziation von LC3

Während der Elongationsphase expandiert die Autophagosomemembran und formt unter Krümmung sphärische Autophagosomen (Mizushima et al. 2001). Die Elongation der Autophagosomenmembran ist auf zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme angewiesen, das Atg5-Atg12-Atg16L- und das LC3 I/II-System (Mizushima et al. 2011; Choi et al. 2013). Dabei ist der Atg5-Atg12-Atg16-Komplex vorrangig auf der Außenseite entstehender Autophagosomen vorzufinden, während LC3 II außen- und innenseitig in die Membran integriert (Mizushima et al. 2001)

Atg5-Atg12-Atg16L nimmt eine molekulare Gerüstfunktion bei der Entstehung der Autophagosomenmembran wahr (Kaufmann et al. 2014). Eine entscheidende Rolle kommt dem Komplex in der Konjugation von LC3 mit Phosphatidylethanolamin (Hanada et al. 2007) und der Direktion von LC3 an die entstehende Autophagosomenmembran zu. Dabei bestimmt Atg5-Atg12-Atg16L den Ort der Konjugation von Phosphatidylethanolamin an LC3 (Fujita et al. 2008).

Bei LC3 handelt es sich um die zuletzt charakterisierte Untereinheit der Mikrotubuli-assoziierten Proteine 1A und 1B (Mann und Hammarback 1994). Intrazellulär existiert das Protein in zwei Formen, LC3-I und LC3-II. Nach seiner Synthese wird LC3 durch Atg 4 zu LC3-I prozessiert (Mizushima et al. 2010). LC3-I wird in weiteren, Atg-Protein-abhängigen Reaktionen mit Phosphatidylethanolamin zu LC3-II konjugiert (Tanida et al. 2004). Dabei ist LC3-I zytoplasmatisch lokalisiert und LC3-II stellt die Autophagosomenmembran-assoziierte Form dar (Kabeya et al. 2000).

1.4.2.3 Fusion mit Lysosomen

Nach Abschluss der Elongationsphase unter Bildung eines sphärischen Autophagosoms erfolgt anschließend die Autophagosomenreifung sowie die Fusion mit Endosomen bzw. Lysosomen (Glick et al. 2010). Dabei wurde gezeigt, dass eine Fusion von Autophagosomen mit Endosomen zu einer Reifung der Autophagosomen führt, indem lysosomale Membranproteine bereitgestellt werden (Eskelinen 2005). Diese übernehmen Funktionen bei der darauffolgenden Fusion mit Lysosomen sowie bei der zunehmenden Azidifikation der aus der Fusion von Autophagosomen und Endosomen entstandenen Amphisomen (Dunn 1990). Bei der weiteren Reifung der Autophagosomen spielen verschiedene Proteine, unter anderem Rab7 (Jäger et al. 2004) und Präsenilin 1 (Eskelinen 2005), eine Rolle. Autophagolysosomen entstehen in der Folge unter Fusion der späten Autophagosomen mit Lysosomen. Dabei wird die innere Membran der Autophagosomen sowie deren Inhalt durch lysosomale Proteasen im sauren pH-Milieu abgebaut (Mizushima 2007). Ein intaktes Zytoskelett ist für diesen Fusionsschritt erforderlich (Eskelinen 2005).

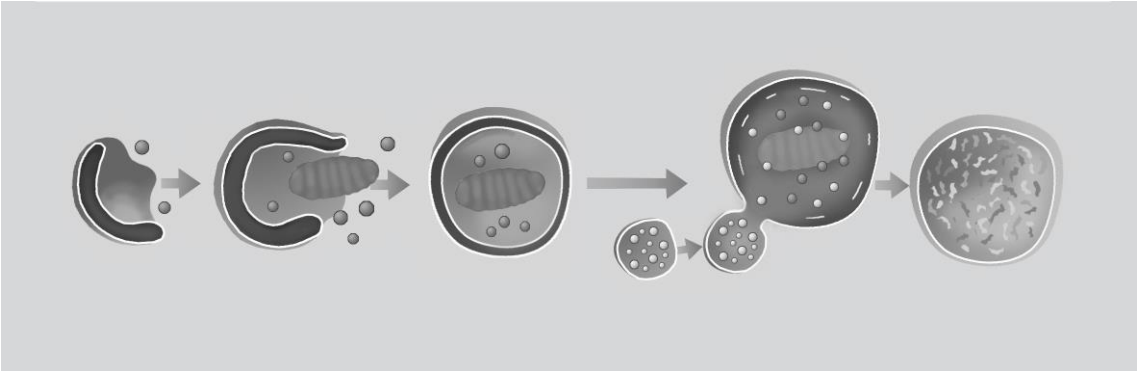


Abbildung 2: Schematischer Ablauf des autophagozytotischen Flusses als Mehrschrittprozess (in Anlehnung an Choi et al. 2013). Zellmembranen als weiße Linien, Mitochondrien und Lipidtröpfchen (beispielhafte Autophagiesubstrate) als hellgraue Strukturen und lysosomale Enzyme als weiße Strukturen dargestellt. Beginn des autophagozytotischen Flusses unter Bildung der Isolationsmembran als Ursprung entstehender Autophagosomen (linker Abbildungsrand), anschließender Einschluss potenzieller Autophagiesubstrate und Bildung eines reifen, von einer Doppelmembran umgebenen Autophagosoms (Abbildungsmitte). Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom unter Degradation der inneren Zellmembran, ab hier Vesikel als

Autophagolysosom bezeichnet. Degradation des Autophagolysosomeninhalts durch lysosomale Proteasen im sauren, intravesikulären pH-Milieu.

1.5 Autophagiedefekte und Neurodegeneration

Eine besondere Vulnerabilität von Neuronen gegenüber eines beeinträchtigten autophagozytotischen Flusses (engl. *autophagic flux*) ergibt sich aus ihrem postmitotischen Zustand, der eine Reduktion intrazellulär akkumulierenden Proteins durch Zellteilung ausschließt. Deshalb sind sie nach Vidoni et al. in besonderer Weise von der korrekten Funktion intrazellulärer proteolytischer Systeme, wie dem Ubiquitin/Proteasom-System oder der zellulären Autophagie, abhängig (Vidoni et al. 2016). Eine pathophysiologische Bedeutung der Autophagie wurde neben der Gruppe der NCL bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen, unter anderem der Demenz vom Alzheimer-Typ, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und bei der Amyotrophen Lateralsklerose (Cuervo und Wong 2014).

Beispielsweise konnte im Fall der Chorea Huntington u. a. ein Defekt in der Initiationsphase des autophagozytotischen Flusses identifiziert werden. Für im Rahmen dieser Erkrankung akkumulierendes, polyglutaminiertes Huntingtin wurde die Fähigkeit, Beclin 1 zu rekrutieren, beschrieben, was zu verminderter Autophagieinduktion führte (Shibata et al. 2006). Im Fall anderer neurologischer Erkrankungen wurden Defekte im späteren Verlauf des autophagozytotischen Flusses identifiziert. So konnte für die Niemann-Pick-Erkrankung Typ C1 eine beeinträchtigte Fusion später Endosomen mit Autophagosomen, basierend auf einem krankheitsspezifischen Defekt in der Rekrutierung mehrerer fusionsrelevanter SNARE-Proteine auf die Endosomenmembran, entdeckt werden (Sarkar et al. 2013). Auch für zwei weitere lysosomale Speichererkrankungen, die Mukopolysaccharidose Typ III und die Multiple Sulfatase Defizienz, wurde eine beeinträchtigte Autophagosomen-Lysosomen-Fusion beschrieben, die mit einer Akkumulation defekter Zellorganellen einherging (Settembre et al. 2008).

Exemplarisch zeigen die genannten Erkrankungen, dass Autophagiedefekte an sehr unterschiedlichen Stellen im Ablauf des autophagozytotischen Flusses liegen können (Cuervo und Wong 2014). Für die NCL Typ 10 liegt dabei ein Defekt in der Degradationsphase der Autophagolysosomen nahe, da mit Cathepsin D eine wesentliche intralysosomale Protease aktivitätsgemindert bzw. gänzlich ohne katalytische Aktivität ist. Dies könnte den Abbau von Autophagolysosomeninhalt maßgeblich beeinträchtigen.

1.6 Messung des autophagozytotischen Flusses

Die Quantifizierung des Autophagieprozesses steht vor der Problematik, einen dynamischen intrazellulären Prozess mit statischen Messmethoden zu erfassen (Mizushima et al. 2010). So können sowohl zelluläre Zustände, die mit einer Steigerung der Autophagosomenbildung,

als auch Zustände, die mit einem verringerten intralysosomalen Abbau einhergehen, zu einer Akkumulation von Autophagosomen führen (Rubinsztein et al. 2009; Mizushima et al. 2010). Darüber hinaus stellt Autophagie einen konstitutiv aktiven zellulären Prozess dar, weshalb unterschiedliche basale Aktivitätsraten bereits Unterschiede in experimentell gemessenen Autophagosomen- oder Autophagolysosomenzahlen bedingen können. Insbesondere die selektive, vom zellulären Nährstoffangebot unabhängige Autophagie stellt hierbei einen dauerhaft aktiven zellulären Prozess dar (Lamark und Johansen 2021; Vargas et al. 2023). In welcher Phase des autophagozytotischen Flusses ein etwaiger Defekt liegt, kann nicht in jedem Fall methodisch sicher beurteilt werden. Aus diesem Grund sind zellbiologische und biochemische Methoden, die den autophagozytotischen Fluss im Gesamten beurteilen, Methoden, die nur eine zeitliche Momentaufnahme erfassen können, überlegen (Mizushima et al. 2010)

Insbesondere LC3 stellt ein geeignetes Protein zur Untersuchung des Autophagieflusses von der Autophagosomenbildung bis zur Fusion mit Lysosomen dar, da es während des gesamten Prozesses membranassoziiert bleibt (Mizushima et al. 2011).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung einer bisher unbekannten Cathepsin D-Mutation (p.K331del) mithilfe zellbiologischer Methoden. Dabei sollen die Auswirkungen dieser bisher unveröffentlichten Mutation auf die Prozessierung von Cathepsin D auf Proteinebene, die subzelluläre Lokalisation der Mutante und die Auswirkungen der Mutation auf die katalytische Aktivität von Cathepsin D im Vergleich zum Wildtypprotein untersucht werden. Die Charakterisierung der Mutante soll in einem heterologen Expressionssystem erfolgen, wobei Cathepsin D-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) mit einem entsprechenden, für die Mutante codierenden Plasmid stabil transfiziert werden sollen.

Ferner sollen die Auswirkung dieser und weiterer, bereits charakterisierter Cathepsin D-Mutationen auf die zelluläre Autophagie im gleichen heterologen Expressionsmodell in MEF untersucht werden. Zu diesem Zweck soll eine zur Untersuchung des zellulären autophagozytotischen Flusses geeignete, zellbiologische Methode in den stabil transfizierten MEF etabliert werden. Dabei eignet sich zur Abbildung des gesamten autophagozytotischen Flusses insbesondere die Markierung von LC3 mit einem doppelten Fluoreszenzsignal (mCherry-GFP) durch lentivirale Transduktion. Die Auswirkungen der verschiedenen Cathepsin D-Mutationen auf die zelluläre Autophagie sollen unter Autophagieinduktion durch Nährstoffentzug und im Vergleich mit dem Cathepsin D-Wildtyp untersucht werden. Dabei ist von besonderem Interesse, ob die untersuchten Cathepsin D-Mutationen vorrangig die autophagolysosomale Degradation beeinflussen. Aufgrund der Aktivität von Cathepsin D als lysosomale Aspartatprotease erscheint eine Beeinflussung dieser im Ablauf nach der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen liegenden Phase der Autophagie naheliegend. Erkenntnisse zu den Auswirkungen verschiedener Cathepsin D-Mutationen auf den

autophagozytotischen Fluss könnten das Verständnis der Pathogenese der NCL Typ 10 vertiefen und zur Identifikation neuer therapeutischer Strategien führen.

Es stellen sich insbesondere folgende Fragen:

(I) Wie beeinflusst die bisher unveröffentlichte Mutation die Biogenese, die subzelluläre Lokalisation und die katalytische Aktivität von Cathepsin D?

(II) Wie wirken sich diese und weitere, bereits charakterisierte Mutationen auf die zelluläre Autophagie aus? Beeinflussen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cathepsin D-Mutationen bei heterologer Expression in MEF insbesondere die autophagolysosomale Degradationsphase der zellulären Autophagie?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Geräte mit jeweiliger Herstellerangabe.

Agarosegelelektrophoresekammer für Western Blots	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
Autoklav	Tecnomara, Fernwald, Schweiz
Bunsenbrenner	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophoresekammer für DNS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Feinwaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1	Carl Zeiss, Oberkochen
Heizblock TB2 Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Memmert, Schwabach
Inkubator für Zellkulturen Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschränke	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laminiergerät	Severin, Münster
Luminescent Image Analyser LAS 4000	Fuji Film, Tokyo, Japan
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Mikroliterzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Mikroliterzentrifuge, kühlfähig Mikro 200	Hettich, Tuttlingen
Mikroskop Eclipse TS 100, inverses Objektiv	Nikon, Chiyoda/Tokyo, Japan

Mikrowelle	Panasonic, Kadoma, Japan
Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer	Nanodrop, Wilmington, Delaware, USA
PCR-Block Thermocycler T3	Biometra, Jena
pH-Meter CG 820	Schott, Mainz
Photometer Synergy Mx	Bio Tek, Bad Friedrichshall
Pipettierhilfe Pipet Boy 2	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Scanner	Fuji Film, Tokyo, Japan
Schüttelinkubator	Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Schwenktisch Rocking Platform	Biometra, Jena
Schwenktisch, rotierend	Eigenanfertigung des Labors
Sequenziergerät ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	Applera Corporation, Norwalk, Connecticut, USA
Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Biometra, Jena
Tieftemperaturkühlschrank Forma Scientific	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge (mini)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Transferkammer für Western Blotting Fastblot	Biometra, Jena
Ultraschallbad Sonorex	Sigma-Aldrich, München
UV-Gerät mit Kamera (Bio Doc Analyzer)	Biometra, Jena
Vortexmischgerät	Heidolph, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen

Wasserbad, schüttelbar 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zellkulturbank HeraSafe HSPC	Heraeus, Hanau
Zentrifuge GPR	Beckmann, Krefeld

Tabelle 3: Materialien mit jeweiliger Herstellerangabe

Bakterienkolben, steril	Duran/Schott, Mainz
Blotting-Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Deckgläschen (Durchmesser 12 mm)	Duran/Schott, Mainz
Erlenmeyerkolben	Duran/Schott, Mainz
Fluoreszenzfilzstift Glow Writer	Diversified Biotech, Dedham, Massachusetts, USA
Glasplatten für SDS-PAGE	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
Kryobehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen, *wells*)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mehrfachpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroreaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Nitrozellulosemembran	Amersham, München
Parafilm	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich, Mainz
Pinzette, stumpf	Roth, Karlsruhe
Pinzette, spitz	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Klarsichtbeutel	dm, Karlsruhe
Objektträger	Heinz Herenz, Hamburg
Platzhalter für SDS-PAGE	Biorad, Hercules, Kalifornien, USA

Polyethersulfonfilter, Porengröße 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
Scheren	diverse Hersteller
Schwimmständer für Verschlussröhrchen	Eigenkonstruktion
Selektionsring	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Skalpell, steril	Feather, Osaka, Japan
Standkolben (100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Duran/Schott, Mainz
Verschlussröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zählkammer (Neubauer)	Karl Hecht GmbH, Sondheim vor der Rhön
Zellkulturflaschen (25 cm^2, 75 cm^2 Standfläche)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (mit 6, 12 und 24 Vertiefungen, *wells*)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturpetrischalen (10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Corning, New York, USA

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien mit jeweiliger Herstellerangabe

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Agar-Agar/Agar (Select Agar)	Bioline, Luckenwalde
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat	Interchim, Montluçon, Frankreich
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na_2HPO_4 x $2H_2O$)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
DNS-Fragmentstandard GeneRuler 1kb	Fermenta, Sankt Leon-Rot
Ethanol (100%, 70% v/v)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Reiss, Mainz
Fetales Kälberserum(FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Ficoll-400	Sigma-Aldrich, München
Formamid	Reiss, Mainz
GelRed	Biotium, Hayward, Kalifornien, USA
Glucose, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Pasching, Österreich
Glycerin	Thomas Geyer, Renningen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Hexadimethrinbromid (Polybrene)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Lumi-Light Blotting Substrat	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma-Aldrich, München
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Steiner, Siegen
Milchpulver, Blotting Grade	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat ($NaCH_3COO$)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
dNTPs	Roth, Karlsruhe

Octoxinol-9 (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
Orange G	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA), 4%	MP Biomedicals, Eschwege
Phosphat-gepufferte Salzlösung, steril	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10 mg/ml)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Ponceau (S)-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenglycol 6000 (50%)	Merck, Darmstadt
Poly-(L)-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Polysorbat-20 (Tween-20)	Sigma-Aldrich, München
Prolong Antifade Gold mit DAPI	Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Proteinstandard Page Ruler (für SDS-PAGE, 10-180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
2-Propanol	Roth, Karslruhe
Puromycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNAse A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rotiphoresegel, 30% (Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Silikonpaste	Sigma-Aldrich, München
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Österreich
Trypton ohne Pepton	Roth, Karlsruhe
steriles, pyrogenfreies Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
destilliertes Wasser (H_2O)	eigene Bereitstellung im Labor
Zeocin (Phleomycin D1, 100 mg/ml)	Invivogen, Toulouse, Frankreich

Tabelle 5: Pufferlösungen und Medien mit jeweiliger Zusammensetzung

Agarosegel (1%)	TAE-Puffer, 1% Agarose (w/v), 0,7 µl/100 µl GelRed
Blockierpuffer (5% bzw. 1%)	PBS-T (0,1%), 5% bzw. 1% Milchpulver (w/v)
Calciumchloridlösung	$CaCl_2$ (2 M)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), hoher Glucosegehalt (4500 mg/l)	kommerziell erhältlich, Gibco/Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Earle-Salze, *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS)	kommerziell erhältlich, Gibco/Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Laemmli-Puffer (4x, reduzierend)	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4% SDS, 40% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 10% 2-Mercaptoethanol
LB (*lysogeny broth*) -Medium	5 g Trypton ohne Pepton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 500 ml H_2O
Ladepuffer DNS, 6x	0,4 g EDTA, 15 g Ficoll-400, 10 ml Glycerin, Spatelspitze Orange G
Lösung 1	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8)
Lösung 2	0,2 N NaOH, 1 % (v/v) SDS
Lösung 3	3 M $NaCH_3COO$, pH 4,8
Milder Strippingpuffer, *mild stripping buffer*	1,5 g Glycin/HCl, 0,1 g SDS, 1 ml Tween-20, auf 100 ml H_2O, pH 2,2
Natriumchloridlösung	NaCl (4 M)
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 2 g KH_2PO_4 auf 1 l H_2O, pH 7,4
PBS-T (0,1%)	PBS (1x), 0,1% Tween-20
Präzipitationspuffer (2x)	50 mM HEPES (pH 7,05), 1,5 mM Na_2HPO_4, 10 mM KCl, 280 mM NaCl, 12 mM Glucose, steril filtriert
Puffer NEB 2.1 (1x, kommerziell erhältlich)	50 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 10 mM $MgCl_2$, 100 µg/µl BSA, pH 7,9 bei 25°C

Puffer NEB 3.1 (1x, kommerziell erhältlich)	100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 10 mM $MgCl_2$, 100 µg/µl BSA, pH 7,9 bei 25°C
Sammelgel, 5,1% (für SDS-PAGE, ein Gel)	0,68 ml H_2O, 0,17 ml 30% Rotiphoresegel, 0,13 ml 1 M TrisCl/SDS (4x pH 6,8), 0,01 ml 10% SDS, 0,01 ml 10% APS, 0,001 ml TEMED
Trisacetat EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris/HCl, 20 mM $NaCH_3COO$, 1 mM EDTA, pH 7,0
Trenngel, 12% (für SDS-PAGE, ein Gel)	1,6 ml H_2O, 2 ml 30% Rotiphoresegel, 1,3 ml 1,5 M TrisCl/SDS (4x pH 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% APS, 0,002 ml TEMED
Transferpuffer (für Western-Blotting)	3 g Tris-Base, 12 g Glycerin, 200 ml Methanol, 800 ml H_2O
T4-DNS-Ligasepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 6: Kits mit jeweiliger Herstellerangabe

ABI PRISM BigDye Sequenzierkit	Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA
BCA-Assay Reagent Kit	Sigma-Aldrich, München
Effectene Reagent Kit zur Lipofektation	Qiagen, Hilden
Kapa Hifi PCR Set	Roche, Basel, Schweiz
Nucleobond Xtra Plasmid Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR Clean up/Gel extraction Kit	Macherey-Nagel, Düren

2.2 Verwandte Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 7: Cathepsin D - Mutageneseprimer

Primer	Sequenz 5'→3'	Anlagerungs-temperatur
p.G149V *forward*	CGGGCAGCCTCTCCGTGTACCTGAGCCAGGAC	55°C
p.G149V *reverse*	GTCCTGGCTCAGGTACACGGAGAGGCTGCCCG	55°C
p.R399H *forward*	GTTTGACCGTGACAACAACAAGGTGGGCTTGG CCGAGGC	55°C
p.R399H *reverse*	GCCTCGGCGAAGCCCACCTTGTTGTTGTCACG GTCACGGTCAAAC	55°C
p.S100F *forward*	CGTCTTCGACACGGGCTTCTCCAACCTGTGGG TCC	55°C
p.S100F *reverse*	GGACCCACAGGTTGGAGAAGCCCGTGTCGAA GACG	55°C

Tabelle 8: Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz 5'→3'	Anlagerungs-temperatur
forward	CCAAGCAGCCAGGCATCAC	62°C
reverse	GTCTGTGCCACCCAGCATC	62°C

2.3 Verwandte Plasmide

Tabelle 9: Plasmide mit jeweiliger Funktion und Herkunft

Konstrukt	Funktion	Herkunft
pEF3-zeo	ortsgerichtete Mutagenese von Cathepsin D, Amplifikation in	im Labor Pädiatrie II vorhanden

	E. coli, Transfektion von MEF, Ampicillin- und Zeocinresistenz	
pLVX	lentiviraler Transfervektor mit CMV-Promotor und Puromycin-Resistenzgen	Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA
psPAX	*gag* und *pol*-Gen tragendes Plasmid zur Expression lentiviraler Enzyme und Hüllproteine	Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA
pMD2.G	VSV-G exprimierendes Plasmid zur lentiviralen Pseudotypisierung	Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA

2.4 Enzyme

Tabelle 10: Enzyme mit jeweiliger Funktion und Herstellerangabe

Enzym	Funktion	Hersteller
*Dpn*I	Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz GATC	Jena Biosciences, Jena
*Eco*RI	Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz GAATCC	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
*Not*I	Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz GCGGCCGC	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
*Pvu*I	Restriktionsendonuklease, Erkennungssequenz CGATCG	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
Trypsin	Serinprotease zur Lösung von adhärenten Zellen	PAA, Pasching, Österreich
T4-DNS-Ligase	Phosphodiesterbildung zwischen freien 3´OH- und 5´PO_4-Enden von DNS-Fragmenten	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

2.5 Antikörper

Tabelle 11: Antikörper mit jeweiliger Speziesherkunft, Herstellerangabe und Anwendung

Antikörper	Spezies, Eigenschaften	Hersteller, Bezeichnung	Anwendung, Verdünnung
anti-β Actin	Maus, monoklonaler IgG Antikörper	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA	Western Blot 1:4000
anti-Cathepsin D	Kaninchen, monoklonaler IgG Antikörper	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, abc75852	Immunfluoreszenz 1:250
anti-Cathepsin D	Kaninchen, polyklonaler IgG Antikörper	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA NEB2284S	
anti-Cathepsin D	Maus, polyklonaler IgG Antikörper	Becton, Dickinson and Company (BD), East Rutherford, New Jersey, USA BD610800	Western Blot 1:4000
anti-Cathepsin D	Ziege	im Labor Pädiatrie II vorhanden	Western Blot 1:4000
anti-LAMP I (CD107a)	Ratte, monoklonaler IgG Antikörper	Becton, Dickinson and Company (BD), East Rutherford, New Jersey, USA BD553792	Immunfluoreszenz 1:200
anti-LC3	Kaninchen, polyklonaler IgG Antikörper	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA L8918	Western Blot 1:4000
anti-IgG gegen Kaninchen	Ziege, polyklonaler IgG Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania, USA 111-035-003	Sekundärantikörper für Western Blot, 1:10.000
anti-IgG gegen Kaninchen	Ziege, polyklonaler IgG Antikörper, Alexa 488 konjugiert	Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA A11034	Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz, 1:2000

anti-IgG gegen Maus	Esel, polyklonaler IgG Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania, USA 715-035-150	Sekundärantikörper für Western Blot, 1:10.000
anti-IgG gegen Ratte	Ziege, polyklonaler IgG Antikörper, Alexa 546 konjugiert	Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA A11081	Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz, 1:2000
anti-IgG gegen Ziege	Maus, polyklonaler IgG Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	Jackson Immunoresearch, West Grove, Pennsylvania, USA AB 2339057	Sekundärantikörper für Western Blot, 1:10.000

2.6 Zelllinien

Tabelle 12: Eingesetzte Zelllinien mit Bezeichnung und Herkunft

eukaryontisch	
HEK 293	humane Nierenepithelzellen
Cathepsin D-defiziente MEF	murine embryonale Fibroblasten
bakteriell	
kompetente *E. coli* (Top Ten)	Vermehrung von Plasmid-DNS
kompetente *E. coli* (Bio Blue)	Vermehrung von Plasmid-DNS

2.7 Verwandte Software

Tabelle 13: Software mit jeweiliger Herstellerangabe

Axio Vision 4.8 Software	Carl Zeiss, Oberkochen
Bio Doc Analyzer 2.0 Software	Biometra, Jena
Excel 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA
LAS 4000 Analyzer	GE/Image Quant, Boston, Massachusetts, USA

SeqMan Pro	DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA
Word 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA

2.8 Mutationen im *CTSD*-Gen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutationen handelte es sich sowohl um vorbeschriebene als auch um eine neue, bisher noch nicht bekannte Mutation. Diese Mutation (p.K331del) wurde während der laufenden Tätigkeit des Labors Pädiatrie II durch Sequenzierungsuntersuchungen identifiziert.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Plasmide

Der Expressionsvektor pEF3-zeo (7,2 kbp) wurde an seiner multiplen Klonierungsstelle mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I geschnitten und cDNS von Cathepsin D (Wildtyp und Mutationen p.G149V, p.R399H, p.S100F, c.268_269 insC, p.F229del, p.K331del) per Ligation eingefügt. Das Plasmid verfügte über ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion transformierter, kompetenter *E. coli* und ein Zeocinresistenzgen zur späteren Selektion transfizierter muriner embryonaler Fibroblasten (MEF). Es lag im Labor Pädiatrie II bereits vor.

2.9.2 Ortsgerichtete Mutagenese-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur gezielten Mutation einzelner Basentripletts diente eine ortsgerichtete Mutagenese-PCR. cDNS von Cathepsin D lag im zirkulären Expressionsvektor pEF3-zeo bereits vor. Zur gezielten Mutagenese diente nun eine PCR-Reaktion, bei der die eingesetzten Primer neben flankierenden, exakt zur Matrize komplementären Basenpaaren zentral das entsprechend mutierte Basentriplett aufwiesen. Dabei ermöglichten die flankierenden Basenpaare die Anlagerung an die DNS, während das mutierte Triplett zur Amplifikation der gewünschten Mutation führte. Aufgrund der Zirkularität des Vektors wurde dieser nun von nur einem Ursprung ausgehend unter Einfügung der Mutation im Primerbindebereich komplett amplifiziert. Es diente folgendes Pipettierschema:

Tabelle 14: Pipettierschema für den Ansatz der ortsgerichteten Mutagenese-PCR

Ausgangs-DNS (cDNS von Cathepsin D in pEF3-zeo, Wildtyp)	Puffer (Kapa, 5x)	dNTP	$MgCl_2$	jeweilige Mutagenese-Primer	DNS-Polymerase Kapa HiFi	H_2O
2,5 ng	2,5 µl	0,4 µl	0,7 µl	0,75 µl	0,25 µl	auf 12,5 µl

Die Ansätze wurden zunächst mit nur je einem Primer eines komplementären Primerpaares angesetzt. Es erfolgten drei Reaktionszyklen im PCR-Block nach nachstehendem Schema, bevor die Einzelansätze nach kurzem Zentrifugieren zu einem gemeinsamen Reaktionsansatz zusammengeführt wurden. Es erfolgte die weitere Zugabe von 0,8 µl dNTP und 0,5 µl Kapa HiFi DNS-Polymerase (im Kapa Hifi PCR-Kit enthalten) zum zusammengeführten Ansatz. Anschließend wurde der Reaktionszyklus insgesamt 30-fach unter Auslassung der initialen Denaturierung durchlaufen.

Tabelle 15: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese-PCR

Funktion	Temperatur und Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C für 1 Minute	1x
Denaturierung	95°C für 50 Sekunden	30x
Anlagerung der Primer	55°C für 50 Sekunden	30x
Polymerisation	68°C für 8 Sekunden	30x
finale Polymerisation	68°C für 7 Minuten	1x

Nach Abschluss der Mutagenese-PCR wurden die Ansätze für 2h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Dpn*I verdaut, das die Sequenz GATC schneidet, sofern es sich um methyliertes Adenosin handelt. Die ursprüngliche Plasmid-DNS wurde auf diese Weise aus dem Ansatz entfernt; amplifizierte und somit mutierte DNS blieb hingegen erhalten.

2.9.3 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation kompetenter Bakterien diente der Vervielfältigung von Plasmid-DNS, sowohl nach Durchführung einer Mutagenese-PCR als auch zur Herstellung für Transfektionen ausreichender DNS-Quantitäten.

Dazu wurden 35 µl kompetente *E. coli* (Top Ten) auf Eis aufgetaut und für 30 min mit 50-80 ng Plasmid-DNS auf Eis inkubiert. Per Hitzeschock wurde nun die Aufnahme der Plasmid-DNS aus dem Medium in die Bakterien (sog. Kompetenz) ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden die Transformationsansätze für 50 sec einer Temperatur von 42°C im Heizblock ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. In der Folge wurden im Sterilfeld einer Bunsenbrennerflamme 500 µl *lysogenity broth* (LB)-Medium hinzugefügt und die Ansätze unter Schütteln bei 500 rpm und 37°C für 1 h inkubiert. Bevor die Bakterien anschließend auf geeigneten Agarnährböden ausplattiert wurden, erfolgt eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min bei Raumtemperatur. Bei den Agarplatten handelte es sich um Selektivnährböden, die mit einem Antibiotikum versetzt wurden, das in Abhängigkeit der Resistenzgene auf der transformierten Plasmid-DNS gewählt wurde. Bei der Herstellung der Agarplatten (1,5 % w/v Agar-Agar in LB-Medium) zur Selektion von mit pEF3-zeo transformierten Bakterien wurde folglich 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Auf die ampicillinhaltigen Agarnährböden wurden nun 100 µl Bakteriensuspension im Sterilfeld des Bunsenbrenners ausplattiert, die durch vorsichtige Resuspension des Bakterienpellets im diesem Volumen LB-Medium erstellt wurde. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kompetente *E. coli* (Top Ten) Bakterien wurden auch mit Plasmid-DNS zum Erhalt größerer DNS-Mengen transformiert, die bereits das mutierte *CTSD* als Insert enthielt. Hierbei wurden geringere Plasmid-DNS Mengen von ca. 40-50 ng eingesetzt und nach Transformation und Ansetzen einer Übernachtvorkultur die Plasmid-DNS mit dem NucleoSpin Plasmid Kit nach Herstellerangaben präpariert.

Mit den über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien wurden am Folgetag Minikulturen beimpft. Eine Bakterienkultur wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze aus dem Agar gehoben und in 3 ml LB-Medium (unter Zusatz von 3 µl Ampicillin) in einem sterilen Kolben überführt. Nach Suspension der Bakterien erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator.

2.9.4 Minipräparation von Plasmid-DNS aus bakterieller Übernachtkultur

Die Minipräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim (1983) zur Gewinnung kleiner DNS-Mengen. Diese konnten im Anschluss zur Sequenzierung als Ergebniskontrolle nach Mutagenese-PCR oder in einem Restriktionsverdau zur Überprüfung der Intaktheit des Plasmids eingesetzt werden.

Zur Minipräparation wurden 1,5 ml der Übernachtkultur abgenommen und in einem Mikroreaktionsgefäß für 1 min bei 11.000 g zentrifugiert. Der Überstand über dem erhaltenen Bakterienpellet wurde verworfen und dieses in 200 µl Lösung 1 mit RNAse A (1:100) suspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 fand unter vorsichtigem Invertieren der Reagenzgefäße die Lyse der Bakterien statt, wobei sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNS im alkalischen Lösungsmilieu denaturierten. Zur Wiederherstellung eines

neutralen pH wurden 300 µl Lösung 3 hinzugefügt, wodurch lediglich Plasmid-DNS aufgrund ihrer zur chromosomalen DNS unterschiedlichen Konformität renaturieren konnte. Somit konnten nach einer Inkubation auf Eis für 3 min die denaturierte chromosomale DNS und Zelldetritus abzentrifugiert werden (10 min bei 11.000 g) und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNS zur Ausfällung in ein neues Reagenzgefäß überführt werden. Zur Ausfällung diente reines 2-Propanol; es wurde 490 µl zur Plasmid-DNS im Überstand hinzugefügt, kurz gevortext, bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert und im Anschluss für 10 min bei 11.000 g zentrifugiert. Das sedimentierte Plasmid-DNS-Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes zur Entfernung von Salzen in 500 µl Ethanol (70% v/v) durch Mischen im Vortex-Mixer gewaschen, worauf ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte (2 min bei 11 000 x g). Die Pellets wurden bei 37°C im Heizblock bis zum restlosen Verdampfen des verbliebenen Ethanols getrocknet und anschließend in 50 µl H_2O eluiert.

2.9.5 Sequenzierung von Plasmid-DNS

Zur Erfolgskontrolle der Mutagenese-PCR erfolgte eine Sequenzierung relevanter Bereiche des Inserts in pEF3-zeo. Zu diesem Zweck diente das modifizierte Kettenabbruchverfahren nach Sanger unter Verwendung des ABI PRISM BigDye Kits. Das Sequenzierungsverfahren nach Sanger stellt eine Anwendung der Polymerasekettenreaktion mit fluoreszierenden ddNTPs dar. Während der Elongationsphase bricht die DNS-Polymerase nach Einbau eines ddNTPs die Synthese des Tochterstranges der DNS ab, wodurch nach einer ausreichenden Zyklenzahl unterschiedlich lange Tochterstrangfragmente vorhanden sind. Es liegen dann Fragmente vor, die aus einer Synthese bis zu jedem Nukleotid der zu sequenzierenden DNS entstanden sind und endständig (3´) ein fluoreszierendes ddNTP tragen. Durch Ordnung nach Fragmentlänge und Registrierung der fluoreszenten Signale kann auf die Nukleotidfolge der zu sequenzierenden DNS geschlossen werden.

Es dienten folgendes Pipettierschema und folgendes PCR-Protokoll:

Tabelle 16: Pipettierschema für den Ansatz zur Sequenzierungs-PCR

zu sequenzierende DNS (mutierte cDNS von Cathepsin D)	Sequenzierpuffer	Primer (jeweils in getrennten Ansätzen)	Big Dye	H_2O
300 ng bis max. 600 ng	2 µl	0,6 µl	0,8 µl	auf 10 µl

Tabelle 17: PCR-Programm für die Sequenzierungs-PCR

Funktion	Temperatur und Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C für 3 Minute	
Denaturierung	95°C für 30 Sekunden	35x
Annealing der Primer	62°C für 30 Sekunden	35x
Polymerisation	72°C für 30 Sekunden	35x
Abschließende Kühlung	4°C	

Die Sequenzierungs-PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt. Es erfolgte eine Ethanolfällung der PCR-Produkte durch Überführung der gesamten Ansätze in ein Gemisch aus 120 µl H_2O (destilliert), 10 µl Natriumacetat (pH 4,6) und 220 µl Ethanol (100%). Nach Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde für 15 min bei 18.000 rpm (Raumtemperatur) zur Sedimentation ausgefallener DNS zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene DNS-Pellet in 300 µl Ethanol (70% v/v) durch kurzes Mischen auf dem Vortex-Mischer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min bei 18.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet. Es wurde abschließend in 10 µl Formamid-Lösung resuspendiert und mithilfe des ABI PRISM 3100 Genetic Analyzers sequenziert. Der Abgleich mit der Wildtyp DNS erfolgte mithilfe des Programms Seq Man Pro.

2.9.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNS

Ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNS diente der gezielten Freisetzung von DNS-Abschnitten aus dem Plasmidvektor, um die erhaltenen Fragmente weiter zu verwenden oder die Intaktheit des gesamten Plasmids zu überprüfen. Dabei wurden Restriktionsendonukleasen mit spezifischen Erkennungssequenzen eingesetzt. Es diente folgendes Pipettierschema:

Tabelle 18: Pipettierschema für den Ansatz des Restriktionsverdaus

Ausgangs-DNS	Restriktionsenzym	Puffer 10x	H_2O
(cDNS von *CTSD* in pEF3-zeo, mutiert)	*Eco*RI oder *Not*I	(NEB 2.1, kommerziell erhältlich)	

3 µg	3 µl	5 µl	auf 50 µl Gesamtvolumen

Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 4h. Im Fall eines analytischen Restriktionsverdaus zur Kontrolle der Intaktheit des Plasmids erfolgte eine gleichzeitige Inkubation mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I. Bei der präparativen Fragmentierung des Plasmids zur Weiterverwendung wurde hingegen mit den beiden Enzymen in zwei aufeinander folgenden, getrennten Schritten verdaut. Beim präparativen Verdau zu Ligationszwecken wurde zwischen den beiden Restriktionsschritten eine Aufreinigung des linearisierten Plasmids mit dem PCR Clean up/Gel extraction Set vorgenommen. Zur DNS-Aufreinigung kam in diesem Kit ein Verfahren unter Verwendung von Anionenaustauschersäulen zum Einsatz, bei dem Plasmid-DNS an eine vorgefertigte Säulenmatrix bindet und durch Elution mit einem Puffer definierter Ionenstärke gewonnen werden konnte. Die Verwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.9.7 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion von DNS-Fragmenten

Die Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung von DNS-Fragmenten nach ihrer Größe. Im elektrischen Spannungsfeld wanderte die negativ geladene DNS im Puffer durchtränkten Gel zur Anode. Dabei waren kleine DNS-Fragmente einem geringeren Widerstand im Porensystem der Agarosegelmatrix ausgesetzt als große, weshalb sie weiterwanderten. Unter Aussparung von Auftragungstaschen wurde 1% (w/v) in TAE-Puffer gelöste Agarose in Gelschlitten gegossen. In die Auftragungstaschen wurden neben einem DNS-Größenstandard (GeneRuler) die Proben nach Zugabe eines Ladepuffers (Ladepuffer DNS, 6x) pipettiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte im TAE-durchtränkten Gel bei einer Spannung von 85 V für eine Stunde. Durch Zusatz des Farbstoffes GelRed zum Agarosegel konnte die DNS in ultraviolettem Licht mithilfe des Bio Doc Analyzers und entsprechender Gerätesoftware dargestellt werden.

Aus einem Agarosegel konnten die mutierte cDNS von *CTSD* als späteres Insert (1,4 kb) und der Vektor pEF3-zeo ohne Insert (5,8 kb) aus den jeweiligen Banden isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell aus den Gelen herausgeschnitten und mithilfe der Macherey&Nagel PCR Clean up/Gel extraction Sets nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Neben der Auftrennung von DNS-Fragmenten diente die Agarosegelelektrophorese auch der semiquantitativen Abschätzung von Nukleinsäurekonzentrationen.

2.9.8 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Sowohl die Konzentrationsbestimmung als auch die Überprüfung der Reinheit von DNS erfolgten photometrisch mithilfe des Nanodrop ND 1000 Spectrophotometers. Die Absorption wurde bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) gemessen und

durch das Lambert-Beersche-Gesetz computergestützt die Konzentration errechnet. Die Reinheit der DNS konnte abgeschätzt werden, indem die Absorptionsraten bei 260 und 280 nm ins Verhältnis gesetzt wurden. Hohe Absorptionsraten bei 280 nm waren dabei auf Proteinkontamination hinweisend.

2.9.9 Ligation

Mithilfe einer Ligation konnten DNS-Fragmente in den Vektor pEF3-zeo nach vorhergehendem Verdau mit identischen Restriktionsenzymen integriert werden. Ein Reaktionsansatz umfasste dabei 50 ng Vektor und die dreifache Menge des zu integrierenden DNS-Inserts (mutierte cDNS von Cathepsin D). Es wurden 1 µl T4-DNS-Ligase und 2 µl T4-DNS-Ligase-Puffer hinzugefügt und die Ansätze auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit H_2O ergänzt. Bei der folgenden Inkubation über Nacht bei 6°C konnte die T4-DNS-Ligase Phosphodiesterbrückenbindungen zwischen den freien 3´ OH- und 5´ PO_4-Enden der DNS-Fragmente bilden. Ein Ansatz mit doppelverdautem Vektor ohne zu integrierendes DNS-Fragment diente als Negativkontrolle. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente *E. coli* transformiert und die DNS im Anschluss für einen Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I sowie eine kontrollierende Sequenzierung isoliert.

2.9.10 Midikultur transformierter, kompetenter *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNS-Mengen, die beispielsweise zur Transfektion eukaryontischer Zellen eingesetzt werden konnten, erfolgte eine Midikultur transformierter Bakterien. Zu diesem Zweck wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µl Ampicillin versetzt und diese Nährlösung mit 100 µl derjenigen Minikultur beimpft, die nach einem zur Kontrolle durchgeführtem Restriktionsverdau mit anschließender Sequenzierung die gewünschte *CTSD*-Mutation zeigte. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNS aus den Bakterien erfolgte am Folgetag mithilfe des Nucleobond Xtra Plasmid Purification Kits nach Herstellerangaben, wobei das Kit nach dem Anionenaustauschersäulenprinzip funktionierte. Die gewonnene Plasmid DNS wurde nach abschließender Elution in 700 µl Isopropanol (100% v/v) zur Ausfällung bei 4°C und 14.000 g für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 400 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 14.000 g) und nach vorsichtigem Abnehmen des Ethanols in circa 50 µl H_2O erneut eluiert.

Für die sich anschließende Transfektion wurde lineare DNS benötigt, weshalb die Plasmid-DNS mit *Pvu*I verdaut wurde. Es wurden pro Ansatz 10 ng Plasmid-DNS eingesetzt. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielten ferner 3 µl *Pvu*I und 5 µl kommerziell erhältlichen Puffer 3.1. Der Restriktionsverdau erfolgte über 4 h bei 37°C; der Erfolg der Linearisierung wurde mithilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.10 Zellkultivierung

2.10.1 Kulturbedingungen der Zellen

Die adhärenten MEF wurden in *Dulbecco´s Modified Eagle Medium* (DMEM) mit hohem Glukosegehalt (4.500 mg/l) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS, 10% v/v), L-Glutamin (1 % v/v) und Penicillin-Streptomycin-Lösung (1 % v/v) kultiviert, wobei alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Zur Ausübung von Selektionsdruck wurde dem Medium nach Transfektion mit dem Vektor pEF3-zeo zur Selektion transfizierter Zellen Zeocin (1:200) bzw. nach Transduktion mit dem Expressionskonstrukt mCherry-GFP-LC3 zusätzlich Puromycin (1:5000) zugesetzt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und CO_2-Begasung (5% v/v) kultiviert.

Zum Passagieren der Zellen (circa alle vier Tage) und zur Fortkultivierung in anderen Zellkulturschalen wurden die adhärenten MEF gelöst. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen in sterilem, auf 37°C temperierten PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 300–1000 µl Trypsin-EDTA für 2 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 1–3 ml DMEM hinzugefügt und die Zellen im Anschluss abzentrifugiert. Das gewonnene Pellet konnte in frisches Kulturmedium aufgenommen werden und die Zellen verdünnt in die Zellkulturflasche zurückgeführt bzw. auf weitere Schalen ausgesät werden. Zur genauen Konzentrationsbestimmung konnten die Zellen in Suspension mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden.

2.10.2 Anfertigung von Kryostocks und Auftauen der Zellen

Zur Konservierung transfizierter Zellen wurden Kryostocks angefertigt. Dazu wurden die adhärenten Zellen wie zur Passage vom Boden einer Zellkulturflasche (Grundfläche 75 cm^2) gelöst. Das nach Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde nach Abnahme des Mediumüberstandes in 3–5 ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in für die Aufbewahrung bei -81°C geeignete Verschlussröhrchen überführt. Diese wurden unter kleinstmöglichem zeitlichem Verzug bei -81°C in speziellen Einfrierbehältnissen eingefroren, um die Expositionszeit gegenüber DMSO zu minimieren. Das Einfriermedium (das jeweilige zellspezifische Kulturmedium) enthielt 10% FCS (v/v) und 10% DMSO (v/v) zur Zellmembranprotektion.

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Der Inhalt eines Verschlussröhrchens aus der Tiefkühlaufbewahrung wurde in 5 ml Kulturmedium überführt. Das nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in neues Kulturmedium aufgenommen und die Suspension auf eine geeignete Zellkulturschale ausplattiert.

2.10.3 Transfektionen und Transduktionen

2.10.3.1 Stabile Transfektion von MEF durch Lipofektion

Stabile Transfektionen führten zur dauerhaften Integration von DNS-Fragmenten in das Genom der MEF. Zu diesem Zweck wurde die verwandte Plasmid-DNS (mutierte cDNS von Cathepsin D in pEF3-zeo) durch *Pvu*I-Restriktionsverdau zunächst linearisiert. Im Anschluss erfolgte die Transfektion mithilfe des Effectene Reagent Sets durch Lipofektion.

Zur Transfektion mithilfe des Effectene Reagent Sets wurden MEF in 6-*wells*-Zellkulturschalen ausplattiert (2 x 10^5 Zellen/*well*) und über Nacht zu einer Konfluenz von 70 bis 80% kultiviert. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben: 0,4 µg linearisierte Plasmid-DNS wurde mit 3,2 µl sog. Enhancer in einem Gesamtvolumen von 100 µl EC-Puffer (jeweils im Set enthalten) kondensiert (1 sec Mixen auf dem Vortex-Mischer, 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, kurzes Abzentrifugieren). Anschließend erfolgte unter Zugabe von 10 µl Effectene Reagenz die Bildung DNS-haltiger Lipidkomplexe (10 sec Mixen auf dem Vortex-Mischer, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur), welche endozytotisch in die ausplattierten Zellen aufgenommen werden konnten. Dazu wurden die Komplexe in 600 µl frisches DMEM aufgenommen und der Gesamtansatz auf je ein *well* mit Zellen in 1600 µl frischem Medium pipettiert. Zur Aufnahme via Endozytose erfolgte eine Kultivierungsphase über 24h unter Standardbedingungen.

Nach der 24 h stündigen Kultivierungsphase wurden die transfizierten MEF auf größere Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) passagiert. Es erfolgte die Zugabe des spezifischen Selektionsantibiotikums Zeocin (1:200). Die Zellen wurden für zehn Tage unter Selektionsdruck fortkultiviert, wobei ein Wechsel des Kulturmediums alle drei Tage erfolgte. Im Anschluss wurden Einzelzellklone, die nach zehn Tagen Kultivierung makroskopisch sichtbar waren, ausgewählt. Dazu wurde die Lokalisation der ausreichend dicht gewachsenen Zellklone auf dem Boden der Zellkulturschale markiert. Mithilfe eines Selektionsringes, der mit Silikonpaste auf dem Schalenboden angeheftet wurde, wurde eine ausgewählte Zellkolonie eingefasst und diese nach Ablösen mit Accutase in eine 24-*wells*-Zellkulturschale überführt. Aus Zellklonen, die nicht gepickt wurden, wurde durch Pooling ein Mischklon verschiedener Einzelzellklone erstellt.

2.10.3.2 Transiente Transfektion von HEK 293 durch Calciumphosphatpräzipitation

HEK 293 wurden zur Herstellung eines Lentivirus für die Transduktion von Cathepsin D-Mutanten exprimierenden MEF mit drei verschiedenen Plasmiden transient kotransfiziert. Zur Transfektion mit pLVX, psPAX und pMD2.G wurde die Plasmid-DNS mit Calciumphosphat ausgefällt, wobei die Präzipitate anschließend endozytotisch von den HEK 293 aufgenommen werden konnten. Die verwandte DNS-Menge verteilte sich auf die drei Plasmide pLVX zu psPAX zu pMD2.G im Verhältnis 50% zu 36% zu 14% der eingesetzten Gesamtmenge.

HEK 293 wurden am Vortag der Transfektion auf Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturplatten ausgesät (10^5 Zellen/cm^2). Am Tag der Transfektion erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums (DMEM). Zur Herstellung der DNS-Präzipitate wurden 940 µl Präzipitationspuffer (2x) in einem 15 ml Verschlussröhrchen vorgelegt. In einem Mikroreaktionsgefäß wurden 77 µg zirkuläre Plasmid-DNS (oben angegebene Plasmide in genannten Mengenanteilen) in 840 µl H_2O aufgenommen und anschließend 120 µl $CaCl_2$-Lösung (2 M) vorsichtig hinzugefügt. Die DNS-haltige Lösung wurde im Anschluss tropfenweise unter kontinuierlicher Durchmischung auf einem Vortex-Mischer in den Präzipitationspuffer überführt. Zur Bildung von Calciumphosphatausfällungen, mit denen auch die Plasmid-DNS kopräzipitierte, erfolgte eine 15-minütige Inkubationsphase bei Raumtemperatur. Die Präzipitatlösung wurden anschließend auf die HEK 293 gegeben und diese unter Bedingungen, die die Anforderungen der Sicherheitsstufe zwei (S2) für das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Zelllinien erfüllen, fortkultiviert. Nach zwei Tagen konnte aus dem Überstand der HEK 293 Zellen das Lentivirus zur Transduktion ausgefällt werden.

2.10.3.3 Lentivirale Transduktion von MEF Zellen zur Expression von mCherry-GFP-LC3

Zur Transduktion der Cathepsin D-Mutanten exprimierenden MEF mit mCherry-GFP-LC3 wurde ein lentivirales Transduktionssystem der zweiten Generation eingesetzt. Die Produktionszelllinie HEK 293 wurde wie beschrieben (s. o.) mit drei verschiedenen Plasmiden transfiziert: Das pLVX-Plasmid stellte das Transferplasmid dar, in das die cDNS von mCherry-GFP-LC3 bereits zwischen die 5´- und 3´-LTR (*long terminal repeat*) einkloniert vorlag. Zur Selektion erfolgreich transduzierter Zellen verfügte es über ein Puromycin-Resistenzgen. psPAX trug die lentiviralen Strukturgene *gag* und *pol*, die für Hüllproteine und Enzyme des von HIV1 abgeleiteten Lentivirus codierten. Zur Vergrößerung des viralen Tropismus lag auf pMD2.G das Gen für Glykoprotein G des Indiana-Vesiculovirus zur Pseudotypisierung.

Zur Viruspräzipitation nach zweitägiger Kultivierung in HEK 293 wurde der Mediumüberstand zunächst durch einen Filter aus Polyethersulfon mit Porengröße 0,45 µm steril filtriert. Anschließend wurden zu 15 ml Mediumüberstand 3,75 ml Polyethylenglycol (PEG 6000 50%), 1,59 ml NaCl-Lösung (4M) und 1,71 ml PBS pipettiert und durch Invertieren gemischt. Nach 2 h Inkubation bei 4°C wurde die Lösung für 20 min (5000 rpm bei 4°C) zentrifugiert. Ausgefallene Viren wurden im Anschluss als weißliches Pellet sichtbar. Das Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes in einem Zehntel des Ursprungsvolumens resuspendiert (1,5 ml Medium) und Polybrene (Konzentration 10 µg/ml) hinzugefügt, um die Transduktionseffizienz des gewonnenen Lentivirus zu erhöhen.

Zur Transduktion wurden MEF am Vortag in *6-wells*-Zellkulturschalen ausgesät (3 x 10^5 Zellen/*well*). 375 µl Virus-haltige Lösung wurden mit Polybrene-haltigem (10 µg/ml) Kulturmedium auf 1,5 ml Gesamtvolumen ergänzt und dieser Ansatz auf die MEF in einem *well* pipettiert. Am Tag nach der Transduktion wurden die Zellen vor dem Mediumwechsel

zweifach mit PBS gewaschen. Das Kulturmedium enthielt durchgehend Zeocin (1:200) zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes. Zur Selektion erfolgreich transduzierter Zellen erfolgte am zweiten Tag nach der Transduktion die Zugabe von Puromycin (1:5000) in das Kulturmedium. Alle Arbeiten in Zusammenhang mit der Produktion der Lentiviren und die Transduktion der MEF bis zum Beginn der Selektionsphase mit Puromycin wurden unter S2-Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

2.10.3.4Kontrolle des Transfektionserfolges

Zur Kontrolle des Transfektionserfolges der Cathepsin D-defizienten MEF mit den verschiedenen Cathepsin D-Mutanten wurde neben dem Nachweis auf Proteinebene ein direkter Mutationsnachweis durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung des Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kits nach Angaben des Herstellers zunächst die genomische DNS der Zellen eines Klons präpariert. Diese gDNS wurde mithilfe einer Sequenzierungs-PCR unter Einsatz verschiedener Primer amplifiziert, sequenziert und auf das Vorhandensein der Mutation überprüft.

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Zelllyse zur Proteinextraktion

Gewonnene Zellpellets wurden zur Herstellung von Proteinlysaten in 100 µl Triton X-100 in PBS (0,1 % v/v) suspendiert und die Suspension für 10 sec Ultraschall im Ultraschallbad ausgesetzt. Nach anschließender Lagerung auf Eis für 10 min wurde 20 min ultrazentrifugiert (13.000 rpm bei 4°C) und der Überstand unter Zurücklassen von Zelldetritus im Mikroliterreaktionsgefäß zur Proteinkonzentrationsbestimmung abpipettiert.

2.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch mit dem BCA-Assay Kit nach Herstellerangaben. Alle Konzentrationen wurden in Doppelmessungen in einer 96 *wells*-Platte unter zusätzlichem Auftragen definierter Eichkonzentrationen von Albumin in wässriger Lösung (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,2 µg/µl) bestimmt. Zu jeder Probe (je 2 µl Lösung unbekannter Proteinkonzentration in 23 µl destilliertem Wasser) und den Lösungen bekannter Eichkonzentrationen wurden 200 µl BCA-Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 pipettiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Im BCA-Reagenz B enthaltene Kupferionen komplexierten gelöstes Protein, wurden reduziert und bildeten mit Bicinchoninsäure (in Reagenz A enthalten) einen violetten Farbkomplex. Die Absorption der Lösung konnte anschließend bei 562 nm photometrisch gemessen und die Messwerte anhand der Ergebnisse für die Lösungen bekannter Eichkonzentrationen in Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

2.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen in einem Proteingemisch nach ihrer Größe erfolgte eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli. Die aufzutrennenden Proben wurden in Aliquots gleichen Volumens mit identischem Proteingehalt unter Verwendung destillierten Wassers aliquotiert und mit je 25% (v/v) Laemmli-Puffer versetzt. Bei 95°C wurden die Proben für 10 Minuten denaturiert, wobei im Laemmli-Puffer enthaltenes β-Mercaptoethanol vorhandene Disulfidbrückenbindungen reduzierte, und im Anschluss in die Kammern eines diskontinuierlichen Gelelektrophoresesystems überführt. Die Gele bestanden aus einem oben liegenden Sammelgel (Polyacrylamidgehalt 5,1%) zur Konzentration der Proben und einem sich anschließenden Trenngel (variabler Polyacrylamidgehalt je nach Zielgröße des untersuchten Proteins). Unter Anlage einer Stromspannung von 70 V wurde das Sammelgel bis zum Auftreffen der Lauffront an der Grenze zum Trenngel durchlaufen, worauf sich eine Auftrennung der Proteine bei 120 V im Trenngel anschloss. Die ausschließliche Auftrennung nach der Molekülmasse fand aufgrund der Linearisierung der Proteine während der Denaturierung und der Anlagerung des kationischen SDS in konstanten Massenverhältnissen an die Proteinmoleküle statt, wodurch diese eine konstant negative Ladung aufwiesen. Das Trenngel wurde bis zur Darstellung des gesuchten Proteins im zentralen Gelanteil durchlaufen, was anhand eines mitgeführten Proteinstandards mit gefärbtem Protein definierter Größe kontrolliert werden konnte. Die SDS-Gele mit den aufgetrennten Proteingemischen wurden anschließend im *Semi-Dry-Blot*-Verfahren geblottet.

2.11.4 *Semi-Dry-Blotting* und Immundetektion von Proteinbanden

Für die spätere Antikörperdetektion von Proteinen wurden die SDS-Polyacrylamid-gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteingemische auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dazu wurde das SDS-Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, Membran und Gel wurden sandwichartig mit je drei Filterpapieren umschichtet und das entstandene Blotting-Sandwich wurde mit der Nitrozellulosemembran zur Anode weisend zwischen den Elektroden einer Blotting-Kammer platziert. Bei einer gleichmäßigen Durchtränkung der Filterpapiere mit Transferpuffer erfolgte der Blottingvorgang auf die Nitrozellulosemembran unter Anlage einer Stromstärke von 1,2 mA/cm^2 Membran in 75 Minuten. Der Transfererfolg wurde anschließend durch reversibles Anfärben der Proteinbanden auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau (S)-Lösung überprüft. Die gefärbten Membranen wurden daraufhin 10 Minuten in PBS-T 0,1% schwenkend gewaschen und 1 h in 5% (w/v) Blockierpuffer blockiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit Primärantikörper in 1% (w/v) Blockierpulver (verwandte Konzentrationen siehe Material, 2.5, S. 26) erfolgte über Nacht unter kontinuierlicher Rotation bei 4°C.

Zur Immundetektion des gebundenen Primärantikörpers wurde die über Nacht inkubierte Membran für je 10 Minuten dreifach mit PBS-T 0,1% gewaschen. Anschließend erfolgte eine

Inkubation mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in 1% (w/v) Blockierpuffer für 1 h, wobei sich der Sekundärantikörper gegen die Herkunftspezies des Primärantikörpers richtete. Es schlossen sich drei weitere Waschschritte für je 10 Minuten in PBS-T 0,1% an, bevor die Membran für 4 min mit Lumi-Light-Substrat inkubiert wurde. Die Inkubation mit Lumi-Light-Substrat führte zu dessen enzymatischer Umsetzung durch die Meerrettichperoxidase, wobei ein chemilumineszentes Signal emittiert und im entsprechenden Lesegerät detektiert wurde.

Um die Bandenintensitäten auf den Membranen vergleichen zu können, erfolgte eine Normierung gegen β-Actin, welches im Anschluss an die primäre Immundetektion nachgewiesen wurde. Zu diesem Zweck wurden die Nitrozellulosemembranen gestrippt, um gebundene Antikörper zu entfernen und somit eine weitere Primärantikörperbindung zu ermöglichen. Der Strippingvorgang beinhaltete ein zweimaliges Waschen der Membran mit mildem Strippingpuffer für je 10 Minuten, wobei sich ein dreimaliges Waschen in PBS-T 0,1% für 10 Minuten sowohl voranstellte als auch anschloss.

2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde einerseits die intrazelluläre Lokalisation des Cathepsin D-Wildtyps und der verschiedenen Cathepsin D-Mutanten und ihre Kolokalisation mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP I untersucht. Andererseits diente die fluoreszenzmikroskopische Darstellung gelber und roter Fluoreszenzsignale zusätzlich mCherry-GFP-LC3 transduzierter MEF, die zuvor mit dem Cathepsin D-Wildtyp bzw. den verschiedenen Cathepsin D-Mutanten stabil transfiziert worden waren, der Untersuchung der autophagozytotischen Flussdynamik.

2.12.1 Intrazellulärer Nachweis des Cathepsin D-Wildtyps und der verschiedenen Cathepsin D-Mutanten

Zur intrazellulären Detektion des Cathepsin D-Wildtyps und der untersuchten Cathepsin D-Mutanten in stabil transfizierten MEF wurden diese zu einer Zellzahl von je 0,05 x 10^6 Zellen auf sterilen Deckgläschen in 24-*wells*-Schalen ausgesät. Zur Kontrolle dienten Zellen, die mit dem leeren pEF3-zeo-Vektor ohne Insert transfiziert worden waren, um mögliche durch das Transfektionsplasmid bedingte Effekte auszuschließen. Die Zellen wurden für 24 h unter oben genannten Standardbedingungen kultiviert. Dabei wurde beachtet, dass das Zellwachstum eine visuell geschätzte Konfluenz von 40% nicht überschritt.

Sobald die MEF schätzungsweise 40%-konfluent gewachsen, jedoch noch einzelne nicht-konfluente Zellen vorhanden waren, erfolgte ihre Fixierung auf den Deckgläschen mit Paraformaldehyd. Nach vorsichtiger Abnahme des Kulturmediums (DMEM) wurden die Zellen mit 500 µl PBS pro *well* einmalig gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (4%, w/v) mit 500 µl pro *well* bei 37°C über 20 min. Nach einem weiteren Waschschritt in PBS wurden die Zellen für 10 min bei 37°C mit 500 µl

Ammoniumchlorid (50 mM) pro *well* überschichtet. Dies diente der Inaktivierung der Aldehydgruppen überschüssigen Paraformaldehyds im Medium, um eine spätere unspezifische Antikörperbindung zu unterbinden. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS (je 500 µl).

Die fixierten Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert, indem sie für 1 h mit 500 µl einer 0,2%-igen Saponinlösung (w/v) in PBS überschichtet wurden. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren, war der Lösung 10% Pferdeserum (v/v) zugesetzt. Der Permeabilisierung schloss sich ein zweimaliges Waschen mit PBS (je 500 µl) an.

Zur Immundetektion von Cathepsin D wurden die Deckgläschen mit den permeabilisierten Zellen im Anschluss mit einer Primärantikörperlösung inkubiert. Als Trägerlösung diente 0,02% Saponin (w/v) in PBS mit einem 1%-igen Volumenanteil sterilen Pferdeserum. Saponin wurde in allen Folgeschritten zugesetzt, um eine transiente Permeabilisierung der Zellmembranen zu erhalten. Zur Immundetektion dienten ein monoklonaler, gegen Cathepsin D gerichteter IgG-Antikörper aus dem Kaninchen (Hersteller Abcam, Verdünnung 1:250). Die Inkubation mit der Primärantikörperlösung (20 µl/Deckglas) erfolgte auf Parafilm über Nacht bei 6°C, indem die Deckgläschen mit der zelladhärenten Seite auf Tropfen der Lösung gelegt wurden. Zur Schaffung eines feuchten Milieus wurde der Laborfilm auf mit destilliertem Wasser getränkten Zellstoff verwerfungsfrei gelagert.

Nach Inkubation mit der Primärantikörperlösung über Nacht erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen (0,02% Saponin in PBS, w/v) wurde diese analog zum ersten Inkubationsschritt bei Raumtemperatur für 45 min durchgeführt. Als Trägerlösung diente die idente Lösung wie bei der Inkubation mit Primärantikörper. Bei den Fluoreszenzsignal-gekoppelten Antikörpern handelte es sich um den AlexaFluor 488-Antikörper (gegen aus Kaninchen gewonnenem Immunglobulin gerichtet). Der Sekundärantikörper (Hersteller Thermo Fisher Scientific) wurde in der Konzentration 1:2000 eingesetzt. Nach der 45-minütigen Inkubation wurden die Deckgläschen wieder in eine 24-*wells*-Zellschale verbracht und fünfmalig mit jeweils 300 µl Waschlösung gewaschen (drei Waschschritte mit 0,02% Saponin in PBS [w/v], zwei Waschschritte mit reinem PBS). Nach dem Waschen erfolgte ein Entwässerungsschritt, indem die Deckgläschen konsekutiv mit destilliertem und 70%-igem Ethanol benetzt wurden. Nach einer einstündigen Trocknungsphase auf Zellstoff wurde die zelladhärente Seite der Deckgläser im Einbettmedium Prolong Antifade Gold eingebettet und zur Fixierung auf Objektträgern eine Nacht im Kühlschrank gelagert.

2.12.2 Untersuchung der Kolokalisation von Cathepsin D und LAMP I

Zur Untersuchung der Kolokalisation von Cathepsin D mit dem lysosomalen Marker LAMP I wurden MEF, die entweder den Cathepsin D-Wildtyp oder eine der untersuchten mutanten Cathepsin D-Mutanten exprimierten, zu analogen Bedingungen wie in 2.12.1 ausplattiert und kultiviert.

Nach einmaligem vorsichtigem Waschen der Zellen mit PBS unter dem Arbeitsfeld einer Sterilbank wurden die Deckgläschen mit -20°C kaltem Methanol überschichtet (500 µl/*well*) und für 15 min bei -20°C im Gefrierfach gekühlt. Vor der anschließenden Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte ein weiterer Waschschritt mit PBS.

Die fixierten Zellen wurden mit Saponin permeabilisiert, indem sie für 1h mit 500 µl einer 0,2%-igen Saponinlösung (w/v) in PBS überschichtet wurden. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren, war der Lösung 10% Pferdeserum (v/v) zugesetzt. Der Permeabilisierung schloss sich ein zweimaliges Waschen mit PBS an.

Zur Immundetektion von Cathepsin D und des lysosomalen Markers LAMP I wurden die Deckgläschen mit den permeabilisierten Zellen im Anschluss in einer Primärantikörperlösung inkubiert. Als Trägerlösung diente 0,02% Saponin (w/v) in PBS mit einem 1%-igen Volumenanteil sterilen Pferdeserum. Saponin wurde in allen Folgeschritten zugesetzt, um eine transiente Permeabilisierung der Zellmembranen zu erhalten. Zur Immundetektion dienten ein monoklonaler, gegen Cathepsin D gerichteter IgG-Antikörper aus dem Kaninchen (Hersteller Abcam, Verdünnung 1:250) und ein monoklonaler, gegen LAMP I gerichteter IgG-Antikörper aus der Ratte (Hersteller Becton, Dickinson and Company, Verdünnung 1:200). Zur späteren Detektionsfähigkeit mit den jeweiligen, verschiedenen Sekundärantikörpern wurde auf einen unterschiedlichen Speziesursprung der Primärantikörper geachtet. Die Inkubation mit der Primärantikörperlösung (20 µl/Deckglas) erfolgte auf Parafilm über Nacht bei 6°C, indem die Deckgläschen mit der zelladhärenten Seite auf Tropfen der Lösung gelegt wurden. Zur Schaffung eines feuchten Milieus wurde der Laborfilm auf mit destilliertem Wasser getränkten Zellstoff verwerfungsfrei gelagert.

Nach Inkubation mit der Primärantikörperlösung über Nacht erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen (0,02% Saponin [w/v] in PBS) wurde diese bei Raumtemperatur für 45 min durchgeführt. Als Trägerlösung diente die idente Lösung wie bei der Inkubation mit Primärantikörper. Bei den Fluoreszenzsignal-gekoppelten Antikörpern handelte es sich wieder um den AlexaFluor 488-Antikörper, und den AlexaFluor 546-Antikörper (gegen aus Ratte gewonnenem Immunglobulin gerichtet). Beide Sekundärantikörper (Hersteller Thermo Fisher Scientific) wurden jeweils in der Konzentration 1:2000 eingesetzt. Nach der 45-minütigen Inkubation wurden die Deckgläschen wieder in eine 24-*wells*-Zellschale verbracht und fünfmalig mit jeweils 300 µl Waschlösung gewaschen (drei Waschschritte mit 0,02% Saponin [w/v] in PBS, zwei Waschschritte mit reinem PBS). Auf das Waschen erfolgte ein Entwässerungsschritt, indem die Deckgläschen konsekutiv mit destilliertem und 70%-igem Ethanol benetzt wurden. Nach einer einstündigen Trocknungsphase auf Zellstoff wurde die zelladhärente Seite der Deckgläser im Einbettmedium Prolong Antifade Gold eingebettet und zur Fixierung auf Objektträgern eine Nacht im Kühlschrank gelagert.

2.12.3 Kultivierung der mCherry-GFP-LC3 transfizierten MEF zur Untersuchung der autophagozytotischen Flussdynamik

Zur Untersuchung der intrazellulären autophagozytotischen Flussdynamik wurden mCherry-GFP-LC3 transfizierte MEFs, die sowohl verschiedene Cathepsin D-Mutanten als auch das Cathepsin D-Wildtypprotein exprimierten, zu einer Zellkonzentration von 1 x 10^5 Zellen auf Deckgläschen in *24-well*-Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer Kultivierungsphase über 24 h und einem einmaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitdauer in tierserumfreiem Medium (EBSS) kultiviert. Die Kultivierungszeiten in EBSS betrugen 1,5 h bzw. 3 h bis zur Fixierung der Zellen mit gekühltem Methanol (-20°C) nach einmaligem Waschen mit PBS. Zellen auf einigen der Deckgläschen wurden nach dreistündiger Kultivierungszeit in EBSS für weitere 1 h bzw. 2 h in serumhaltigem Kulturmedium (DMEM mit 10% FCS unter Zusatz der Selektionsantibiotika Zeocin in der Konzentration 1:200 und Puromycin 1:5000) fortkultiviert und erst anschließend mit gekühltem Methanol nach einmaligem Waschen mit PBS fixiert. Als Kontrolle dienten transduzierte MEFs, die unmittelbar nach der eintägigen Kultivierungsphase ohne Verbringung in tierserumfreies Medium auf den Deckgläschen fixiert wurden. Durch Fluoreszenzlöschung des von der GFP-Markierung erzeugten grünen Fluoreszenzsignals im sauren pH-Milieu der Lysosomen stellten sich in dem Versuch Autophagosomen als gelbe und Autophagolysosomen als rote Fluoreszenzsignale dar. Durch gleichzeitige Emission sowohl eines grünen (GFP) als auch eines roten (mCherry) Fluoreszenzsignals ergab sich für Autophagosomen also ein gelbes Fluoreszenzsignal, für Autophagolysosomen hingegen ein rotes Signal nach Fluoreszenzlöschung des GFP-Signals durch ihr saures pH-Milieu (Pankiv et al. 2007).

2.13 Bestimmung der Cathepsin D-Enzymaktivität

Die Bestimmung der Cathepsin D-Enzymaktivität in Zelllysaten mit dem Cathepsin D-Wildtyp oder den verschiedenen Cathepsin D-Mutanten transformierter MEF erfolgte mithilfe eines kommerziell erhältlichen Cathepsin D-Substrates der Firma Bachem. Zur Aktivitätsbestimmung wurden 1 µg Protein der entsprechenden, durch Ultraschalllyse gewonnen Zelllysate eingesetzt. Die Zelllysatvolumina wurden zu einem Ansatzvolumen von 10 µl mit 0,2% bovinem Serum Albumin in NaCl (w/v) ergänzt und die Ansätze paarig in eine lichtabgeschirmte, schwarze 96-*wells*-Platte aufgetragen. Unter Lichtabschirmung wurden unter Kühlung auf Eis je 20 µl einer 40 µM Enzymsubstratlösung hinzugegeben. Als Substrat diente das synthetische Dekapeptid 7-Methoxycoumarin-4-acetyl-GKPILFFRLK-2,4-dinitrophenyl-D-R-NH_2 Trifluoroacetat. Bei diesem Substrat handelt es sich um ein fluoreszentes Molekül, wobei initial aufgrund der Fluoreszenzlöschung des Fluorophors 7-Methoxycoumarin-4-acetyl durch die Dinitrophenylgruppe kein Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert wird. Erst nach katalytischer Spaltung des Substrates durch Cathepsin D zwischen den beiden Phenylalaninresten kann ein emittiertes Fluoreszenzsignal detektiert werden (Exzitationsoptimum bei 340 nm, Emissionsoptimum bei 400 nm). Nach Zugabe

von 20 µl Substratlösung erfolgte eine Inkubation bei 37°C unter ständigem Schwenken im Mikrotiterplattenschwenker bei 300 rpm für 15 min. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von je 150 µl 0,17 M Glycin-Carbonatpuffer zum Abstoppen der katalytischen Reaktion. In der Folge wurden in aufsteigender Reihenfolge 0, 120 pmol, 240 pmol, 480 pmol, 960 pmol und 1920 pmol der fluoreszenten Standardsubstanz Aminomethylcoumarin in einem Ansatzvolumen von 130 µl/well auf die Mikrotiterplatte unter Lichtabschirmung paarweise aufgetragen. Die Bestimmung der Intensität des Fluoreszenzsignales erfolgte bei 37°C im Photometer (Exzitationsoptimum bei 340 nm, Emissionsoptimum bei 400 nm).

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Charakterisierung stabiler Cathepsin D-Mutanten in Cathepsin D-defizienten MEF

3.1.1 Heterologe Expression des Cathepsin D-Wildtyps und der verschiedenen Mutanten in Cathepsin D-defizienten MEF

Cathepsin D-defiziente MEF wurden durch Lipofektion mit dem Expressionsplasmid pEF3-zeo, in das entweder für den Cathepsin D-Wildtyp oder für -Mutanten kodierende Inserts einkloniert worden waren, stabil transfiziert. Zur Kontrolle dienten MEF, die nur mit dem Expressionsplasmid ohne Insert transfiziert wurden. Stabil transfizierte Klone wurden unter Zugabe von Zeocin zum Kulturmedium selektioniert. Um den Einfluss der Mutationen auf die Proteinexpression und die Prozessierung von Cathepsin D in MEF zu bestimmen, erfolgte die Immundetektion von Cathepsin D im Western Blot mithilfe eines polyklonalen murinen Antikörpers. Dabei kamen sowohl das inaktive Proenzym (53 kDa), die intermediäre Form von Cathepsin D im prälysosomalen Kompartiment (48 kDa) als auch die reife Enzymform in den Lysosomen (33 kDa, carboxyterminales Fragment) als Proteinbanden zur Darstellung. Immunoreaktivität für sowohl die Vorläuferform und die intermediäre Form als auch für die reife, prozessierte Form von Cathepsin D ließen sich beim Wildtyp und im Fall der Mutanten p.G149V, p.S100F, p.K331del und p.F229I nachweisen. Im Fall der p.R399H- und der p.W383C-Mutante ließen sich nur die Cathepsin D-Preproform und die intermediäre Form darstellen. Die p.F229 del- und die c.268_269insC-Mutante zeigten keine Immunoreaktivität für Cathepsin D.

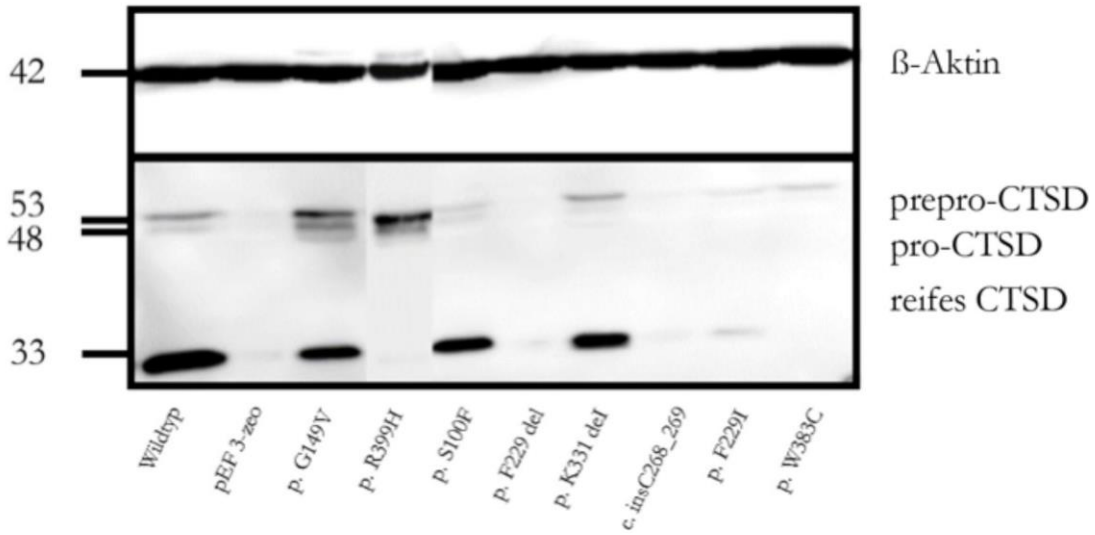


Abbildung 3: Western Blot der heterologen Expression des Cathepsin D-Wildtyps und der Cathepsin D-Mutanten in Cathepsin D-defizienten MEF. Die Immundetektion erfolgte

mithilfe des polyklonalen Antikörpers BD610800 (1:1000 verdünnt in PBS-Tween 0,1% mit 1% Milchpulver). Als Kontrolle dienten mit dem Plasmid pEF3-zeo ohne Insert transfizierte MEF (zweite Spur). Zur Ladekontrolle erfolgte ein Nachweis von ß-Actin mithilfe eines monoklonalen Mausantikörpers (1:4000 verdünnt in PBS-Tween 0,1% mit 1% Milchpulver). Relative Molekülmassen in kDa angegeben. Zur Untersuchung der Cathepsin D-Expression einzelner Mutanten wurden Einzelklone ausgewählt.

3.1.2 Vergleich verschiedener Antikörper zur Immundetektion von Cathepsin D im Western Blot

Es wurden verschiedene Antikörper bezüglich ihrer Fähigkeit getestet, Cathepsin D im Western Blot zu detektieren. Dabei gelang die Immundetektion unter Verwendung der Antikörper BD610800 aus der Maus und des monoklonalen Antikörpers aus der Ziege. Unter Verwendung des Antikörpers NEB2284S, hergestellt in Kaninchen, gelang der Nachweis eines Cathepsin D-typischen Bandenmusters im Western Blot nicht.

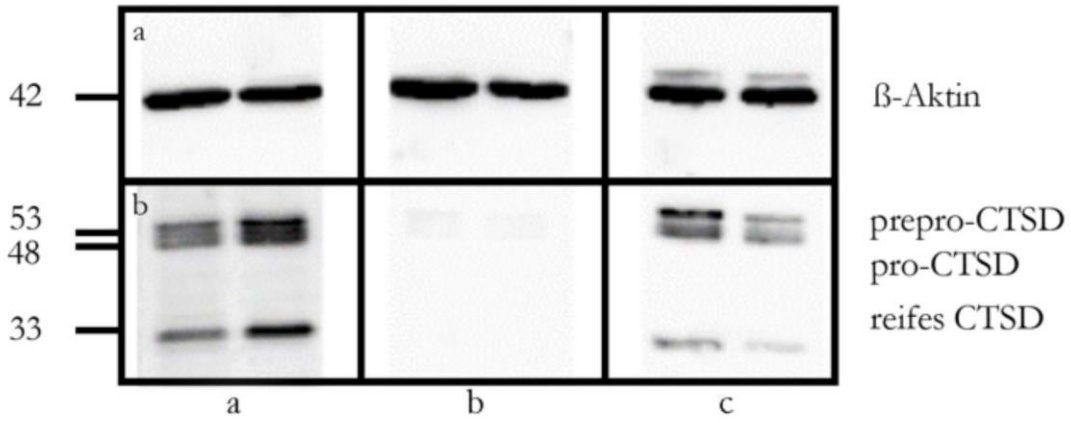
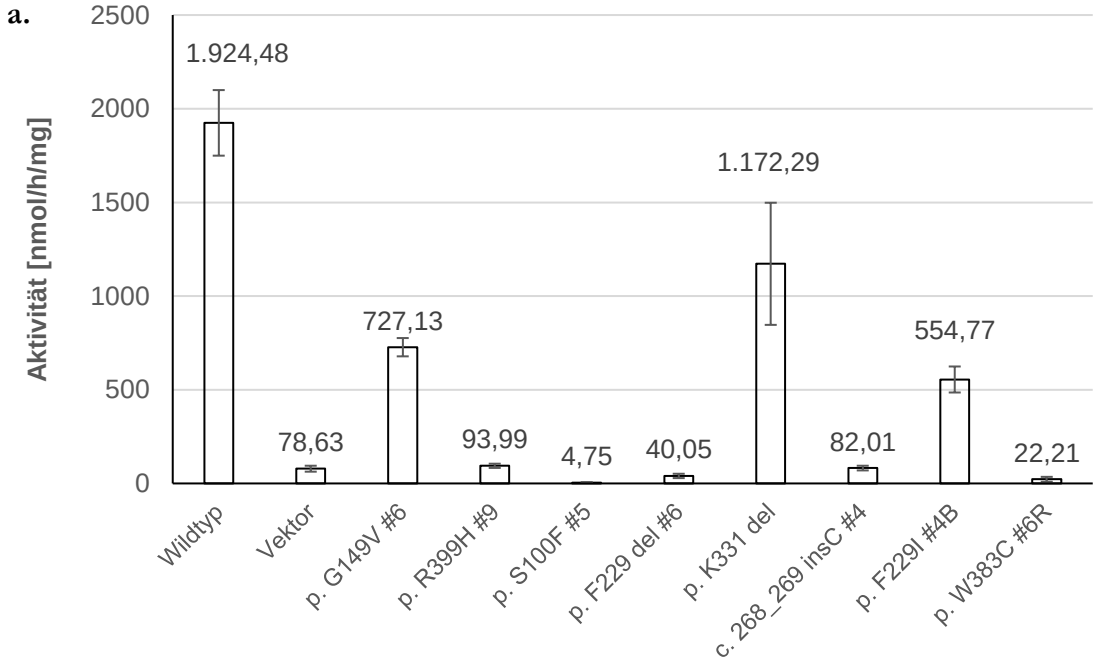


Abbildung 4: Western Blot zum Vergleich verschiedener Antikörper zur Cathepsin D-Immundetektion. Nachweis der Cathepsin D-Mutante p.K331del in den stabil transfizierten Cathepsin D-defizienten MEF, jeweils Untersuchung zweier Klone. Die Immundetektion erfolgte unter Verwendung des (a) monoklonalen Antikörpers aus der Ziege, (b) polyklonalen Antikörpers NEB2284S aus dem Kaninchen und (c) des polyklonalen Antikörpers BD610800 aus der Maus (jeweils 1:1000 verdünnt in PBS-Tween 0,1% mit 1% Milchpulver). Zur Ladekontrolle erfolgte ein Nachweis des Zytoskelettproteins ß-Actin mithilfe eines monoklonalen Mausantikörpers (1:4000 verdünnt in PBS-Tween 0,1% mit 1% Milchpulver). Relative Molekülmassen in kDa angegeben.

3.1.3 Cathepsin D-Enzymaktivität der verschiedenen Cathepsin D-Mutanten in stabil transfizierten Cathepsin D-defizienten MEF

Um die Auswirkung der verschiedenen Cathepsin D-Mutationen auf die katalytische Aktivität von Cathepsin D zu bestimmen, wurde ein fluorometrischer Enzymaktivitätsassay durchgeführt. Für den Assay wurden die Cathepsin D-defizienten MEF verwandt, die nach Transfektion den Cathepsin D-Wildtyp bzw. die verschiedenen Mutanten heterolog exprimierten. Die Lyse der verwandten MEF erfolgte unmittelbar vor Bestimmung der Enzymaktivität. Als Cathepsin D-Substrat zur fluorometrischen Messung diente das synthetische Dekapeptid 7-Methoxycoumarin-4-acetyl-GKPILFFRLK-2,4-dinitrophenyl-D-R-NH_2-Trifluoroacetat. Erst nach katalytischer Spaltung des Substrates durch Cathepsin D ließ sich durch Aufhebung der Fluoreszenzlöschung innerhalb des Substratmoleküls die Intensität eines emittierten Fluoreszenzsignals als Parameter für die Enzymaktivität im BioTek Reader messen. Bei Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität zeigten sich deutliche Aktivitätsunterschiede zwischen den Mutanten. Während die p.K331del- bzw. die p.G149V-Mutante eine Restaktivität von ca. 60% bzw. ca. 40% der Aktivität des stabil in MEF exprimierten Cathepsin D-Wildtyps zeigten, wies die p.F229I-Mutanten noch eine Restaktivität von ca. 29% auf. Die Mutanten p.R399H, p.F229del und c.268_269insC zeigten marginale Restaktivitäten. Noch geringere Aktivitäten ließen sich im Fall der Mutanten p.W383C und p.S100F feststellen.



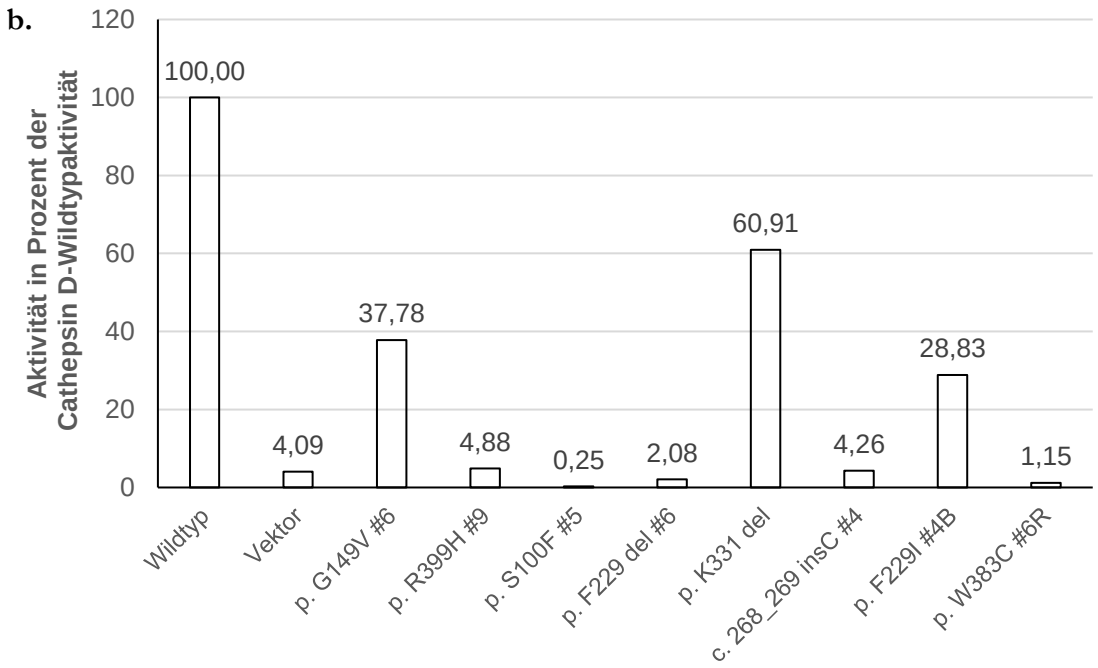


Abbildung 5: Cathepsin D-Enzymaktivität in stabil transfizierten MEF. (a) Cathepsin D-Enzymaktivität in nach Transfektion den Cathepsin D-Wildtyp bzw. die jeweils angegebene Mutante heterolog exprimierenden MEF. Darstellung der Enzymaktivität in [nmol/h/mg Proteinlysat]. Werte aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung unter Angabe des statistischen Standardfehlers als Fehlerindikator. Zur Aktivitätsbestimmung wurde jeweils ein Klon pro Mutante ausgewählt. Bei großen interklonalen Aktivitätsunterschieden wurde im Fall der p.K331del-Mutante der Mittelwert aus den Aktivitäten dreier verschiedener Klone gebildet. Als Negativkontrolle dienten Cathepsin D-defiziente MEF, die mit dem Expressionsvektor ohne Insert transfiziert worden waren. Die Aktivitäten sind abzüglich dieser Leervektoraktivität dargestellt. (b) Darstellung der gemessenen Cathepsin D-Aktivitäten in Prozent der Aktivität des Cathepsin D-Wildtyps.

3.1.4 Intrazelluläre Lokalisation der Cathepsin D-Mutanten und des -Wildtyps in stabil transfizierten MEF

Zur Bestimmung des Einflusses der verschiedenen Mutationen auf die intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin D erfolgte eine Immunfluoreszenzmikroskopie. Für die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation wurden die Cathepsin D-defizienten MEF verwandt, die nach Transfektion den Cathepsin D-Wildtyp bzw. die verschiedenen Cathepsin D-Mutanten heterolog exprimierten. Es wurde die Kolokalisation des Wildtyp-Cathepsin D und der mutierten Proteine mit dem lysosomalen Marker LAMP I (CD 107a) in transfizierten MEF untersucht. Zur Sicherstellung des Transfektionserfolges erfolgte vor der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung ein Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression. Es wurden je 50 Zellen der angefertigten Präparate gesichtet und für die Darstellung in dieser Arbeit repräsentative Zellen ausgewählt.

Es zeigte sich für die verschiedenen Mutanten ein unterschiedliches Kolokalisationsverhalten. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Cathepsin D-Wildtyps in den stabil transfizierten MEF gelang mithilfe des Primärantikörpers abc 75852 aus dem Kaninchen. Das Wildtypprotein stellte sich erwartungsgemäß kolokalisiert mit dem lysosomalen Marker LAMP I (CD 107a) dar. In mit Insert-freien Expressionsvektor pEF3-zeo transfizierten Zellen als Negativkontrolle zeigte sich kein Cathepsin D-typisches Fluoreszenzsignal. Eine Kolokalisation des mutierten Cathepsin D mit dem lysosomalen Marker LAMP I zeigte sich im Fall der Mutationen p.G149V (Abbildung 6 (c)), p.S100F (Abbildung 6 (e)), p.K331del (Abbildung 7 (g)) und p.F229I (Abbildung 7 (i)). Die Mutanten p.R399H (Abbildung 6 (d)) und p.W383C (Abbildung 7 (j)) wiesen ein intrazelluläres Signal für Cathepsin D auf, das jedoch nicht mit dem Fluoreszenzsignal von LAMP I kolokalisierte. Dem gegenüber zeigten die Mutanten p.F229del und c.268_289insC kein Fluoreszenzsignal für Cathepsin D. Perinukleär zeigte sich bei den beiden letztgenannten Mutanten ein am ehesten unspezifisches Fluoreszenzsignal.

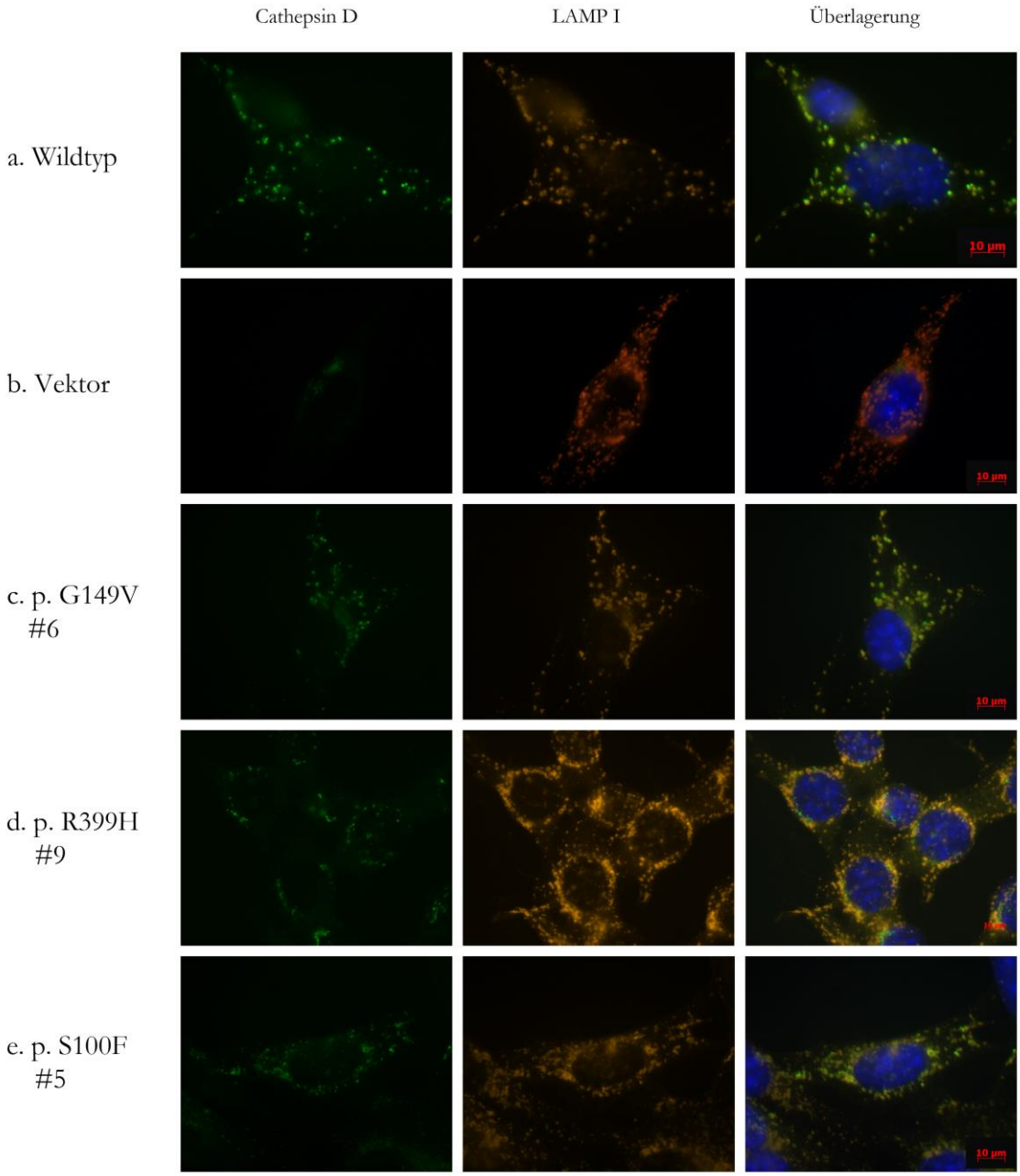


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie des Cathepsin D-Wildtyps und der unter (a)-(e) genannten -Mutanten. Als Kontrolle dienten Cathepsin D-defiziente MEF, die lediglich mit dem Expressionsvektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren (b). Nach Methanolfixierung wurden die Zellen sukzessive mit Primärantikörper gegen Cathepsin D (monoklonaler IgG Antikörper abc 75852 aus dem Kaninchen, 1:250 in 1% Milchpulver in PBS, abzentrifugiert) und gegen LAMP I (monoklonaler IgG Antikörper BD553792 aus der Ratte, gleiches Trägermedium) inkubiert. Als Sekundärantikörper zur Fluoreszenzmarkierung dienten der Alexa Fluor 546-Antikörper gegen Antikörper aus Kaninchen bzw. der Alexa Fluor 488-Antikörper gegen Antikörper aus der Ratte (je 1:2000 in o. g. Trägermedium). Zellkerne mit DAPI gefärbt. Maßstäbe entsprechen 10 µm. Nummerierungen geben den jeweils ausgewählten Klon an.

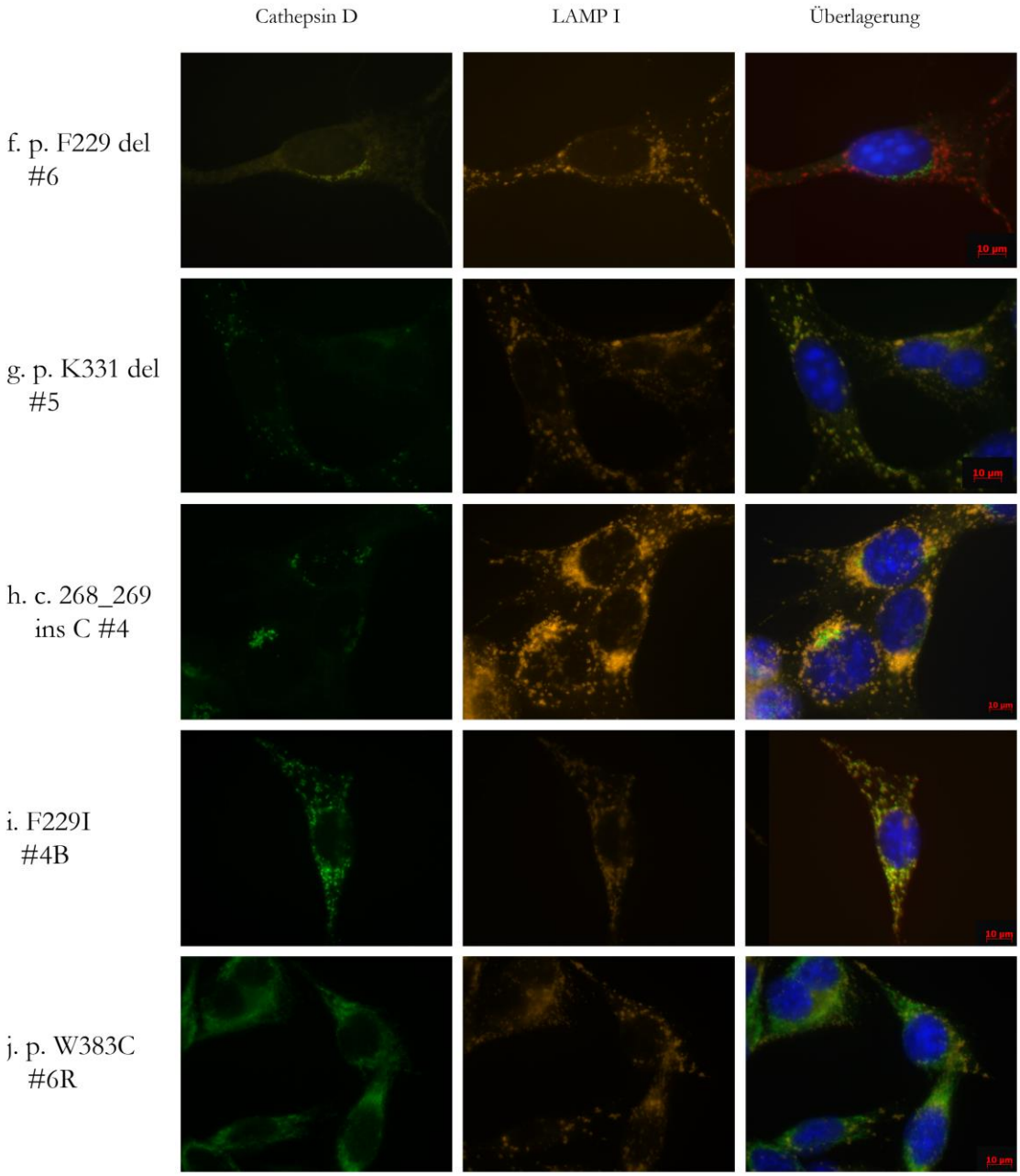


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie der unter (f)-(j) genannten Cathepsin D-Mutanten. Als Kontrolle dienten Cathepsin D-defiziente MEF, die lediglich mit dem Expressionsvektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren (Abbildung 5 (b)). Nach Methanolfixierung wurden die Zellen sukzessive mit Primärantikörper gegen Cathepsin D (monoklonaler IgG Antikörper abc 75852 aus dem Kaninchen, 1:250 in 1% Milchpulver in PBS, abzentrifugiert) und gegen LAMP I (monoklonaler IgG Antikörper BD553792 aus der Ratte, gleiches Medium) inkubiert. Als Sekundärantikörper zur Fluoreszenzmarkierung dienten der Alexa Fluor 546-Antikörper gegen Antikörper aus Kaninchen bzw. der Alexa Fluor 488-Antikörper gegen Antikörper aus der Ratte (je 1:2000 in o. g. Trägermedium). Zellkerne mit DAPI gefärbt. Maßstäbe entsprechen 10 µm. Nummerierungen geben den jeweils ausgewählten Klon an.

3.2 Autophagiedynamik in den Cathepsin D-Wildtyp- und Mutanten-exprimierenden MEF nach Transduktion mit mCherry-GFP-LC3

Zur Untersuchung der autophagozytotischen Flussdynamik wurden MEF, die stabil Cathepsin D-Wildtyp bzw. die verschiedenen Mutanten exprimierten, mit einem lentiviralen Transduktionssystem zur Expression von mCherry-GFP-LC3 transduziert. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden unter Selektionsdruck mit Puromycin selektioniert. Zur Induktion der zellulären Autophagie wurden die stabil transduzierten MEF in Tierserum-freiem Medium (Earle-Salze, EBSS) unter Nährstoffdeprivation kultiviert. Zur Untersuchung der Rückbildungsdynamik vorhandener Autophagolysosomen erfolgte im Anschluss eine Rekonvaleszenzphase mit Kultivierung in serumhaltigem Standardkulturmedium (DMEM). Die behandelten MEF wurden nach den entsprechenden Behandlungszeiten mit gekühltem Methanol fixiert und nach Sichtung der Präparate repräsentative Zellen für die Quantifizierung der Autophagosomen- und Autophagolysosomenzahlen ausgewählt. Durch Fluoreszenzlöschung des von der GFP-Markierung erzeugten grünen Fluoreszenzsignals im sauren pH-Milieu der Lysosomen stellten sich Autophagosomen als gelbe und Autophagolysosomen als rote Fluoreszenzsignale dar. Die Quantifizierung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte unter Zuhilfenahme eines geeigneten Makros für das Programm ImageJ. Dieses ermöglichte eine automatisierte Erkennung des kolokalisierten gelben Fluoreszenzsignales im Fall der Autophagosomen bzw. des roten Fluoreszenzsignales im Fall der Autophagolysosomen. Die Quantifizierung erfolgte anschließend unter Normierung der ausgezählten autophagozytotischen Vesikel auf die in dem jeweiligen fluoreszenzmikroskopischen Bild gemessene Fläche des aufgenommenen Zellanschnittes.

3.2.1 Vergleich verschiedener Serumentzugs- und Rekonvaleszenzzeiten zur Behandlung der mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF

Zur Bestimmung des Effektes des Serumentzuges durch Kultivierung in EBSS auf die mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF wurden verschiedene Kultivierungszeiten und Rekonvaleszenzzeiten miteinander verglichen. Es wurden mit doppelt fluoreszentem LC3 transduzierte MEF verwandt, die mit dem Cathepsin D-Wildtyp stabil transfiziert worden waren. Als Kontrolle dienten Cathepsin D-defiziente MEF, bei denen eine Transfektion mit dem Vektor pEF3-zeo ohne ein für Cathepsin D codierendes Insert erfolgt war. Es wurden zwei unterschiedliche Kultivierungszeiten in EBSS (1,5h und 3h) sowie zwei unterschiedliche Rekonvaleszenzzeiten in serumhaltigem Medium (1h und 2h in DMEM nach vorheriger Kultivierung in EBSS für 3h) gewählt. Als Vergleich dienten MEF, die nicht in EBSS kultiviert wurden, um das Niveau einer basal vorhandenen Anzahl an autophagozytotischen Vesikeln ohne Induktion durch Nährstoffdeprivation bestimmen zu können. Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte unter Zuhilfenahme eines

geeigneten Makros für ImageJ. Pro Behandlungszustand wurden jeweils 10 Zellen der mit dem Wildtyp bzw. dem Leervektor transfizierten MEF ausgewertet.

Aufgrund der Beteiligung von Cathepsin D an der intralysosomalen Degradation des Autophagolysosomeninhaltes wurde insbesondere die Anzahl der Autophagolysosomen im Rahmen dieser Arbeit betrachtet. Bereits ohne Nährstoffentzug durch Kultivierung in EBSS stellte sich die Anzahl der roten Fluoreszenzsignale pro Fläche – in dem Versuch den Autophagolysosomen pro Fläche entsprechend – im Fall der Leervektor transfizierten Zellen höher dar. Während der Median für die mit dem Cathepsin D-Wildtyp transfizierten MEF bei 0 Signalen/μm^2 lag, zeigte sich für die mit dem Leervektor transfizierten Zellen ein Median von 0,016 roten Fluoreszenzsignalen/μm^2. Nach Kultivierung in EBSS für 1,5h war sowohl für die Cathepsin D-Wildtyp als auch für die Leervektor transfizierten Cathepsin D-defizienten MEF ein Anstieg der roten Fluoreszenzsignale zu verzeichnen. Diese Tendenz setzte sich nach weiteren 1,5h Serumentzug nur im Fall der Leervektor-transfizierten MEF fort. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg auf einen maximalen Medianwert in Höhe von 0,026 roten Fluoreszenzsignalen/μm^2 nach 3h Kultivierung in EBSS. Für die mit dem Cathepsin D-Wildtyp transfizierten MEF war im Vergleich zur anderthalbstündigen Kultivierung in EBSS nach 3h ein Rückgang der roten Fluoreszenzsignale zu verzeichnen. Eine erneute Kultivierung in tierserumhaltigem DMEM führte im Fall der Cathepsin D-Wildtyp transfizierten MEF nach ein- bzw. zweistündiger Rekonvaleszenz zu unter Betrachtung des Medians stagnierenden Autophagolysosomenzahlen (0,008 rote Fluoreszenzsignalen/μm^2). Die Leervektor transfizierten Zellen wiesen einen Rückgang der Autophagolysosomenzahlen auf im Median 0,01 rote Fluoreszenzsignale/μm^2 nach zweistündiger Kultivierung in DMEM gegenüber dem maximalen Medianwert nach dreistündiger Kultivierung in EBSS auf. Da der größte Effekt des Serumentzuges für die Leervektor transfizierten MEF, gemessen als maximaler Medianwert der Anzahl an Autophagolysosomen, nach dreistündiger Kultivierung in EBSS auftrat, wurde diese Expositionszeit für weitere Untersuchungen mit den Cathepsin D-Wildtyp und den Cathepsin D-Mutanten stabil exprimierenden MEF gewählt.

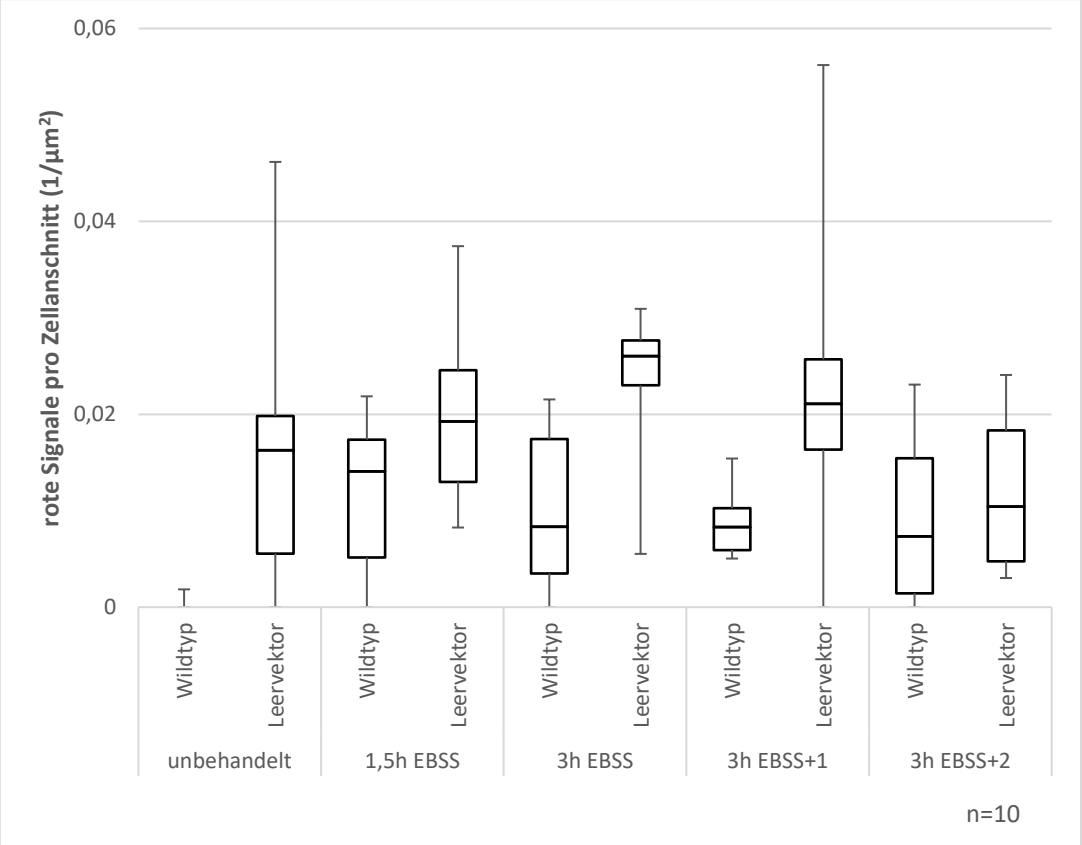


Abbildung 8: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF zu verschiedenen Serumentzugs- und Rekonvaleszenzzeiten. Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF, die mit dem Cathepsin D-Wildtyp bzw. dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren. Rote Fluoreszenzsignale entsprechen Autophagolysosomen. Verschiedene Kultivierungszeiten in EBSS und Rekonvaleszenzzeiten in Tierserum-haltigem Medium untersucht (ein- bzw. zweistündige Rekonvaleszenz in DMEM mit „+1“ bzw. „+2“ markiert). Je 10 Zellen wurden unter Normierung auf die Fläche des im mikroskopischen Bild aufgenommenen Zellanschnittes [μm^2] ausgewertet. In der Boxplotdarstellung entsprechen die untere bzw. obere Boxgrenze dem ersten bzw. dem dritten Quartil der Daten; die Markierung zwischen den Boxgrenzen entspricht dem Median. Antennen kennzeichnen die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte.

3.2.2 mCherry-GFP-LC3 als funktionelles Konstrukt zur Untersuchung der Autophagiedynamik in den transfizierten MEF

Zur Überprüfung, ob mCherry-GFP-LC3 ein funktionelles Konstrukt zur Untersuchung der Autophagiedynamik in den die verschiedenen Cathepsin D-Mutanten stabil exprimierenden MEF darstellt, wurde eine Behandlung mit Bafilomycin A1 bei gleichzeitiger Autophagieinduktion durch Kultivierung in EBSS durchgeführt. Bafilomycin A1 unterbricht den autophagozytotischen Fluss durch Inhibition der Fusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen. Dabei wurde für die Wirkweise von Bafilomycin A1 beschrieben, dass es

durch Inhibition lysosomaler ATPasen vom V-Typ die lysosomale Ansäuerung unterbindet. Ebenso nimmt es Einfluss auf die Vesikelfusion zwischen Autophagosomen und Lysosomen durch Inhibition einer Calcium-transportierenden ATPase am endoplasmatischen Retikulum (Mauvezin und Neufeld 2015). Parallel zu einer dreistündigen Kultivierung in EBSS wurden mCherry-GFP-LC3 transduzierte Cathepsin D-defiziente MEF, die zuvor mit dem Cathepsin D-Wildtyp oder den verschiedenen Cathepsin D-Mutanten transfiziert worden waren, einer Bafilomycin A1-Konzentration von 100 nM ausgesetzt. Als Kontrolle dienten mit dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfizierte MEF. Es wurden 20 Zellen pro Cathepsin D-Mutante bzw. mit dem Cathepsin D-Wildtyp oder dem Leervektor transfizierten MEF ausgewertet.

Unter Behandlung mit Bafilomycin A1 in einer Konzentration von 100 nM zeigten sich niedrige Anzahlen roter Fluoreszenzsignale pro Zellfläche. Mehrheitlich zeigten die Cathepsin D-Mutanten unter Betrachtung des Medians keine roten Fluoreszenzsignale. Dem gegenüber ließen sich gelbe Fluoreszenzsignale, Autophagosomen entsprechend, weiterhin nachweisen (Daten in Abbildung 9 nicht enthalten). In mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF, die Cathepsin D-Mutanten stabil exprimieren, stellt die doppelte, fluoreszente Markierung von LC3 somit ein funktionelles Konstrukt zur Untersuchung der Autophagiedynamik dar. Eine Differenzierung zwischen Autophagosomen und Autophagolysosomen anhand des emittierten Spektrums der Fluoreszenzmarkierung von LC3 ist in diesem heterologen Expressionsmodell folglich möglich.

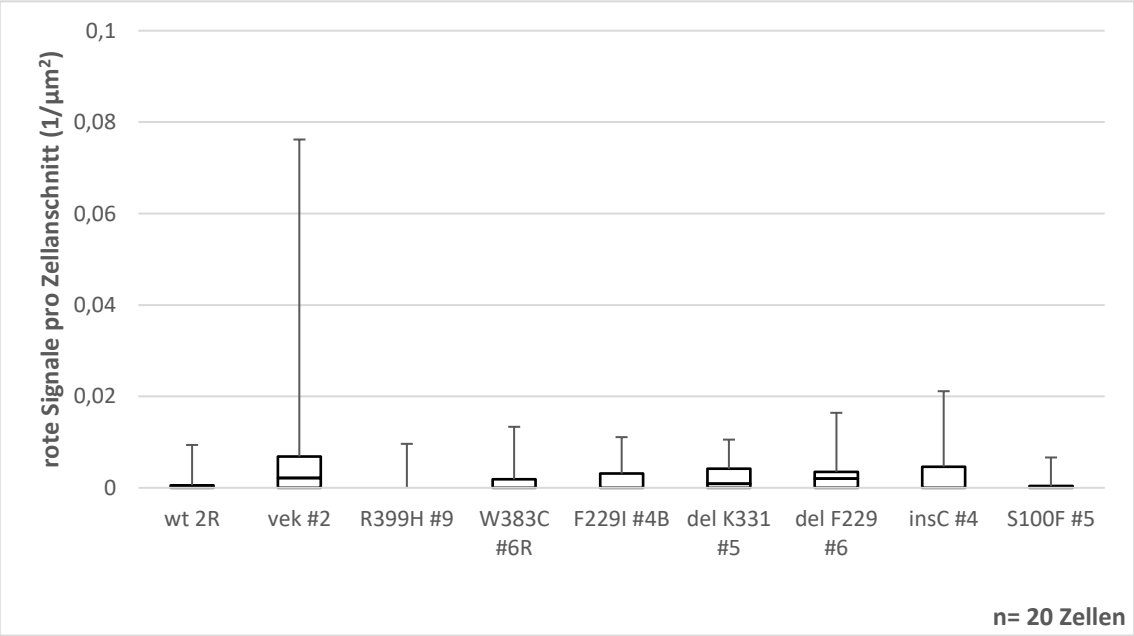


Abbildung 9: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF nach dreistündiger Kultivierung in serumfreiem Medium (EBSS) mit Bafilomycin A1. Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF, die mit dem Cathepsin D-Wildtyp, der angegebenen Cathepsin D-Mutante bzw. dem Vektor pEF3-zeo ohne

codierendes Insert transfiziert worden waren. Rote Fluoreszenzsignale entsprechen Autophagolysosomen. MEF wurden für 3h in tierserumfreiem Medium (EBSS) unter Zugabe von Bafilomycin A1 in einer Konzentration von 100 nM kultiviert. Jeweils 20 Zellen wurden unter Normierung auf die Fläche des im mikroskopischen Bild aufgenommenen Zellanschnittes [μm^2] ausgewertet. Die untere bzw. obere Boxgrenze kennzeichnen das erste bzw. dritte Quartil der Daten; die Markierung zwischen den Boxgrenzen entspricht dem Median. Antennen kennzeichnen die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte.

3.2.3 Autophagolysosomendynamik in mCherry-GFP-LC3 transduzierten Cathepsin D-Wildtyp und -Mutanten stabil exprimierenden MEF

Primär Cathepsin D-defiziente MEF, die nach Transfektion den Cathepsin D-Wildtyp oder die verschiedenen Cathepsin D-Mutanten stabil exprimierten, wurden hinsichtlich der Dynamik der Autophagolysosomenanzahl unter Nährstoffentzug und der Rückbildung der Autophagolysosomen nach erneuter Kultivierung in serumhaltigem Medium untersucht. Mit mCherry-GFP-LC3 transduzierte MEF, die heterolog den Cathepsin D-Wildtyp oder eine der untersuchten Cathepsin D-Mutanten exprimierten, wurden für einen Zeitraum von 3h in serumfreiem Medium (EBSS) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 1h in serumhaltigem Medium (DMEM) kultiviert, um mögliche Unterschiede in der Autophagolysosomenrückbildung zwischen dem Cathepsin D-Wildtyp und den untersuchten Cathepsin D-Mutanten festzustellen. Die Induktion von Autophagie mit einem einhergehenden Anstieg der Anzahl an Autophagolysosomen wurde durch Vergleich mit MEF, die nicht in serumfreiem Medium kultiviert wurden, überprüft. Als Negativkontrolle dienten mCherry-GFP-LC3 transduzierte MEF, die mit dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren. Pro Zustand wurden 20 repräsentative Zellen ausgewertet.

3.2.3.1 Basale Anzahl an Autophagolysosomen in mCherry-GFP-LC3 transduzierten Cathepsin D-Wildtyp bzw. -Mutanten exprimierenden MEF

Zur Bestimmung einer basal vorhandenen Anzahl an Autophagolysosomen wurde die Anzahl roter Fluoreszenzsignale pro Zellfläche in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF unter Basalbedingungen ohne Kultivierung in EBSS mit dem damit einhergehendem Nährstoffentzug untersucht. Hierbei zeigten die den Cathepsin D-Wildtyp heterolog exprimierenden MEF die niedrigsten Autophagolysosomenanzahlen mit im Median nicht nachweisbaren roten Fluoreszenzsignalen. Ebenso lag im Fall der p.K331del- und der p.F229del-Mutante der Median der auf die Fläche bezogenen Anzahl an Autophagolysosomen bei 0 roten Fluoreszenzsignalen/μm^2. Unter diesen basalen, nährstoffreichen Bedingungen mit Kultivierung in DMEM fanden sich hingegen die höchsten Autophagolysosomenanzahlen im Median bei den Leervektor transfizierten Cathepsin D-defizienten MEF sowie bei den Mutanten p.F229I und p.S100F. Der Median der Anzahl der roten Fluoreszenzsignale pro Fläche lag bei 0,25 Fluoreszenzsignalen/μm^2

für die p.F229I-Mutante bzw. bei 0,255 Fluoreszenzsignalen/μm^2 für die p.S100F-Mutante. Dabei stellt die p.S100F-Mutante eine katalytisch inaktive Cathepsin D-Mutante dar, während die Mutation p.F229I eine katalytische Restaktivität von ca. 29% des Wildtypproteins zeigt.

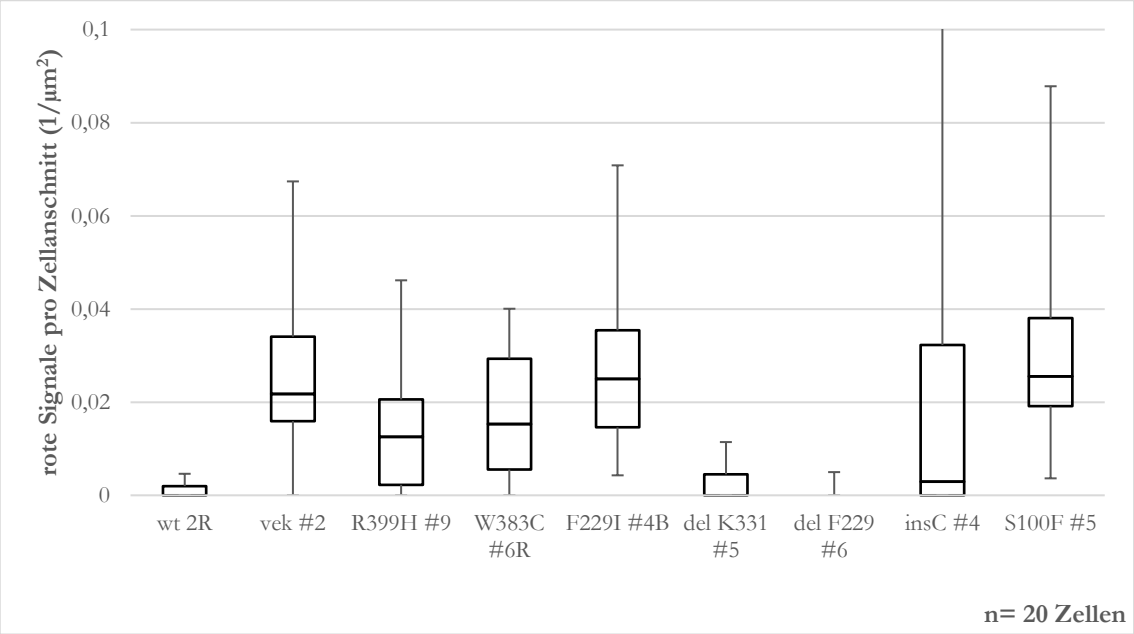


Abbildung 10: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF unter Basalbedingungen (Kultivierung in DMEM). Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF, die mit dem Cathepsin D-Wildtyp, der angegebenen Cathepsin D-Mutante bzw. dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren. Rote Fluoreszenzsignale entsprechen Autophagolysosomen. Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Kultivierung in serumhaltigem DMEM. Jeweils 20 Zellen wurden unter Normierung auf die Fläche des im mikroskopischen Bild aufgenommenen Zellanschnittes [μm^2] ausgewertet. Die untere bzw. obere Boxgrenze kennzeichnen das erste bzw. dritte Quartil der Daten; die Markierung zwischen den Boxgrenzen entspricht dem Median. Antennen kennzeichnen die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte.

3.2.3.2 Autophagolysosomenanzahlen in mCherry-GFP-LC3 transduzierten Cathepsin D-Wildtyp bzw. -Mutanten exprimierenden MEF nach Kultivierung in EBSS (3h)

Zur Induktion von Autophagie durch Nährstoffentzug wurden die mCherry-GFP-LC3 transduzierten, Cathepsin D-Mutanten bzw. -Wildtyp exprimierenden MEF 3h in serumfreiem Medium (EBSS) kultiviert.

Für alle untersuchten Cathepsin D-Mutanten (mit Ausnahme der Mutante p.S100F), die Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden Zellen und die mit dem Leervektor transfizierten MEF zeigte sich unter Vergleich der Mediane ein Anstieg der Autophagolysosomenanzahlen

gegenüber dem Ausgangszustand ohne Kultivierung in EBSS. Unter Betrachtung der Mediane wiesen die Leervektor transfizierten MEF (0,027 rote Fluoreszenzsignale/μm^2), die Cathepsin D-Mutante p.R399H (0,027 rote Fluoreszenzsignale/μm^2) und die Mutante p.K331del (0,034 rote Fluoreszenzsignale/μm^2) die höchsten Autophagolysosomenanzahlen auf. Die Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF zeigten im Median die niedrigste Autophagolysosomenanzahl (0,017 rote Fluoreszenzsignale/μm^2). Die Mediane der Autophagolysosomenanzahl der anderen betrachteten Mutanten lagen zwischen dem niedrigsten gemessenen Medianwert der Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF und dem Median der Leervektor transfizierten MEF.

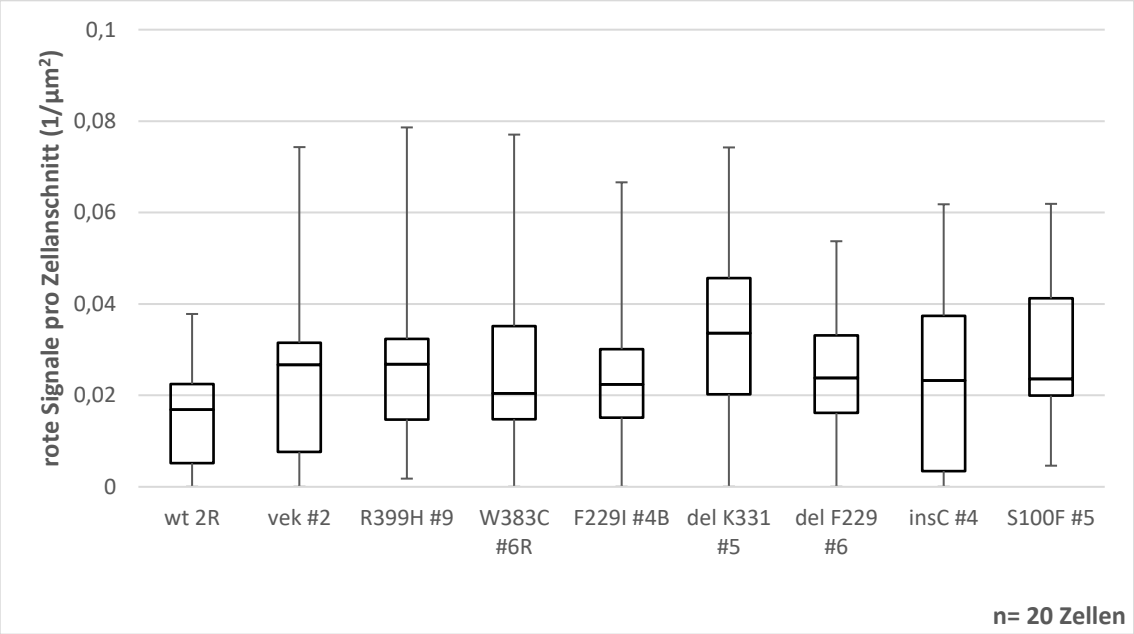


Abbildung 11: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF nach Kultivierung in EBSS für 3 h. Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF, die mit dem Cathepsin D-Wildtyp, der angegebenen Cathepsin D-Mutante bzw. dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren. Rote Fluoreszenzsignale entsprechen Autophagolysosomen. Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Kultivierung in EBSS für 3h. Jeweils 20 Zellen wurden unter Normierung auf die Fläche des im mikroskopischen Bild aufgenommenen Zellanschnittes [μm^2] ausgewertet. Die untere bzw. obere Boxgrenze kennzeichnen das erste bzw. dritte Quartil der Daten; die Markierung zwischen den Boxgrenzen entspricht dem Median. Antennen kennzeichnen die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte.

3.2.3.3 Autophagolysosomenanzahlen in mCherry-GFP-LC3 transduzierten Cathepsin D-Wildtyp bzw. -Mutanten exprimierenden MEF nach Kultivierung in EBSS (3h) gefolgt von Rekonvaleszenz in DMEM

Zur Untersuchung der Rückbildungsdynamik nach dreistündiger Kultivierung in EBSS vorhandener Autophagolysosomen wurden die MEF im Anschluss für eine weitere Stunde in DMEM kultiviert.

Mit Ausnahme der p.F229I-Mutante war für alle Cathepsin D-Mutanten unter Betrachtung der Mediane nach einstündiger Kultivierung in DMEM ein Rückgang der Autophagolysosomenanzahlen zu verzeichnen. Nach einstündiger Kultivierung in dem serumhaltigen Medium waren mit im Median 0,025 roten Fluoreszenzsignalen/μm^2 die höchsten Autophagolysosomenanzahlen bei den Leervektor transfizierten Cathepsin D-defizienten MEF nachweisbar. Unter Betrachtung des Medians zeigten die den Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF die niedrigsten Autophagolysosomenanzahlen (0,013 rote Fluoreszenzsignale/μm^2). Die Mediane aller untersuchten Mutanten, ausgenommen der p.F229I-Mutante, lagen zwischen dem, nach einstündiger Rekultivierung in serumhaltigem Medium gemessenen, höchsten Median der Leervektor transfizierten Zellen und dem niedrigsten Median der Cathepsin D Wildtyp-exprimierenden MEF. Im Vergleich zum Median der Autophagolysosomenanzahlen nach dreistündiger Kultivierung in EBSS zeigten die Cathepsin D-Wildtyp transfizierten Zellen einen deutlicheren Rückgang der roten Fluoreszenzsignale im Vergleich zu den Leervektor transfizierten Zellen. Während der Median im Fall der Cathepsin D-Wildtyp transfizierten Zellen nach einstündiger Rekultivierung in DMEM um 0,0035 rote Fluoreszenzsignale/μm^2 sank, verringerte sich der Median der Leervektor-transfizierten Zellen in der gleichen Zeit lediglich um 0,0021 rote Fluoreszenzsignale/μm^2.

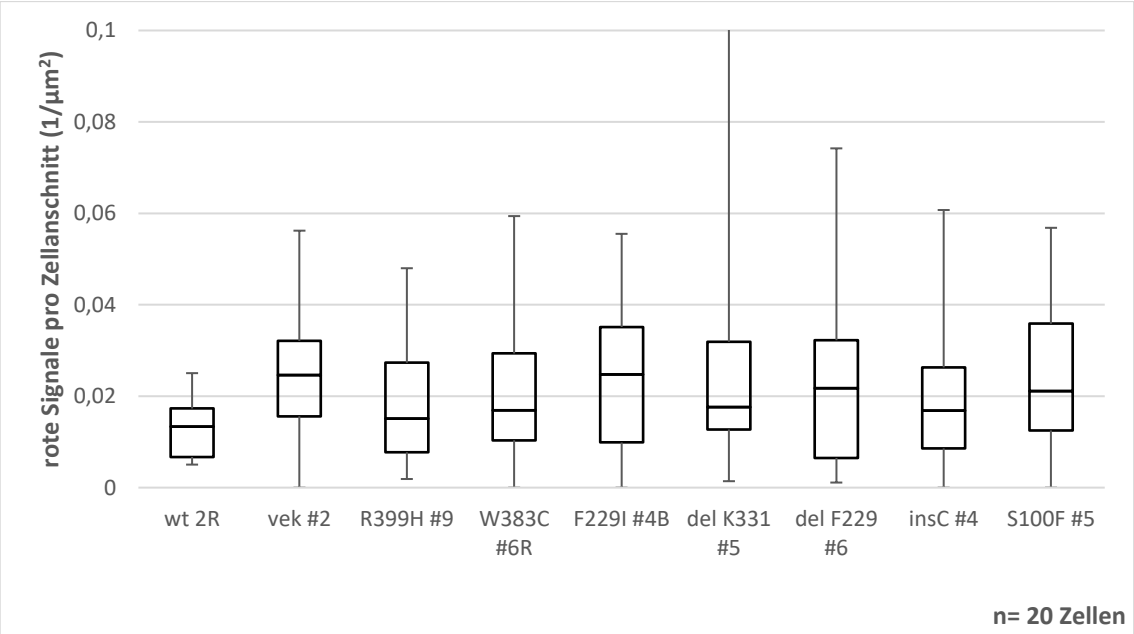


Abbildung 12: Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF nach Kultivierung in EBSS für 3 h und anschließender Kultivierung in DMEM für 1h. Rote Fluoreszenzsignale in mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF, die mit dem Cathepsin D-Wildtyp, der angegebenen Cathepsin D-Mutante bzw. dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfiziert worden waren. Rote Fluoreszenzsignale entsprechen Autophagolysosomen. Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Kultivierung in EBSS für 3h gefolgt von Kultivierung in DMEM für 1h. Jeweils 20 Zellen wurden unter Normierung auf die Fläche des im mikroskopischen Bild aufgenommenen Zellanschnittes [μm^2] ausgewertet. Die untere bzw. obere Boxgrenze kennzeichnen das erste bzw. dritte Quartil der Daten; die Markierung zwischen den Boxgrenzen entspricht dem Median. Antennen kennzeichnen die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte.

4 Diskussion

4.1 Proteinstrukturelle Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Enzymaktivitätsniveaus der untersuchten Cathepsin D-Mutanten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für die untersuchten Mutanten verschiedene enzymatische Restaktivitätsniveaus im Vergleich zum Cathepsin D-Wildtyp in stabil transfizierten MEF bestimmt.

Hierbei zeigten sich für die Mutanten p.K331 del, p.G149V und p.F229I die höchsten Restaktivitäten mit jeweils ca. 61%, ca. 38% und ca. 29% im Vergleich zu mit dem Cathepsin D-Wildtyp transfizierten MEF. Die heterolog exprimierten Mutanten p.F229del, p.R399H, p.S100F, c.insC268_269 sowie p.W383C zeigten geringfügige bis keine Restaktivitäten verglichen mit dem Cathepsin D-Wildtyp. Die Aktivitätsniveaus dieser Mutanten lagen auf dem Niveau der mit dem Vektor ohne codierendes Insert transfizierten MEF und entsprachen somit einer gemessenen Hintergrundaktivität.

4.1.1 Auswirkung der p.F229I-Mutation auf pH-abhängige Konformitätsänderungen von Cathepsin D

Für die p.F229I-Mutante stimmte die gemessene Restaktivität näherungsweise mit der zuvor in MEF und Patientenfibroblasten beschriebenen Restaktivität für diese Mutante überein (Steinfeld et al. 2006). Ebenso konnte für diese Mutante, wie bereits zuvor, im hier vorliegenden heterologen Expressionssystem in Cathepsin D-defizienten MEF die reife Enzymform im Western Blot nachgewiesen werden. Die korrekte Prozessierung dieser Mutante bestätigte sich auch in einem anderen heterologen Expressionssystem in Neuroblastomzellen (Bunk et al. 2021). Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen und den anderenorts in 3T3-Zellen durchgeführten Fluoreszenzmikroskopien (Steinfeld et al. 2006) fand sich bei heterologer Expression in Neuroblastomzellen (Bunk et al. 2021) nur eine partielle Kolokalisation lysosomaler Marker mit dem mutanten Cathepsin D für die p.F229I-Mutation. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in den unterschiedlichen Expressionssystemen. Während Bunk et al. einen Expressionsvektor unter Kontrolle eines Zytomegalievirus-Promotors (pCMV6), der eine mehrfache Integration in das Genom der Zielzelle erlaubt und daher in der Regel zu einer deutlichen Überexpression führt, verwendeten, nutzten Steinfeld et al. den Vektor pEF5/FRT/V5-DTOPO, der nur zu einer singulären Integration in Flip-in 3T3-Zellen führt. Des Weiteren bewirkt der Zytomegalievirus-Promotor meistens eine höhere Expression als der Elongations-Faktor alpha im pEF5-Vektor. Da Steinfeld et al. eine verzögerte Prozessierung für die Mutante p.F229I nachweisen konnten (Steinfeld et al. 2006, Abb. 1D), erklärt sich die partielle lysosomale Lokalisation bei Bunk et al. durch die starke Überexpression der Mutante p.F229I in den Neuroblastomzellen.

In einer computergestützten Vorhersage der Enzymkonformität für diese Mutante wurde eine mögliche Rolle in der Destabilisierung des zwischen der N- und C-terminalen Proteindomäne gelegenen Interdomänenbereichs beschrieben (Steinfeld et al. 2006). Für den Interdomänenbereich konnte eine Rolle in der pH-abhängigen Aktivierung von Cathepsin D gezeigt werden. Die erste beta-Faltblattstruktur dieses Bereichs blockiert bei hohen pH-Werten das aktive Zentrum von Cathepsin D, wobei durch einen Lysinrest eine Reduktion der elektronegativen Abstoßung zwischen den Aspartatresten des aktiven Zentrums erzielt wird (Lee et al. 1998). Wie bereits beschrieben, könnte die hier gemessene Aktivitätsreduktion der p.F229I-Mutante auf ca. 29% der Wildtypaktivität unter anderem durch die Lokalisation dieser Mutation innerhalb der dritten beta-Faltblattstruktur des Interdomänenbereichs mit einer damit einhergehenden Veränderung des pH-abhängigen Substratbindungsprozesses von Cathepsin D bedingt sein (Steinfeld et al. 2006).

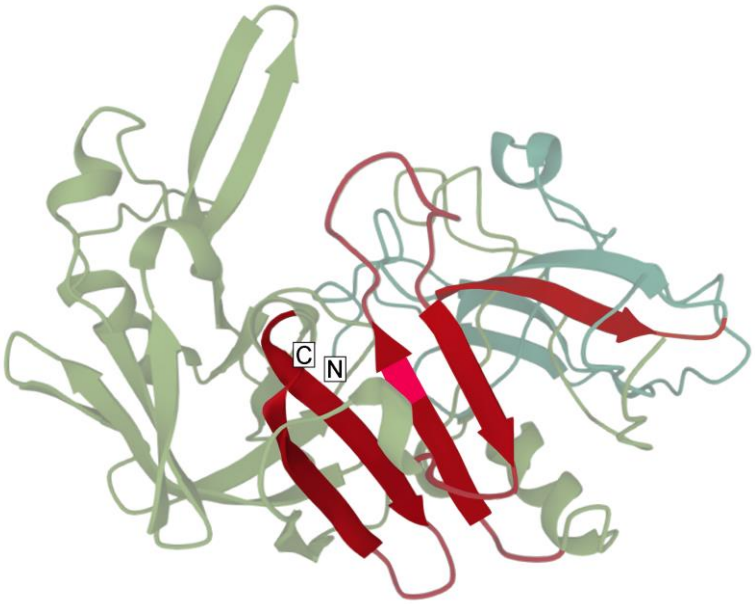


Abbildung 13: Lage der p.F229I-Mutation innerhalb Cathepsin D. Interdomänenbereich mit beta-Faltblattstrukturen rot dargestellt, magentarot Lage der p.F229I-Mutation innerhalb der dritten Beta-Faltblattstruktur, Aminoterminus mit „N“, Carboxyterminus mit „C“ markiert.

4.1.2 Kompletter Aktivitätsverlust der p.F229del-Mutante

Während sich im Fall der p.F229I-Mutante eine deutliche Aktivitätsminderung gegenüber dem Wildtyp zeigte, konnte im Fall der p.F229del-Mutante in der vorliegenden Arbeit keine Cathepsin D-Enzymaktivität gemessen werden. Bei dem Phenylalaninrest 229 handelt es sich um einen phylogenetisch hochkonservierten Aminosäurerest von Cathepsin D (Steinfeld et al. 2006). Als Teil der Familie der Aspartatproteasen zeigt Cathepsin D eine hohe Strukturhomogenität mit anderen Enzymen dieser Familie, wie zum Beispiel Pepsin oder Renin (Baranski et al. 1990; Davies 1990; Steinfeld et al. 2006). In allen diesen Enzymen ist der entsprechende Phenylalaninrest konserviert. Insofern scheint die komplette Deletion

dieses strukturkritischen Aminosäurerestes im Vergleich zu einer Missense-Mutation mit Substitution gegen einen anderen - obgleich strukturell unterschiedlichen - Aminosäurerest wie im Fall der p.F229I-Mutation schwerwiegendere Konformitätsänderungen des Enzyms zur Folge zu haben.

Entsprechend konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass sich die p.F229del-Mutante in einem heterologen Expressionssystem in MEF im Western Blot nicht nachweisen lässt. Ferner zeigte sich auch keine Kolokalisation dieser Cathepsin D-Mutante mit LAMP I in der Fluoreszenzmikroskopie. Als diese Mutation erstmalig als krankheitsauslösend beschrieben wurde, konnte in Patientenfibroblasten die reife Form proteinbiochemisch ebenso nicht nachgewiesen werden (Varvagiannis et al. 2018).

4.1.3 Auswirkungen der p.G149V-Mutation auf den Substratbindungsprozess von Cathepsin D

Für Cathepsin D ist eine mobile, aus einer beta-Kehre bestehende Proteindomäne im Bereich der Aminosäurereste 136-151 beschrieben, die nach Substrat- bzw. Inhibitorbindung ähnlich wie in anderen Aspartatproteasen eine Konformitätsänderung mit Bewegung in Richtung des gebundenen Substrates bzw. Inhibitors vollzieht (Baldwin et al. 1993). Nach Inhibitor- bzw. Substratbindung gehen die Aminosäurereste Glycin 143 und Serin 144 am Scheitelpunkt dieser mobilen beta-Kehrendomäne Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat oder Inhibitor ein, wodurch es zu einer Stabilisierung gegenüber Cathepsin D ohne gebundenem Substrat oder Inhibitor kommt (Baldwin et al. 1993; Metcalf und Fusek 1993; Arodola und Soliman 2016). Die untersuchte Mutation p.G149V liegt im Bereich der mobilen beta-Kehrenregion und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Phenylalaninrest (F136) innerhalb der Kehre aus. Die hier beobachtete reduzierte Aktivität der p.G149V-Mutante auf ca. 38% gegenüber dem Cathepsin D-Wildtyp könnte somit aus einer verminderten Stabilisierung der Substrat-bindenden Form der Cathepsin D-Mutante durch eine Konformitätsänderung dieser mobilen beta-Kehre resultieren.

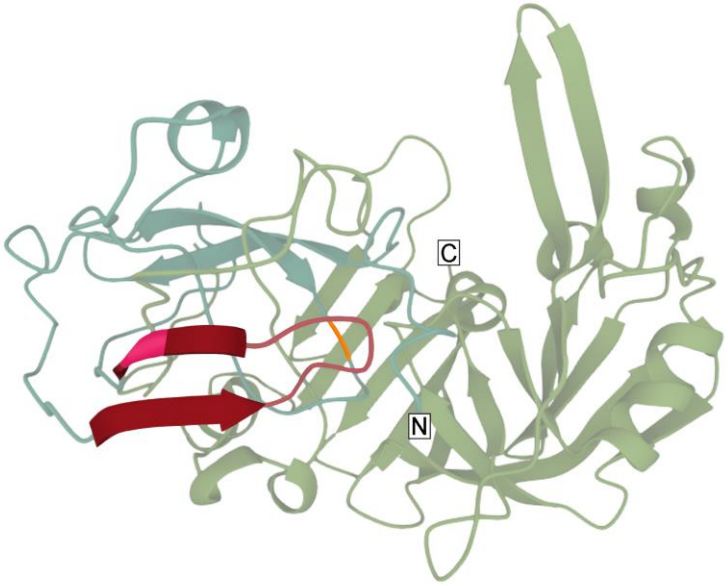


Abbildung 14: Lage der p.G149V-Mutation innerhalb Cathepsin D. Mobile „Flap"-Region rot dargestellt, magentarot Lage der p.G149V-Mutation innerhalb der Kehre. Katalytisches Aspartat orange, Aminoterminus mit „N", Carboxyterminus mit „C" markiert.

In dieser Arbeit wurde in einem Expressionssystem in MEF im Western Blot eine Prozessierung der p.G149V-Mutante in die reife Cathepsin D-Form gezeigt. Dieser Befund weicht von einer Überexpressionsstudie in einer Neuroblastomzelllinie ab, in der für die p.G149V-Mutation kein reifes Cathepsin D detektiert werden konnte (Bunk et al. 2021). Zuvor wurde die Mutation lediglich in einem Fallbericht mehrerer phänotypisch an einer neuronalen Ceroidlipofuszinose erkrankter Familienmitglieder als auslösende Mutation beschrieben und ihr reduziertes Aktivitätsniveau gegenüber dem Cathepsin D-Wildtyp festgestellt (Hersheson et al. 2014). Interessanterweise korrelierte die gegenüber anderen Cathepsin D-Mutationen höhere Restaktivität der Mutante in diesem Fall mit einem lebenszeitlich späteren Auftreten des neuronalen Phänotyps der Erkrankten im Jugendalter (Hersheson et al. 2014). Bei der hier im Vergleich mit den anderen Mutanten zweithöchsten Cathepsin D-Restaktivität erscheint plausibel, dass die Mutante im hier gewählten Expressionssystem nicht nur in die reife Enzymform prozessiert wird, sondern auch fluoreszenzmikroskopisch mit LAMP I kolokalisiert. Die Ursache für eine abweichend zu den hier vorliegenden Ergebnissen von Bunk et al. beschriebene fehlende Umwandlung der p.G149V-Mutante in die reife Cathepsin D-Form und eine fehlende lysosomale Kolokalisation der Mutante könnte in der Verwendung unterschiedlicher Expressionssyteme liegen (Bunk et al. 2021). Interessanterweise zeigte sich bei Bunk et al. für die mit der Parkinson-Erkrankung assoziierte Mutante p.G145V eine ähnliche residuelle Enzymaktivität und lysosomale Lokalisation wie für die hier beschriebene Mutante p.G149V (Bunk et al. 2021). Da beide Mutationen in der zuvor beschriebenen mobilen beta-Kehrenregion

lokalisiert und hinsichtlich der jeweiligen Aminosäuren identische missense-Mutationen sind, könnten sich entsprechend ähnliche Auswirkungen auf die Enzymkonformität von Cathepsin D ergeben.

4.1.4 Lage der p.K331del-Mutation in einer für die intrazelluläre Lokalisation von Cathepsin D kritischen Domäne

Im Wesentlichen gelangt Cathepsin D Mannose-6-Phosphat-abhängig nach intralysosomal. Zur Phosphorylierung der Oligosaccharidseitenketten sowohl in der N- als auch in der C-terminalen Domäne von Cathepsin D ist ein Erkennungsmotiv für die N-Acetylglucosamin-1-Phosphatase (Phosphotransferase) auf der Proteinoberfläche von Cathepsin D erforderlich. Die Phosphotransferase katalysiert den ersten enzymatischen Schritt der Phosphorylierung endständiger Mannosereste von Oligosaccharidketten auf Cathepsin D. Über die exakte Beschaffenheit dieses erkennungsrelevanten Strukturmotivs besteht noch keine abschließende Klarheit. So konnten chimäre Proteine mit einem Proteinrückgrat aus Cathepsin D und der sekretierten, strukturverwandten Aspartatprotease Pepsinogen nur dann in die Lysosomen gelangen, wenn diese C-terminale Cathepsin D-Anteile enthielten (Baranski et al. 1990). In der Folge identifizierte die gleiche Arbeitsgruppe zwei minimale Erkennungssequenzen, die für die Erkennung durch die Phosphotransferase und damit für die Sortierung nach intralysosomal suffizient schienen. Dabei handelt es sich um die Aminosäurensequenzen 244-294 und 329-356, die zusammen einen Anteil von 15% an der Enzymoberfläche von Cathepsin D umfassen (Baranski et al. 1990). Der Lysinrest 331 ist Teil dieser Proteindomäne. Er liegt in einer helikalen Struktur, die sich unmittelbar an der Proteinoberfläche von Cathepsin D befindet. Insofern könnte eine reduzierte enzymatische Aktivität der Mutation p.K331del, wie sie in dieser Arbeit festgestellt wurde, durch eine verminderte Erkennung durch die Phosphotransferase bedingt sein. Dies könnte konsekutiv zu einer quantitativ geringeren intralysosomalen Lokalisation des mutanten Cathepsin D führen. Die Rolle oben genannter, C-terminaler Aminosäuresequenzen bei der Erkennung durch die Phosphotransferase wurde jedoch in Folgearbeiten relativiert. So zeigte sich einerseits eine gewisse Austauschbarkeit verschiedener enthaltener Lysinreste ohne nennenswerte Auswirkung auf die Erkennung durch die Phosphotransferase (Schorey et al. 1995). Andererseits wurde zusätzlich eine aminoterminale Aminosäuresequenz mit Relevanz für die Erkennung durch die Phosphotransferase gefunden (Cantor et al. 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich für die bisher noch nicht beschriebene Mutante p.K331del in einem heterologen Expressionssystem in MEF eine Prozessierung in die reife Form von Cathepsin D. Ebenso stellte sich in der hier durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie eine lysosomale Lokalisation der p.K331del-Mutante dar, was zumindest die Bedeutung dieses Aminosäurerestes in der C-terminalen Erkennungssequenz für die Erkennung durch die Phosphotransferase weiter einschränkt (Cantor et al. 1992; Schorey et al. 1995). Denkbar ist auch, dass die p.K331del-Mutante vermehrt Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-unabhängig nach intralysosomal gelangt (Rijnboutt et al. 1991). Eine

solche unabhängige Transportweise wurde für Cathepsin D beispielsweise durch Assoziation mit Prosaposin und Sortilin beschrieben (Zhu und Conner 1994; Canuel et al. 2008). Die beobachtete Aktivitätsminderung der p.K331del-Mutante bedarf - insbesondere hinsichtlich ihrer grundsätzlich mit dem Cathepsin D-Wildtyp vergleichbaren intrazellulären Prozessierung - weiterer Abklärung.

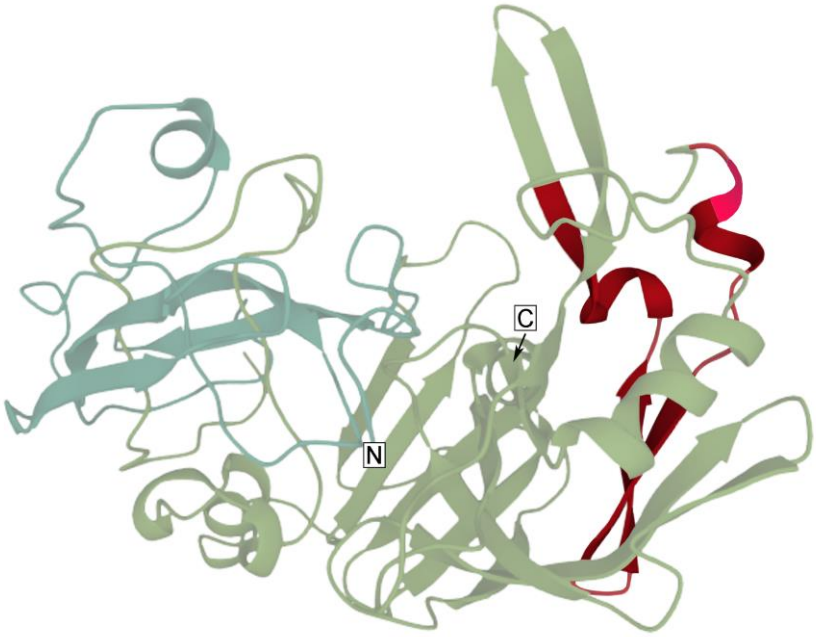


Abbildung 15: Lage der p.K331del-Mutation innerhalb Cathepsin D. Kritische Erkennungssequenz für die Phosphotransferase rot dargestellt, magentarot Lage der p.K331del-Mutation innerhalb der Sequenz. Aminoterminus mit „N“, Carboxyterminus mit „C“ markiert.

4.1.5 Interaktionspotenzial der p.R399H-Mutante mit pH-abhängigen Konformitätsänderungen von Cathepsin D

Der Argininrest an Position 399 der Cathepsin D-Aminosäuresequenz befindet sich ebenso wie der Phenylalaninrest 229 im Bereich der sekundärstrukturell von beta-Faltblattstrukturen bestimmten Interdomäne. Dabei befindet sich der Aminosäurerest im Gegensatz zum Phenylalaninrest 229 nicht im Bereich eines beta-Faltblattes, sondern in einer zwischen beta-Faltblättern gelegenen Verbindungssequenz. Wie für die Mutationen des Phenylalanins an Position 229 ist als Erklärung für den Aktivitätsverlust der p.R399H-Mutante gegenüber dem Cathepsin D-Wildtyp eine Konformitätsänderung denkbar, die den pH-abhängigen Aktivierungsprozess mit Entfernung des ersten beta-Faltblattes des Interdomänenbereiches aus dem aktiven Zentrum des mutanten Cathepsin D beeinträchtigt (Lee et al. 1998). Ein höherer Enzymaktivitätsverlust der Mutante p.R399H gegenüber der p.F229I-Mutanten erklärt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Fähigkeit der mutierten Aminosäurereste, Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen. Der aromatische Phenylalaninrest an Position 229 bildet keine Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen

Aminosäureresten im Interdomänenbereich aus. Dem gegenüber bildet der Argininrest 399 Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Aspartatrest (D216) in einer sterisch nahegelegenen alpha-Helix aus. Insofern könnte die Punktmutation von Arginin zu Histidin als einer aromatischen Aminosäure mit geringerem Potenzial zur Bildung von Wasserstoffbrückenbildungen eine deutliche strukturelle Veränderung des Interdomänenbereiches des mutanten Cathepsin D-Moleküls bedingen.

Passend zu dieser Annahme konnte in dieser Arbeit die p.R399H-Mutante zwar auf Proteinebene nachgewiesen werden, jedoch ausschließlich in der 53 kDa großen prepro-Form von Cathepsin D. Ebenso kolokalisierte die Mutante nicht mit LAMP I in der Fluoreszenzmikroskopie. Diese Befunde decken sich mit den Beobachtungen in einer Neuroblastomzelllinie (Bunk et al. 2021). Weitere Untersuchungen zum genauen subzellulären Verbleib der p.R399H-Mutante sind notwendig.

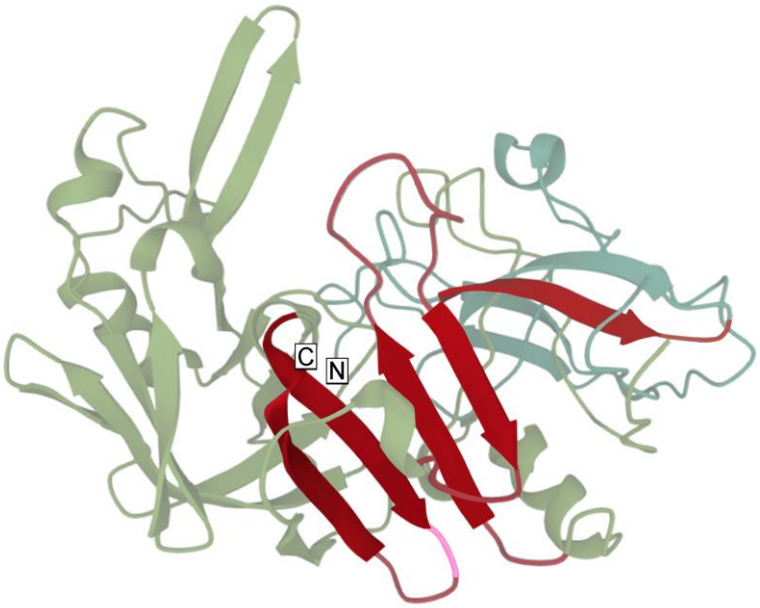


Abbildung 16: Lage der p.R399H-Mutation innerhalb Cathepsin D. Interdomänenbereich mit beta-Faltblattstrukturen rot dargestellt, magentarot Lage der p.R399H-Mutation innerhalb einer Verbindungssequenz zwischen zwei beta-Faltblättern. Aminoterminus mit „N“, Carboxyterminus mit „C“ markiert.

4.1.6 Kritische Lage der p.S100F-Mutation nahe dem aktiven Zentrum von Cathepsin D

Die Mutante p.S100F wies die geringste aller gemessenen Cathepsin D-Enzymaktivitäten auf. Dies könnte auf die Lokalisation der Mutation nahe dem aktiven Zentrum von Cathepsin D zurückzuführen sein. Wie bei anderen Aspartatproteasen liegt das aktive Zentrum von Cathepsin D zwischen der N- und der C-terminalen Domäne, wobei jede der Domänen ein katalytisch wirksames Aspartat (D97 und D295) zum aktiven Zentrum beiträgt (Metcalf und

Fusek 1993). Es erscheint plausibel, dass der Austausch eines Serin- gegen einen Phenylalaninrest, das heißt einer hydrophilen gegen eine hydrophobe Aminosäure, nahe der kritischen katalytischen Aspartatreste gravierende Auswirkungen auf die Cathepsin D-Aktivität hat. Dies ist auch ungeachtet der Tatsache nachvollziehbar, dass der Serinrest S100 trotz seiner Lage im aktiven Zentrum nicht unmittelbar Wasserstoffbrückenbindungen mit gebundenem Substrat, wie zum Beispiel dem Inhibitor Pepstatin A, eingeht (Baldwin et al. 1993; Metcalf und Fusek 1993). Für den Austausch der katalytischen Aspartatreste selbst wurden in vivo für das ovine Cathepsin D (Tyynelä et al. 2000) sowie in vitro für heterolog exprimiertes Cathepsin D (Partanen et al. 2003) erhebliche Aktivitätsverluste und Proteinkonformitätsveränderungen beschrieben.

Bezüglich der Prozessierung dieser Cathepsin D-Mutante decken sich die Beobachtungen dieser Arbeit mit jenen in einer Neuroblastomzelllinie: Interessanterweise wird die Mutante in die reife Cathepsin D-Enzymform prozessiert und kolokalisiert mit LAMP I, zeigt jedoch nahezu keine katalytische Aktivität (Bunk et al. 2021).

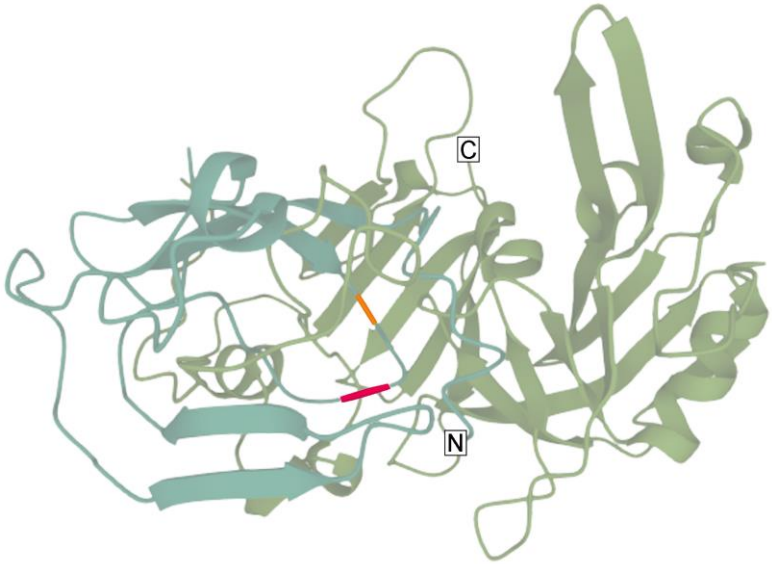


Abbildung 17: Lage der p.S100F-Mutation innerhalb Cathepsin D. Magentarot Lage der p.S100F-Mutation innerhalb der Kehre, katalytisches Aspartat orange. Aminoterminus mit „N“, Carboxyterminus mit „C“ markiert.

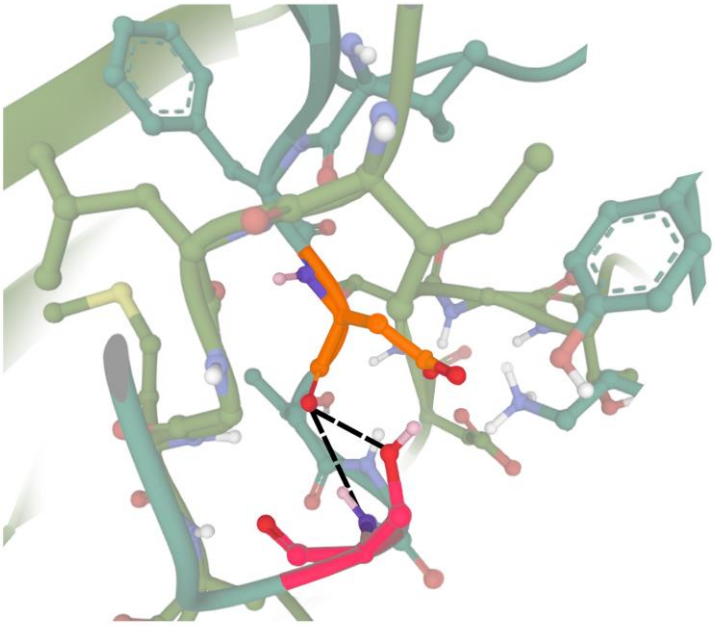


Abbildung 18: Detailansicht des aktiven Zentrums von Cathepsin D. Magentarot Serinrest S100, orange katalytisches Aspartat D97. Schwarze Verbindungsstriche stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar.

4.1.7 Fehlende Nachweisbarkeit der c.insC268_269-Mutante in der Immunfluoreszenz und im Western Blot

In der hier vorliegenden Arbeit konnte für die c.insC268_269-Mutante keine vorhandene Restaktivität bestimmt werden. Ihr Aktivitätsniveau lag näherungsweise auf dem Niveau der mit Insert-freiem Vektor transfizierten MEF. Ebenso ließen sich proteinbiochemisch im Western Blot und in der Fluoreszenzmikroskopie kein humanes Cathepsin D im Fall dieser Mutante detektieren. Ursächlich hierfür ist eine Leserasterverschiebung durch Insertion des zusätzlichen Cytosins, die in einem vorzeitigen Stopcodon resultiert. Dieses befindet sich nicht an der Insertionsstelle, sondern 49 Basentripletts cDNS in Richtung 3‘-Ende. Die Mutation wurde bisher als krankheitsauslösend in einem Fallbericht von zwei an NCL erkrankten Neugeborenen beschrieben (Meyer et al. 2015), wobei keine weitere Aufklärung der proteinstrukturellen Auswirkungen der Mutation erfolgte. In der hier vorliegenden Arbeit zeigten sich die vorliegenden Ergebnisse bei fehlender Nachweisbarkeit vereinbar mit der Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons.

4.1.8 Mögliche Auswirkungen der p.W383C-Mutation auf intramolekulare Disulfidbrückenbindungen

Die Mutante p.W383C wies keine Restaktivität im hier gewählten heterologen Expressionssystem in MEF auf. Es ließ sich jedoch die Prepro-Form von Cathepsin D proteinbiochemisch im Western Blot nachweisen. Fluoreszenzmikroskopisch zeigte sich ein Signal für die p.W383C-Mutante, das jedoch nicht mit LAMP I kolokalisierte. Dies entspricht

den Beobachtungen, die bei Erstbeschreibung der p.W383C-Mutation gemacht wurden (Steinfeld et al. 2006). Dort wurde ferner über die Auswirkungen der p.W383C-Mutation auf die Tertiärstruktur von Cathepsin D spekuliert. Das Tryptophan 383 ist zwischen verschiedenen Spezies vergleichsweise wenig konserviert (Steinfeld et al. 2006). Dennoch könnte die Mutation insofern einen Effekt auf die Tertiärstruktur von Cathepsin D haben, da es aufgrund der Nähe zu dem Cysteinrest C290 zur Ausbildung einer alternativen Disulfidbrückenbindung kommen könnte (Steinfeld et al. 2006).

Um die Auswirkungen der Cathepsin D-Mutationen auf die Konformität des gesamten Enzyms zu untersuchen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Beispielsweise könnte die Inhibition der Cathepsin D-Aktivität der jeweiligen Mutanten durch Pepstatin A weiterführend überprüft werden. Die Pepstatin A-Bindung erfordert konformationale Änderungen des Cathepsin D Moleküls (Baldwin et al. 1993). Dabei wurde die Pepstatin A-Bindungsfähigkeit bereits zur Bestimmung konformationaler Auswirkungen von Cathepsin D-Mutationen auf das gesamte Molekül untersucht (Follo et al. 2007). Letztendlich können die Auswirkungen der Cathepsin D-Mutationen auf die Proteinkonformität jedoch nur mit strukturellen Verfahren, wie z. B. der Röntgen-Kristallstrukturanalyse und der Kryoelektronenmikroskopie, endgültig abgeklärt werden.

4.2 Beeinträchtigung des autophagozytotischen Flusses in mit den Cathepsin D-Mutanten transfizierten MEF

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der nachgewiesenen Autophagolysosomenzahlen sind folgende:

(I) Nach durch Nährstoffdeprivation mittels Kultivierung in EBSS induziertem Stress zeigten sich im Median höhere Autophagolysosomenzahlen in Cathepsin D-defizienten MEF und in den mit den Cathepsin D-Mutanten transfizierten MEF als in den Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF.

(II) Auch unter Nährstoffentzug mit anschließender Kultivierung in nährstoffhaltigem Standardkulturmedium (DMEM) zeigten in der Folge alle Cathepsin D-Mutanten gegenüber dem Wildtyp höhere Autophagolysosomenzahlen.

Die Funktionalität des hier verwandten mCherry-GFP-doppelfluoreszenten LC3-Konstruktes wurde durch Zugabe von Bafilomycin A1, das die lysosomale Protonenpumpe und die Autophagosomen-Lysosomen-Fusion hemmt, zum Kulturmedium bestätigt. Unter diesen Kulturbedingungen zeigten sich keine rot fluoreszenten LC3-Signale in allen untersuchten MEF. Dass die Hemmung der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion durch Bafilomycin A1 zur Abwesenheit roter Fluoreszenzsignale führte, bestätigt die Funktionalität des verwandten LC3-Konstruktes insofern, als sich somit ausschließlich Autophagolysosomen rot fluoreszent darstellen.

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich Hinweise auf einen gestörten autophagozytotischen Fluss in Cathepsin D-defizienten MEF und in den mit den verschiedenen Cathepsin D-Mutanten transfizierten *CTSD* -/- MEF. Die höheren Autophagolysosomenzahlen im Fall der Cathepsin D- defizienten MEF und der die verschiedenen Cathepsin D-Mutanten exprimierenden *CTSD* -/- MEF im Vergleich mit den Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF könnten möglicherweise Hinweise auf eine beeinträchtigte Rückbildungsdynamik der Autophagolysosomen in diesen Zellen dieses hier gewählten heterologen Expressionsmodells sein. Absolut zeigten sich unter Betrachtung der Mediane für die Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF die niedrigsten Autophagolysosomenzahlen sowohl nach dreistündiger Nährstoffdeprivation in EBSS als auch nach anschließender einstündiger Rekonvaleszenz in Standardkulturmedium (DMEM). Dem gegenüber fanden sich bei den Cathepsin D-defizienten MEF und bei allen untersuchten Cathepsin D-Mutanten höhere Mediane der Autophagolysosomenzahlen für diese beiden Behandlungszustände. Für die Cathepsin D-defizienten, nur mit dem Vektor ohne Insert transfizierten MEF fanden sich darüber hinaus für die beiden Behandlungszustände die zweithöchsten bzw. dritthöchsten Medianwerte der Autophagolysosomenanzahl. Im Median höhere Autophagolysosomenzahlen könnten auf eine verzögerte Rückbildung der Autophagolysosomen in den die Cathepsin D-Mutanten exprimierenden *CTSD* -/- MEF hinweisen. Dies erscheint vor dem Hintergrund, dass Cathepsin D als intralysosomale Protease proteolytisch aktiv ist, möglich (Vidoni et al. 2016). Zudem ist für Cathepsin D nicht nur eine unmittelbare Funktion als lysosomale Protease nachgewiesen, sondern die Aspartatprotease hat auch indirekte Effekte auf die lysosomale Proteindegradation. Indem sie beispielsweise Prosaposin spaltet, dessen Komponente Saposin C für die Aktivität der Glucocerebrosidase relevant ist, nimmt Cathepsin D Einfluss auf den Abbau von Glucosylceramiden (Tayebi et al. 2020). Analog wurde für andere lysosomale Cathepsine, zum Beispiel die Cysteinprotease Cathepsin L, in entsprechenden Cathepsin L-defizienten Zellmodellen eine beeinträchtigte autophagolysosomale Degradation bei prinzipiell intakter Autophagosomenbildung beschrieben (Dennemärker et al. 2010).

4.2.1 Limitationen bei der Beurteilung des autophagozytotischen Flusses

Die Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse ist mit verschiedenen Einschränkungen verbunden. Zunächst gehen erhöhte Autophagolysosomenzahlen nicht notwendigerweise mit einer verzögerten autophagolysosomalen Degradation einher. Eine erhöhte Autophagolysosomenzahl kann gleichermaßen sowohl aus einem beeinträchtigten autophagolysosomalem Abbau als auch aus einem insgesamt gesteigerten autophagozytotischen Fluss mit vermehrter Autophagosomenbildung und konsekutiver Fusion mit Lysosomen zu Autophagolysosomen resultieren (Mizushima und Yoshimori 2007; Mizushima et al. 2010). Da in der vorliegenden Arbeit nur definierte Behandlungszustände und Zeitpunkte für die mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF untersucht wurden (d. h. unter Basalbedingungen, nach dreistündiger Exposition gegenüber

EBSS und nach sich daran anschließender einstündiger Rekonvaleszenz in DMEM), ist nicht ausgeschlossen, dass die erhöhten Autophagolysosomenzahlen im Fall der Cathepsin D-defizienten MEF und der mit den Cathepsin D-Mutanten transfizierten *CTSD* -/- MEF ebenso aus einer gesteigerten Autophagosomenbildungsrate bzw. einer erhöhten Autophagosomen-Lysosomen-Fusionsrate resultieren könnten.

Die Tatsache, dass einige Cathepsin D-Mutanten exprimierende MEF in der vorliegenden Arbeit unter basalen Kulturbedingungen in DMEM im Median bereits höhere Autophagolysosomenzahlen als die Cathepsin D-defizienten MEF zeigten, schränkt die Beurteilbarkeit der hier gewonnenen Ergebnisse als beeinträchtigte autophagolysosomale Degradation bei den untersuchten Cathepsin D-Mutanten weiter ein. Insbesondere im Fall dieser Mutanten könnten höhere Autophagolysosomenzahlen nach Behandlung mit EBSS und nach sich daran anschließender einstündiger Rekonvaleszenz in Standardkulturmedium (DMEM) durch einen insgesamt gesteigerten autophagozytotischen Fluss mit gesteigerter Autophagosomenbildung und -fusion mit Lysosomen und nicht durch eine beeinträchtigte autophagolysosomale Degradation bedingt sein. Zudem zeigten sich für einige der untersuchten Cathepsin D-Mutanten (p.R399H, p.K331del und c.insC268_269), obwohl sie absolut höhere Autophagolysosomenzahlen nach einstündiger Rekonvaleszenz in DMEM als die Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF aufwiesen, eine relativ größere Reduktion der Autophagolysosomenzahlen gegenüber der dreistündigen Behandlung mit EBSS. Während sich die Autophagolysosomenzahlen im Vergleich der Mediane nach dreistündiger Exposition gegenüber EBSS mit jener nach dreistündigen Exposition gegenüber EBSS und Rekonvaleszenz in DMEM im Fall der Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF um 21% reduzierten, nahmen die Autophagolysosomenzahlen im Fall der p.R399H-, p.K331del- bzw. c.insC268_269-Mutante im Median um 44%, 48% bzw. 28% ab. Unter Betrachtung der relativen Reduktion ist für diese Mutanten somit fraglich, ob die autophagolysosomale Degradationskapazität gegenüber den Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden MEF tatsächlich eingeschränkt ist.

4.2.2 Vergleich mit anderen Modellen der Cathepsin D-Defizienz

4.2.2.1 Vergleich mit Tiermodellen der NCL Typ 10

Für Tiermodelle der Cathepsin D-Defizienz (unter anderem Amerikanische Bulldogge, Schafe, Fruchtfliegen der Gattung *Drosophila*) wurde mit Hinblick auf die Akkumulation intrazellulären Speichermaterials eine Rekapitulation pathobiochemischer Merkmale der NCL nachgewiesen. Mehrheitlich wurde für diese Tiermodelle eine Beteiligung von Autophagie an der Entstehung der beobachteten Phänotypen auf zellulärer Ebene jedoch nicht untersucht (Tyynelä et al. 2000; Myllykangas et al. 2005; Awano et al. 2006). Ähnliches gilt für ein Tiermodell der Cathepsin D-Defizienz in Zebrafischlarven, für das Veränderungen des autophagozytotischen Flusses nur angenommen wurden (Follo et al. 2011).

Für Neurone Cathepsin D-defizienter Mäuse konnte hingegen gezeigt werden, dass es zu einer mit zunehmendem Alter der Tiere steigenden intrazellulären Akkumulation granulärer Ultrastrukturen kommt (Koike et al. 2000). Indem elektronenmikroskopisch LC3 II auf der Membranoberfläche jener Ultrastrukturen nachgewiesen wurde, gelang in späteren Arbeiten von Koike et al. eine Charakterisierung der Strukturen als Autophagosomen bzw. Autophagolysosomen (Koike et al. 2005). Somit konnten für dieses Mausmodell der Cathepsin D-Defizienz, das phänotypisch den humanen Verlauf der NCL Typ 10 abbildet, Hinweise auf eine Beteiligung der zellulären Autophagie gefunden werden (Koike et al. 2000). Für bestimmte untersuchte Hirnregionen, u. a. für das Corpus callosum, konnte in diesem Mausmodell zudem eine deutlich geringere Kolokalisation des lysosomalen Markers LAMP I mit dem Autophagosomenmarker LC3 für Cathepsin D-defiziente Neuronen als für Neurone des Wildtyps festgestellt werden. Hinsichtlich des autophagozytotischen Flusses schlossen Koike et al. für diese Hirnareale auf eine gesteigerte Autophagosomenbildungsrate (Koike et al. 2005). Eine verminderte Kolokalisation von LC3 und LAMPI kann jedoch ambig interpretiert werden und ggf. auch auf einen Autophagosomen-Lysosomen-Fusionsdefekt hinweisen (Mizushima et al. 2010). Hinweise auf eine beeinträchtigte Autophagolysosomendegradation, wie ihn die Ergebnisse dieser Arbeit mit den unter 4.2.1 genannten Einschränkungen möglicherweise nahelegen, fanden sich im von Koike et al. untersuchten Mausmodell nicht (Koike et al. 2005). Dem gegenüber konnte in einem Cathepsin D-defizienten Mausmodell, in dem die Rolle der Phosphatidyl-3-Kinase an Mechanismen der Neurodegeneration bei Cathepsin D-Defizienz untersucht wurde, gezeigt werden, dass sich die Expression von Beclin und mTOR im Vergleich zum Cathepsin D-Wildtyp nicht verändert (Walls et al. 2007). Da diesen Proteinen eine wesentliche Rolle in der Autophagosomennukleation zukommt, hypothetisierten Walls et al., dass sich die Cathepsin D-Defizienz mutmaßlich nicht auf die Autophagosomenneubildung, sondern vorrangig auf die autophagolysosomale Degradation auswirkt. Die Ergebnisse von Walls et al. ergänzen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde insofern, als für die Autophagosomennukleation erforderliche Proteine in Cathepsin D-defizienten Zellen scheinbar unverändert exprimiert werden und ein Defekt des autophagozytotischen Flusses bei Cathepsin D-Defizienz mutmaßlich eher an anderer Stelle, beispielsweise in der autophagolysosomalen Degradationsphase, lokalisiert ist. Andererseits kann weder in der Arbeit von Walls et al. noch in der vorliegenden Arbeit gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Autophagosomenneubildung im Fall eines kompletten oder partiellen Cathepsin D-Aktivitätsverlustes gänzlich unbeeinflusst ist. Eine unveränderte Expression für die Autophagosomennukleation kritischer (Regulator-)Proteine allein schließt eine unbeeinträchtigte Autophagosomenneubildung nicht aus, da das Expressionsniveau nicht notwendigerweise das Aktivitätsniveau der entsprechenden Proteine widerspiegelt (Walls et al. 2007). Ferner kann in der vorliegenden Arbeit aufgrund o. g. Limitation, dass lediglich unselektive Autophagie zu definierten Zeitpunkten in den mCherry-GFP-LC3 transduzierten MEF untersucht wurde, eine Steigerung der Autophagosomenbildungsrate,

welche konsekutiv zu erhöhten Autophagolysosomenzahlen führen könnte, ebenso nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.2.2.2 Vergleich mit Cathepsin D-defizienten Modellen für Synucleinopathien

Neben der NCL Typ 10 (Siintola et al. 2006; Steinfeld et al. 2006) wurde für Cathepsin D auch eine Beteiligung an der Pathogenese weiterer neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen. Unter anderem handelt es sich dabei um Erkrankungen der Gruppe der Synucleinopathien (Tayebi et al. 2020). Vice versa konnte für Hirngewebeproben an NCL Typ 10 verstorbener Patient*innen interessanterweise auch eine deutliche intraneuronale Akkumulation von alpha-Synuclein in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden (Cullen et al. 2009). In einem Glioblastomzellmodell stellte sich eine zunehmende intrazelluläre Reduktion überexprimierten alpha-Synucleins bei gleichzeitiger Cathepsin D-(Ko-) Überexpression dar, weshalb für Cathepsin D auf eine direkte oder ggf. vermittelte Synucleinaseaktivität geschlossen wurde (Cullen et al. 2009). Ähnliche Effekte einer Cathepsin D-Überexpression auf die alpha-Synuclein-Degradation wurden in vitro in dopaminergen Neuronen, die aus pluripotenten Stammzellen an Morbus Parkinson erkrankter Patienten mit einer bestimmten alpha-Synuclein-Mutation induziert wurden, und in vivo in einem Cathepsin D-defizienten Mausmodell, in welchem die Cathepsin D-Aktivität durch erfolgreiche Behandlung mit rekombinantem humanen Cathepsin D wieder hergestellt werden konnte, beobachtet (Prieto Huarcaya et al. 2022). Ebenso konnten in einem weiteren Zellmodell Hinweise auf eine Rolle von Cathepsin D sowohl in der Degradation zellulär internalisierten alpha-Synucleins als auch in der interzellulären Transmission von alpha-Synucleinaggregaten gefunden werden (Bae et al. 2015).

Die Auswirkung unterschiedlicher Cathepsin D-Mutationen auf die alpha-Synucleindegradation wurde in der Folge auch hinsichtlich der Beeinflussung der zellulären Autophagie als zugrunde liegenden Pathomechanismus in Zellmodellen untersucht. Crabtree et al. konnten im Fall der Überexpression einer NCL Typ 10-assoziierten Mutante (p.D295N), die bisher nur in Schafen und nicht in Menschen identifiziert wurde, in einer Neuroblastomzelllinie eine vermehrte intrazelluläre alpha-Synucleinaggregation im Vergleich mit der Überexpression des Cathepsin D-Wildtyps zeigen. Die Überexpression dieser enzymatisch inaktiven Mutante hatte jedoch keine Auswirkungen auf das autophagosomal-lysosomale System, gemessen an der LC3-Konversionrate von der zytoplasmatischen LC3 I- zur Autophagosomen-gebundenen LC3 II-Form und an der Expression der lysosomalen Biomarker LAMP I und LAMP II (Crabtree et al. 2014). Crabtree et al. quantifizierten den autophagozytotischen Fluss allerdings nach Gabe von Bafilomycin A1. Folglich wurde vorrangig eine Beeinträchtigung der Autophagosomenneubildung durch die enzymatisch inaktive Cathepsin D-Mutante p.D295N ohne Betrachtung der Rückbildungsdynamik der Autophagolysosomen untersucht(Crabtree et al. 2014). In den hier vorliegenden Ergebnissen stellt sich hingegen möglicherweise eine Beeinträchtigung der autophagolysosomalen Degradation unter Beachtung der genannten Limitationen bei der Ergebnisinterpretation

dar. Dass Crabtree et al. eine unbeeinträchtigte Expression von LAMP II als lysosomalen Biomarker in den die Cathepsin-D Mutante p.D295N exprimierenden Neuroblastomzellen fanden, ist insofern interessant, als LAMP II auch als spezifischer Substratrezeptor in Chaperone-vermittelter Autophagie fungiert (Cuervo und Dice 1996). Ob andere Autophagieformen als die unselektive Autophagie im hier vorliegenden heterologen Zellmodell beeinträchtigt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Anderenorts wurden Cathepsin D-Mutationen bezüglich ihres Enzymaktivitätsniveaus und ihrer subzellulären Lokalisation charakterisiert, die in einer genomweiten Assoziationsstudie (Robak et al. 2017) bei Patienten mit Morbus Parkinson, d. h. einer Synucleinopathie, gefunden wurden (Bunk et al. 2021). Es stellte sich in dieser Untersuchung eine korrekte lysosomale Lokalisation aller (vier) untersuchten Cathepsin D-Mutationen mit im Vergleich zum Cathepsin D-Wildtyp unbeeinträchtigter enzymatischer Aktivität dar. Für die Degradationskapzität von alpha-Synuclein zeigten die Mutanten dem Wildtyp gleichwertige - im Fall einer Mutante sogar gesteigerte - Kapazitäten. In dieser Studie wurden unter Quantifizierung der lysosomalen Masse mit einer fluoreszenzmikroskopischen Färbung für die untersuchten Morbus Parkinson-assoziierten Mutationen keine Hinweise auf eine lysosomale Dysfunktion gefunden (Bunk et al. 2021). Eine uneingeschränkte lysosomale Funktion schränkt eine Beeinträchtigung der autophagozytotischen Degradation, wie ihn die Ergebnisse dieser Arbeit möglicherweise nahelegen, nicht aus, da die Funktionalität von Autophagolysosomen neben lysosomalen Proteasen auch von Proteinen abhängt, die nicht durch das lysosomale Kompartiment bei der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion bereitgestellt werden, beispielsweise Rab7 oder Präsenilin (Jäger et al. 2004; Eskelinen 2005; Glick et al. 2010; Lamb et al. 2013). Zudem spekulierten Bunk et al. bereits, dass die von ihnen angewandte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der lysosomalen Masse für die Untersuchung geringfügiger Veränderungen ggf. nicht sensitiv genug sei (Bunk et al. 2021).

4.2.3 Autophagie-unabhängige Zelltodmechanismen bei Cathepsin D-Defizienz und Übertragbarkeit auf die in-vivo-Situation

Limitationen der hier gewonnen Ergebnisse ergeben sich neben der ambigen Beurteilbarkeit hinsichtlich des autophagozytotischen Flusses auch aus der Tatsache, dass eine Beeinträchtigung der zellulären Autophagie mutmaßlich nicht allein zur Ausprägung des neuronalen Phänotyps bei der NCL Typ 10 beiträgt. Insbesondere zeigte sich eine Hirnareal-spezifische Dominanz unterschiedlicher Zelltodmechanismen. So wurde bezüglich der retinalen Degeneration bei Cathepsin D-defizienten Mäusen Apoptose als führender Zelltodmechanismus identifiziert. Hier konnten in Zellen unterschiedlicher Retinaschichten mit zunehmendem Tieralter im Wesentlichen Apoptose-vermittelnde Proteine nachgewiesen werden. Dennoch stellten sich auch autophagozytotische Ultrastrukturen in Zellen äußerer und innerer Retinaschichten dar (Koike et al. 2003). Die Rolle der Apoptose als weiterer Zelltodmechanismus bei Cathepsin D-Defizienz wurde in der Folge teilweise limitiert: So zeigte ein Cathepsin D-defizientes Mausmodell, in dem gezielt Bax als für die Apoptose

relevantes Protein deletiert wurde, einen Rückgang apoptotischer Marker (insbesondere Caspase 3), jedoch keine Reduktion der generellen Neurodegeneration. Somit wurde im untersuchten Cathepsin D- und Bax-doppeldefizienten Mausmodell eine Persistenz insbesondere autophagozytotischer Strukturen in Abwesenheit von Bax-abhängiger Apoptose festgestellt (Shacka et al. 2007).

Ferner konnten in einem Cathepsin D-defizienten Mausmodell Hinweise auf eine erhöhte mikrogliale Stickstoffmonoxid-Synthese in geschädigter Retina gesammelt werden (Koike et al. 2003). Bereits in vorhergehenden Arbeiten konnten Hinweise auf eine gesteigerte Synthese von Stickstoffmonoxid im ZNS eines murinen Modells der Cathepsin D-Defizienz durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase festgestellt werden. Obgleich die Phagozytose von Zelldebris durch Makrophagen gleichermaßen zur Freisetzung und zur reduzierten Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren führen kann, wurde für Mikroglia, die geschädigte Neurone in Cathepsin D-defizienten ZNS phagozytieren, eine vermehrte Stickstoffmonoxidproduktion festgestellt. Durch Applikation von Stickstoffmonoxid-Synthesehemmern waren neurologische und periphere Phänotypen bei Cathepsin D-Defizienz teilweise rückläufig (Nakanishi et al. 2001).

Neben den beschriebenen Rollen von Cathepsin D in der Apoptose und bei der Regulation der Stickstoffmonoxid-Synthese scheint die Protease auch unmittelbar für die neuronale Plastizität kritische Funktionen auszuüben. So konnte für Synapsen Cathepsin D-defizienter Neurone eine deutliche Akkumulation präsynaptischer Vesikel sowie eine postsynaptisch deutlich verminderte neuronale Erregbarkeit nachgewiesen werden (Koch et al. 2011). Darüber hinaus wurde für Cathepsin D auch eine Rolle im lysosomalen Sphingolipidstoffwechsel beschrieben. Insbesondere zeigte sich eine Erhöhung von Bis(-monoacylglycero-)phosphat im neuronalen Gewebe Cathepsin D-defizienter Mäuse, sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen (Jabs et al. 2008). Wie bereits dargestellt, wurde für Cathepsin D eine Funktion in der Spaltung des Sphingolipidaktivatorproteins Prosaposin in seine aktiven Formen Saposin A-D hypothetisiert (Tayebi et al. 2020). Sphingolipidaktivatorproteine sind am Transport von Gangliosiden in die Lysosomen und deren Abbau durch Autophagie beteiligt. Neben der verminderten Spaltung von Prosaposin in seine aktiven Formen bei Cathepsin D-Defizienz wurde für das Sphingolipidaktivatorprotein durch die vermehrte Anwesenheit von Bis(-monoacylglycero-) phosphat in Membranen des autophagolysosomalen Systems bei Cathepsin D-Defizienz angenommen, dass es hierdurch an der Integration in die Zellmembran sterisch gehindert wird und seiner Transportfunktion von Gangliosiden somit nicht mehr nachkommen kann (Jabs et al. 2008). Entsprechend akkumulieren im Cathepsin D-defizienten Mausmodell im Hirngewebe neben weiteren Cerebrosiden Gangliosid GM2 und GM3 (Jabs et al. 2008). Zusätzlich wurde in Cathepsin D-defizienten Mäusen auch eine verminderte Expression essenzieller Proteine für die axonale Myelinisierung beobachtet (Mutka et al. 2010). Diese Minderexpression führte teils zu einer Hypo- und teils zu einer Hypermyelinisierung. In Cathepsin D-defizienten Mäusen zeigte sich ein hypotrophes Corpus callosum in cerebralen

MRT-Aufnahmen, was als hinweisend auf Beeinträchtigungen des Myelinisierungsprozesses gewertet wurde (Haapanen et al. 2007).

Für Cathepsin D wurden neben der intralysosomalen Funktion in der Proteindegradation zahlreiche Funktionen unabhängig von seiner katalytischen Aktivität beschrieben. So zeigten sich für pro-Cathepsin D sowie für das abgespaltene Propeptid ein mitogener Effekt auf zahlreiche Tumorzelllinien (Benes et al. 2008). Ein solcher Effekt wurde unter anderem für Prostatakrebszelllinien (Vetvicka et al. 1998), Brustkrebszelllinien (Vetvicka et al. 1997), Lungenkarzinomzelllinien (Vetvicka et al. 2004) und weitere beschrieben. In Anbetracht weitreichender extraneuronaler Organeffekte einer Cathepsin D-Defizienz im murinen Modell, u. a. auf Blutbildung, Thymusentwicklung und das Auftreten von Thromboembolien (Saftig et al. 1995), könnten solche parakrinen Effekte des Cathepsin D-Moleküls in vivo pathogenetisch relevant sein. Im hier vorliegenden Zellmodell können solche parakrinen Effekte von Cathepsin D nicht untersucht werden. Andererseits sind bislang bei Patienten, die pathogene *CTSD*-Mutationen tragen, keine diesbezüglich hinweisenden Symptome beschrieben worden. Inwieweit parakrine Effekte für die Pathogenese des neuronalen Phänotyps der NCL Typ 10 relevant sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Übertragbarkeit der hier gewonnenen Ergebnisse auf Nervengewebe in vivo ist zudem dadurch eingeschränkt, dass Mutationen in NCL-Genen trotz hoher gewebespezifischer Expression der jeweiligen NCL-Proteine nicht notwendigerweise einen starken Effekt zeigen. So konnten beispielsweise für Lebergewebe im Fall einer NCL 3-Mutante trotz einer hohen gewebespezifischen Expression nur vergleichsweise geringe Auswirkungen auf den hepatischen Phänotyp festgestellt werden (Mitchison et al. 2004). Für Nervengewebe sind jedoch stärkere phänotypische Auswirkungen von Cathepsin D-Mutationen anzunehmen, da Neurone aufgrund ihres postmitotischen Zustands eine besondere Vulnerabilität aufweisen (Vidoni et al. 2016).

Inwiefern andere zelluläre Mechanismen als die zelluläre Autophagie im Fall der Cathepsin D-Defizienz neurophänotypisch relevant sind und ob sich die hier gewonnenen Ergebnisse auf die in-vivo-Neurodegeneration bei Cathepsin D-Defizienz übertragen lassen, bedarf also weiterer Abklärung.

4.2.4 Methodische Limitationen des verwandten mCherry-GFP-LC3-Konstruktes bei der Untersuchung des autophagozytotischen Flusses

Zur Untersuchung des autophagozytotischen Flusses wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode mit dem doppelt fluoreszenten Protein mCherry-GFP-LC3 nach lentiviraler Transduktion verwandt. Proteinbiochemische Methoden, wie beispielsweise die Messung der LC3-Konversion, zur Messung von Autophagie sind mit dem Problem konfrontiert, dass ein erhöhter Nachweis der LC3-II-Fraktion ambig interpretiert werden kann. So kann eine erhöhte Konversionsrate gleichermaßen eine erhöhte Autophagosomenbildung als auch eine beeinträchtigte autophagolysosomale Degradation darstellen (Mizushima und Yoshimori

2007; Mizushima et al. 2010). Ebenso zeigt LC3 II eine etwas höhere Antikörperaffinität als LC3 I im Blottingverfahren (Barth et al. 2010), wodurch die Beurteilung zusätzlich erschwert wird. Die Verwendung eines mCherry-GFP-doppelfluoreszenten LC3 bietet die Möglichkeit, den gesamten autophagozytotischen Fluss nachzuvollziehen (Klionsky et al. 2012). Durch das Quenching des grünen Fluoreszenzsignals im mCherry-GFP-LC3-Konstrukt im sauren Milieu der Autophagolysosomen ist prinzipiell eine Unterscheidung der Autophagosomen vor und nach Fusion mit Lysosomen möglich (Kimura et al. 2007).

Dennoch weißt die Verwendung von mCherry-GFP-LC3 einige Limitationen auf: Zunächst ist die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale bis zu einem gewissen Grad subjektiv (Barth et al. 2010). Um die Objektivität der Methode zu erhöhen, wurde deshalb in dieser Arbeit die Auswertung programmgestützt unter Anwendung eines geeigneten Makros für ImageJ durchgeführt. Zudem stellt mCherry-GFP, insbesondere in Relation zu LC3, ein verhältnisweise großes Markerprotein dar, sodass nicht gänzlich ausgeschlossen ist, dass sich transduziertes, fluoreszent markiertes LC3 intrazellulär andersartig im Vergleich zu Wildtyp-LC3 verhält (Klionsky et al. 2012).

Darüber hinaus konnte für transient transfizierte Zellen gezeigt werden, dass insbesondere GFP-LC3 die Tendenz zur Aggregation und zur Einlagerung in bestimmte intrazelluläre Proteinaggregate zeigt (Kuma et al. 2007). Insofern ist in der vorliegenden Arbeit nicht gänzlich ausgeschlossen, dass es sich bei den detektierten Fluoreszenzsignalen teilweise auch um artifizielle Aggregationen und nicht um Autophagosomen bzw. Autophagolysosomen handelt. Die hier untersuchten MEF wurden stabil transduziert, da dieser aggregatbildende Effekt in stabil transduzierten Zellen geringer auszufallen scheint (Kuma et al. 2007).

Eine weitere Limitation bei der Verwendung des mCherry-GFP-LC3-Assays ergibt sich aus der Verwendung spezieller Fixierungsstoffe bei der Zellaufarbeitung. Für verschiedene Fixierungs- und Permeabilisationsagenzien wurde berichtet, dass sie zu einer Verschiebung des lysosomalen pH-Wertes in Richtung des alkalischen Milieus führen (Klionsky et al. 2012). Darüber hinaus wurde speziell für Triton X100 und Saponin berichtet, dass sie zu einer artifiziellen Aggregatbildung von fluoreszent markiertem Protein führen können (Ciechomska und Tolkovsky 2007). Zur Vermeidung dieses Effektes wurde in der vorliegenden Arbeit gekühltes Methanol zur Zellfixierung verwandt.

Durch die Koexpression von mCherry und GFP und die konsekutive Fluoreszenzlöschung des grünen Fluoreszenzsignales in Autophagolysosomen ist prinzipiell eine Unterscheidung verschiedener Strukturen des autophagozytotischen Flusses möglich. Durch das Vorhandensein von LC3 u. a. auf der Isolationsmembran ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass in der vorliegenden Arbeit ggf. auch Strukturen fluoreszent markiert wurden, die nicht Autophagosomen oder Autophagolysosomen darstellen. Zur genaueren Zuordnung der Strukturen könnte beispielsweise in weiteren Untersuchungen eine Koexpression mit fluoreszent markierten Proteinen dienen, die nur transient mit Autophagosomen/Autophagolysosomen assoziiert sind. So könnte beispielsweise die

fluoreszente Markierung des Atg5-Atg12-Atg16L-Komplexes, der nur in der Isolationsmembran zu finden ist, weiterführend dazu genutzt werden, Fluoreszenzsignale, die von prä-autophagosomalen Strukturen stammen, als solche zu identifizieren (Klionsky et al. 2012). Ferner könnte zur genaueren Eingrenzung der Lokalisation des Autophagiedefektes bei Cathepsin D-Defizienz auch eine weiterführende Quantifizierung autophagozytotischer Strukturen unter Verwendung von mCherry-GFP-LC3 nach zusätzlicher Deletion basaler ATG-Proteine (z. B. ATG 5 oder ATG 7) als weitere Kontrolle erfolgen.

Eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit stellt die kleine Stichprobengröße der für die jeweilige Mutante und den jeweiligen Behandlungszustand untersuchten MEF dar. Dabei stellt die doppelte fluoreszente Markierung von LC3 mit mCherry und GFP eine Methode dar, die sich prinzipiell auch für mikroskopisches oder durchflusszytometrisches Hochdurchsatz-Screening eignet (Sarkar et al. 2009). Damit besteht eine Möglichkeit zur Vergrößerung der Stichprobe in weiteren Untersuchungen.

4.2.5 Weiterführende Untersuchung zur Charakterisierung des autophagozytotischen Flusses und zur proteolytischen Redundanz von Cathepsin D

Das Ausmaß der residuellen Cathepsin D-Aktivität verschiedener Mutanten könnte das lebenszeitliche Einsetzen der NCL Typ 10 derart beeinflussen, dass eine niedrige Restaktivität mit einem frühen lebenszeitlichen Krankheitsbeginn verbunden ist (Steinfeld et al. 2006; Walls et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit stellte sich jedoch keine Korrelation zwischen dem Ausmaß des Cathepsin D-Enzymaktivitätsverlustes und der Anzahl rot fluoreszent markierter Autophagolysosomen dar. Das heißt, dass Mutanten mit einer niedrigen Cathepsin D-Restaktivität nicht notwendigerweise eine höhere Anzahl von Autophagolysosomen nach Autophagieinduktion durch Nährstoffdeprivation und nach Rekonvaleszenz in nährstoffhaltigem Medium aufwiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch lediglich nicht-selektive Autophagie als Folge von Nährstoffdeprivation untersucht. Dass die Cathepsin D-Restaktivität hier nicht mit den gemessenen Autophagolysosomenzahlen korrelierte, könnte folglich dadurch bedingt sein, dass Cathepsin D-Defizienz eher eine Beeinträchtigung der selektiven Autophagie hervorruft (Lamark und Johansen 2021). So konnte beispielsweise in einem Mausmodell, in dem die Auswirkungen einer verminderten Cathepsin D-Aktivität auf die zelluläre Autophagie nach Schlaganfall untersucht wurden, mit post-ischämisch abnehmender Cathepsin D-Aktivität gezeigt werden, dass insbesondere polyubiquitinylierte Proteine und p62 akkumulierten. Dabei handelt es sich um potenzielle Substrate selektiver Autophagie bzw. um ein Markerprotein, das selektive Autophagie vermittelt (Hossain et al. 2021). Ebenso stellte sich in einem Mausmodell der Cathepsin D-Haploinsuffizienz, das die aus dieser Haploinsuffizienz resultierende Effekte auf die zelluläre Degradation und interzelluläre

Transmission von alpha-Synuclein untersuchte, eine Akkumulation polyubiquitinylierter Aggregate und des selektiven Autophagiemarkerproteins p62 dar (Bae et al. 2015). Entsprechend sollten die Auswirkungen der hier untersuchten Cathepsin D-Mutationen auf die selektive Autophagie unter Markierung und Quantifizierung für die selektive Autophagie relevanter Markerproteine weiterführend untersucht werden.

Es ist ferner nicht auszuschließen, dass es in den hier untersuchten MEF bei mutationsbedingtem katalytischen Cathepsin D-Aktivitätsverlust kompensatorisch zu einer gesteigerten Synthese bzw. gesteigerten katalytischen Aktivität anderer Proteasen kommt. So konnte in Cathepsin D-defizienten Mausmodellen gezeigt werden, dass es mit zunehmendem Alter der Tiere zu einer gesteigerten Expression und Aktivität von Cathepsin B, einer lysosomalen Cysteinprotease, kommt (Koike et al. 2000). Ebenso konnte für Cathepsin B und L-doppeldefiziente murine Neurone ein ähnlicher neuronaler Phänotyp wie für Cathepsin D-defiziente Neurone mit Akkumulation autophagosomaler Strukturen beobachtet werden (Koike et al. 2005). Darüber hinaus zeigen beispielsweise Cathepsin D und Cathepsin L eine Ähnlichkeit der pH-Optima und sind beide als Endopeptidasen aktiv (Di Spiezio et al. 2021). Jedoch zeigte sich in Astrozyten eines NCL10-Mausmodells, in dem die Redundanz lysosomaler Proteasen hinsichtlich ihrer degradativen Kapazität für Proteinaggregate bei Cathepsin D-Defizienz untersucht wurde, nach Applikation von rekombinantem Cathepsin B keine und nach Applikation von Cathepsin L eine verglichen mit Cathepsin D geringere Reduktion der intrazellulären Proteinaggregate (Di Spiezio et al. 2021). Somit gingen Di Spiezio et al. von einer gewissen Hierarchie verschiedener Proteasen bei der lysosomalen Proteindegradation aus, jedoch ohne dass sich die untersuchten Proteasen (Cathepsin B, D und L) in ihrer Aktivität gänzlich redundant zeigten. Dennoch sollte die Aktivität anderer Proteasen, wie Cathepsin B und L, in den hier vorliegenden MEF weiterführend untersucht werden, um eine kompensatorisch gesteigerte Aktivität auszuschließen. Diese weiterführende Untersuchung scheint auch mit Hinblick auf die Tatsache relevant, dass in extraneuronalem Gewebe für Cathepsin D selbst auch eine Funktion im Abbau der Cathepsine B und L angenommen wurde (Mehanna et al. 2016). Zudem könnte eine kompensatorisch gesteigerte Aktivität anderer lysosomaler Proteasen die fehlende Korrelation zwischen Ausmaß des Cathepsin D-Aktivitätsverlustes und der Reduktion der Degradationskapazität der zellulären Autophagie bis zu einem gewissen Grad bedingen; zumindest wurde für die Cysteinprotease Cathepsin L eine gewisse funktionelle Redundanz zu Cathepsin D - obgleich bei geringerer Degradationseffektivität - hinsichtlich dessen proteolytischer Aktivität beschrieben (Di Spiezio et al. 2021).

4.3 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse

In Abhängigkeit der Lokalisation eines Autophagiedefektes innerhalb des autophagozytotischen Flusses existieren unterschiedliche, in die Autophagie eingreifende Therapieoptionen. Während biochemische Induktoren der Autophagie insbesondere dann

therapeutisch in Betracht kommen, wenn die Autophagosomenbildungsphase bei einer grundsätzlich intakten lysosomalen Degradation des Autophagosomeninhaltes beeinträchtigt ist, sind diese bei Defekten in der lysosomalen Degradationsphase eher ungeeignet (Seranova et al. 2017). So konnte beispielhaft für ein Mausmodell der NCL Typ 3 eine Verbesserung des neuropathologischen Phänotyps durch Applikation von Trehalose, einem mTOR-unabhängigen Autophagieinduktor, erreicht werden (Palmieri et al. 2017). In ähnlicher Weise zeigte sich durch die Gabe von Lithium in einem zerebellären Purkinjezellmodell der NCL Typ 3 eine Reduktion der zellulären Autofluoreszenz. Auch dort konnte folglich durch Gabe eines Autophagieinduktors bei einer grundsätzlich intakten hydrolytischen Proteindegeneration bei der NCL Typ 3 eine Verbesserung des neuronalen Phänotyps erzielt werden (Chang et al. 2011).

Für einige lysosomale Speichererkrankungen, beispielsweise für Morbus Gaucher, Morbus Fabry und Morbus Pompe, existiert mit der Enzymersatztherapie eine zugelassene kausale Therapie, die das defekte lysosomale Enzym oder Protein ersetzt (Parenti et al. 2015). Für die Gruppe der neuronalen Ceroidlipofuszinosen ist bisher nur im Fall der spät-infantilen NCL Typ 2 eine intrathekale Enzymersatztherapie mit Cerliponase alpha verfügbar. In einer offenen, multizentrischen Studie zeigten mit intrathekaler Applikation behandelte NCL Typ 2-Patienten über gleiche Zeiträume hinweg eine geringere Rückläufigkeit motorischer Fertigkeiten und Sprachfertigkeiten als Patientengruppen aus historischen Kontrollregistern (Schulz et al. 2018).

Für die NCL Typ 10 existiert eine prinzipielle Machbarkeitsstudie für eine Enzymersatztherapie. Für Cathepsin D-defiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass rekombinant hergestelltes humanes Cathepsin D nach intravenöser Applikation erfolgreich von verschiedenen Organen aufgenommen und korrekt in die reife Form prozessiert wird. Dies führte zur teilweisen Korrektur der beeinträchtigten Autophagie und zur Reduktion intrazellulär akkumulierender Proteine (Saposin D, Untereinheit c der mitochondrialen ATPase). Daneben führte die intrakraniale Applikation des rekombinanten Cathepsin D zu einem Rückgang von Autophagosomenmarkern in Zellen des ZNS auf ein dem Cathepsin D-Wildtyp vergleichbares Niveau. Bei dieser Applikationsform kam es zudem zum Nachweis von reifem Cathepsin D in peripheren Organen, weshalb auf eine partielle Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Cathepsin D geschlossen wurde (Marques et al. 2019). Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse ist die Enzymersatztherapie jedoch auch problembehaftet: Probleme stellen unter anderem große interindividuelle Wirkunterschiede und die Bildung von Antikörpern gegen die verabreichten Enzymersatzprodukte dar (Parenti et al. 2015).

Die Auswirkungen verschiedener Cathepsin D-Mutationen auf den autophagozytotischen Fluss in hier untersuchten MEF könnten in Anbetracht einer bereits durchgeführten Machbarkeitsstudie zum Cathepsin D-Enzymersatz in einem Mausmodell wenig relevant erscheinen. Für andere lysosomale Speichererkrankungen sind jedoch therapeutische

Kombinationsansätze mit gleichzeitiger Durchführung einer Enzymersatztherapie mit Autophagie-modulierender Therapie beschrieben (Seranova et al. 2017). So wurde beispielsweise für Morbus Pompe, eine Glykogenspeichererkrankung, ein in-vivo-Ansatz beschrieben, in dem die Kombinationstherapie aus einem Enzymersatz und der Gabe von Rapamycin, einem Autophagieinduktor, zu einer deutlichen Korrektur pathologischer zellulärer Glykogeneinlagerungen führte (Ashe et al. 2010). Deshalb könnte auch nach einer erfolgreichen zukünftigen Etablierung einer Cathepsin D-Enzymersatztherapie eine etwaige Autophagie-modulierende Therapie im Sinne eines synergistischen Ansatzes klinisch bedeutsam sein.

5 Zusammenfassung

Die Subtypen der Neuronalen Ceroidlipofuszinose (NCL) stellen kumulativ die häufigste Ursache einer Neurodegeneration im Kindes- und Jugendalter dar. Namensgebend für diese Gruppe der neuronalen Speichererkrankungen ist die progrediente intraneuronale Akkumulation von Lipofuszin, einem proteinhaltigen Speichermaterial unterschiedlicher biochemischer Zusammensetzung. In verschiedenen Tierspezies wurde beschrieben, dass Mutationen der lysosomalen Aspartatprotease Cathepsin D zur Rekapitulation eines NCL-typischen Phänotyps führten. In der Folge wurde ebenso in Fallberichten der gänzliche oder partielle katalytische Aktivitätsverlust von Cathepsin D als Ursache der NCL Typ 10 im Menschen identifiziert. Insbesondere zeigte sich u.a. eine veränderte posttranslationale Prozessierung einiger Cathepsin D-Mutanten, wobei Cathepsin D in seiner Funktion auf eine korrekte intrazelluläre Prozessierung seiner Prepro-Form (53 kDa) in die reife, intralysosomale Form (33 kDa, schweres Fragment) angewiesen ist. In Tiermodellen der Cathepsin D-Defizienz ergaben sich Hinweise auf verschiedene, dem neuronalen Phänotyp bei NCL Typ 10 zugrunde liegende biochemische Pathomechanismen, vorrangig eine Beeinträchtigung der zellulären Apoptose bzw. der zellulären Autophagie. Dabei erscheint aufgrund der Funktion von Cathepsin D als lysosomale Aspartatprotease eine Beeinträchtigung des autophagolysosomalen Systems wahrscheinlich. Bei Autophagie handelt es sich um einen intrazellulären, zwischen Spezies konservierten und mehrschrittigen Prozess der zellulären Proteinhomöostase und des Zellorganellenumsatzes. Zu degradierendes intrazelluläres Material wird hierbei von einer doppelten Zellmembran unter Bildung sog. Autophagosomen umschlossen, die mit Lysosomen zu sog. Autophagolysosomen fusionieren. In letzteren erfolgt die eigentliche (proteolytische) Degradation des Zellmaterials mit kontrollierter Freisetzung resultierender Makromoleküle. In ihrer Gesamtheit werden die einzelnen Schritte der Autophagie auch als autophagozytotischer Fluss (engl. *autophagic flux*) bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Cathepsin D-Mutanten in einem heterologen Expressisonssystem in primär Cathepsin D-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) durch Lipofektion mit dem Plasmid pEF3-zeo stabil exprimiert. Dabei handelte es sich um sieben vorbeschriebene und eine im Rahmen dieser Arbeit erstmals charakterisierte Mutation (p.K331del). Ziel war es, nach einer weiteren lentiviralen Transduktion der transfizierten, die Cathepsin D-Mutanten exprimierenden MEF zur Expression von Tandem-fluoreszentem LC3 (mCherry-GFP-LC3) die Auswirkungen der Mutationen auf die zelluläre Autophagie zu untersuchen. Dabei war von besonderem Interesse, ob durch Mutationen der lysosomalen Aspartatprotease Cathepsin D vorrangig die Degradationsphase der zellulären Autophagie in Autophagolysosomen beeinträchtigt ist. Hierbei stellte die Markierung von LC3 mit mCherry und GFP prinzipiell eine Methode dar, mit welcher der gesamte autophagozytotische Fluss abgebildet werden kann. Nach Transfektion der murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zeigte sich eine unterschiedliche posttranslationale Prozessierung der verschiedenen Cathepsin D-Mutanten. Fluoreszenzmikroskopisch zeigten

vier der untersuchten Mutanten eine Kolokalisation mit dem lysosomalen Protein LAMP I (CD 107a), zwei ein nicht lysosomal lokalisiertes Fluoreszenzsignal für Cathepsin D und weitere zwei kein Fluoreszenzsignal für die lysosomale Protease. Nach Transduktion mit mCherry-GFP-LC3 erfolgte eine Induktion der nicht selektiven, zellulären Autophagie durch Nährstoffentzug mittels Kultivierung in Earle-Salze (EBSS, *Earle's balanced salt solution*). Die Funktionalität der Methode wurde durch gleichzeitige Exposition gegenüber Bafilomycin A1, einem Autophagosomen-Lysosomen-Fusionshemmer, überprüft. Hier stellten sich erwartungsgemäß fluoreszenzmikroskopisch keine roten Signale, d.h. keine Autophagolysosomen, dar. Sowohl nach Autophagieinduktion durch Nährstoffentzug als auch nach einer sich daran anschließenden Kultivierungsphase in Standardkulturmedium zeigten mit dem Vektor pEF3-zeo ohne codierendes Insert transfizierte MEF und die mit den Cathepsin D-Mutanten transfizierten MEF im Median höhere Autophagolysosomenzahlen pro Zellfläche im Vergleich zu Cathepsin D-Wildtyp exprimierenden Zellen. Somit gelang im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis eines gestörten autophagozytotischen Flusses, der möglicherweise durch eine verzögerte Rückbildungsdynamik der Autophagolysosomen für die untersuchten Cathepsin D-Mutanten in einem heterologen Expressionssystem in MEF verursacht wird. Eine genauere Lokalisation des Defektes innerhalb des autophagozytotischen Flusses für die untersuchten Cathepsin D-Mutanten ermöglicht für die NCL Typ 10 in der Zukunft potenziell die Entwicklung gezielterer, Autophagie-modulierender Therapien. Dies erscheint trotz der Tatsache, dass für Cathepsin D eine Machbarkeitsstudie des Enzymersatzes im Mausmodell existiert, im Sinne zukünftiger synergistischer Therapieansätze mit Enzymersatz und Autophagiemodulation relevant.

English version

The subtypes of neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) cumulatively represent the most common cause of neurodegeneration in children and adolescents. These disorders are characterized by progressive intraneuronal accumulation of lipofuscin, proteinaceous material of varying biochemical composition. In some animal species, mutations in the lysosomal aspartic protease cathepsin D have been described to lead to the recapitulation of the neuropathological hallmarks of NCL. Subsequently, total or partial loss of cathepsin D activity has likewise been identified in case reports as the cause of NCL type 10 in humans. In particular, defective posttranslational processing of cathepsin D was observed for some mutants, with cathepsin D relying for its function on proper intracellular processing from its prepro-form (53 kDa) into the mature intralysosomal form (33 kDa, heavy fragment). Animal models of cathepsin D deficiency revealed several possible biochemical pathomechanisms underlying neurodegeneration in NCL type 10, primarily impairment of autophagy and apoptosis.

Due to the function of cathepsin D as lysosomal aspartate protease, a disruption of the autophagy-lysosome pathway appears likely. Autophagy represents an intracellular pathway of protein homeostasis and organelle turnover that is conserved among species and occurs in multiple steps. Intracellular material to be degraded is enclosed by a double cell membrane to form so-called autophagosomes which consecutively fuse with lysosomes to become autophagolysosomes. In the latter, the actual (proteolytic) degradation of the cell material takes place with controlled release of resulting macromolecules. In their entirety, the individual steps of cellular autophagy are also referred to as autophagic flux. In this study, several cathepsin D mutations were stably expressed in a heterologous expression system in primarily cathepsin D-deficient murine embryonic fibroblasts (MEF) by lipofection with plasmid vector pEF3-zeo. Among these were seven previously described mutations and one mutation that was characterized for the first time in this study (p.K331del). The aim was to investigate the effect of cathepsin D mutations on cellular autophagy after additional lentiviral transduction of the transfected MEF to coexpress tandem-fluorescent LC3 (mCherry-GFP-LC3). Of particular interest was whether mutations of the lysosomal aspartate protease cathepsin D primarily impair the autophagolysosomal degradation, i. e. the later steps within the autophagic flux. In this context, tandem fluorescent labelling of LC3 with mCherry and GFP provided a method by which the entire autophagic flux could be monitored. Transfection of the MEF revealed distinct posttranslational processing of the cathepsin D mutants. In fluorescence microscopy, four of the mutants showed colocalization with the lysosomal marker LAMP I (CD 107a), whereas two depicted a non-lysosomal fluorescent signal, and another two showed no fluorescent signal for cathepsin D at all.

Lentiviral transduction with mCherry-GFP-LC3 of the transfected MEF was followed by induction of autophagy by cultivation under nutrient-deprived conditions in *Earle's balanced salt solution* (EBSS). Functionality of the applied method was tested by simultaneous exposition to bafilomycin A1, an inhibitor of autophagosome lysosome fusion. As expected, no red fluorescent signals, i. e. no autophagolysosomes, presented themselves by fluorescent microscopy. After induction of autophagy by starvation as well as after nutrient deprivation followed by cultivation under nutrient-rich standard conditions, MEF that had been either transfected with cathepsin D mutants or with the vector pEF3-zeo without coding insert showed higher median numbers of autophagolysosomes per cell area when compared to cells expressing the cathepsin D wildtype. Thus, this work provided evidence of impaired autophagocytotic flux possibly caused by decelerated regression of autophagolysosomes for the cathepsin D mutants studied in a heterologous expression system in MEF. A more precise localization of the defect within the autophagic flux for the studied cathepsin D mutants will potentially allow the development of autophagy-modulating therapies for NCL type 10 in the future. This seems relevant in terms of future synergistic therapeutic approaches with enzyme replacement and autophagy modulation, despite the fact that a feasibility study of enzyme replacement exists for cathepsin D in a mouse model.

6 Literaturverzeichnis

Arodola O, Soliman M (2016): Molecular Dynamics Simulations of Ligand-Induced Flap Conformational Changes in Cathepsin-D - A Comparative Study. J Cell Biochem 117, 9999

Ashe KM, Taylor KM, Chu Q, Meyers E, Ellis A, Jingozyan V, Klinger K, Finn PF, Cooper CGF, Chuang W-L, et al. (2010): Inhibition of glycogen biosynthesis via mTORC1 suppression as an adjunct therapy for Pompe disease. Mol Genet Metab 100, 309–15

Awano T, Katz ML, O'Brien DP, Taylor JF, Evans J, Khan S, Sohar I, Lobel P, Johnson GS (2006): A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis. Mol Genet Metab 87, 341–8

Bae E-J, Yang NY, Lee C, Kim S, Lee H-J, Lee S-J (2015): Haploinsufficiency of cathepsin D leads to lysosomal dysfunction and promotes cell-to-cell transmission of α-synuclein aggregates. Cell Death Dis 6, 1901

Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur MV, Sowder RC, Cachau RE, Collins J, Silva AM, Erickson JW (1993): Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. Proc Natl Acad Sci USA 90, 6796–800

Baranski TJ, Faust PL, Kornfeld S (1990): Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. Cell 63, 281–91

Barth S, Glick D, Macleod KF (2010): Autophagy: assays and artifacts. J Pathol 221, 117–24

Benes P, Vetvicka V, Fusek M (2008): Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. Crit Rev Oncol Hematol 68, 12–28

Bunk J, Prieto Huarcaya S, Drobny A, Dobert JP, Walther L, Rose-John S, Arnold P, Zunke F (2021): Cathepsin D Variants Associated with Neurodegenerative Diseases Show Dysregulated Functionality and Modified α-Synuclein Degradation Properties. Front Cell Dev Biol 9, 581805

Butler VJ, Cortopassi WA, Argouarch AR, Ivry SL, Craik CS, Jacobson MP, Kao AW (2019): Progranulin stimulates the in vitro maturation of pro-cathepsin D at acidic pH. J Mol Biol 431, 1038–47

Cantor AB, Baranski TJ, Kornfeld S (1992): Lysosomal enzyme phosphorylation. II. Protein recognition determinants in either lobe of procathepsin D are sufficient for phosphorylation of both the amino and carboxyl lobe oligosaccharides. J Biol Chem 267, 23349–56

Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, Morales CR (2008): Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. Biochem Biophys Res Commun 373, 292–7

Capony F, Braulke T, Rougeot C, Roux S, Montcourrie P, Rochefort H (1994): Specific Mannose-6-Phosphate Receptor-Independent Sorting of Pro-Cathepsin D in Breast Cancer Cells. Exp Cell Res 215, 154–63

Chang J-W, Choi H, Cotman SL, Jung Y-K (2011): Lithium rescues the impaired autophagy process in CbCln3Δex7/8/Δex7/8 cerebellar cells and reduces neuronal vulnerability to cell death via IMPase inhibition. J Neurochem 116, 659–68

Chartier S, Boutaud L, Le Guillou E, Alby C, Billon C, Millischer A, Caillaud C, Galmiche L, Mechler C, Sonigo P, et al. (2021): Prenatal-onset of congenital neuronal ceroid lipofuscinosis with a novel CTSD mutation. Birth Defects Res 113, 1324–32

Choi AMK, Ryter SW, Levine B (2013): Autophagy in Human Health and Disease. N Engl J Med 368, 651–62

Ciechomska IA, Tolkovsky AM (2007): Non-autophagic GFP-LC3 puncta induced by saponin and other detergents. Autophagy 3, 586–90

Crabtree D, Dodson M, Ouyang X, Boyer-Guittaut M, Liang Q, Ballestas ME, Fineberg N, Zhang J (2014): Overexpression of an inactive mutant cathepsin D increases endogenous alpha-synuclein and cathepsin B activity in SH-SY5Y cells. J Neurochem 128, 950-61

Cuervo AM, Dice JF (1996): A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science 273, 501–3

Cuervo AM, Wong E (2014): Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. Cell Res 24, 92–104

Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, Boston H, Saftig P, Woulfe J, Feany MB, et al. (2009): Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. Mol Brain 2, 5

Davies DR (1990): The structure and function of the aspartic proteinases. Annu Rev Biophys Biophys Chem 19, 189–215

Dennemärker J, Lohmüller T, Müller S, Aguilar SV, Tobin DJ, Peters C, Reinheckel T (2010): Impaired turnover of autophagolysosomes in cathepsin L deficiency. Biol Chem 391, 913–22

Di Spiezio A, Marques ARA, Schmidt L, Thießen N, Gallwitz L, Fogh J, Bartsch U, Saftig P (2021): Analysis of cathepsin B and cathepsin L treatment to clear toxic lysosomal protein aggregates in neuronal ceroid lipofuscinosis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1867, 166205

Doccini S, Sartori S, Maeser S, Pezzini F, Rossato S, Moro F, Toldo I, Przybylski M, Santorelli FM, Simonati A (2016): Early infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN10 disease) associated with a novel mutation in CTSD. J Neurol 263, 1029–32

Dunn WA (1990): Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. J Cell Biol 110, 1935–45

Erickson AH, Conner GE, Blobel G (1981): Biosynthesis of a lysosomal enzyme. Partial structure of two transient and functionally distinct NH2-terminal sequences in cathepsin D. J Biol Chem 256, 11224–31

Eskelinen E-L (2005): Maturation of Autophagic Vacuoles in Mammalian Cells. Autophagy 1, 1–10

Follo C, Castino R, Nicotra G, Trincheri NF, Isidoro C (2007): Folding, activity and targeting of mutated human cathepsin D that cannot be processed into the double-chain form. Int J Biochem Cell Biol 39, 638–49

Follo C, Ozzano M, Mugoni V, Castino R, Santoro M, Isidoro C (2011): Knock-Down of Cathepsin D Affects the Retinal Pigment Epithelium, Impairs Swim-Bladder Ontogenesis and Causes Premature Death in Zebrafish. PLoS One 6, 21908

Fortenberry SC, Schorey JS, Chirgwin JM (1995): Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. J Cell Sci 108, 2001–6

Fritchie K, Siintola E, Armao D, Lehesjoki A-E, Marino T, Powell C, Tennison M, Booker JM, Koch S, Partanen S, et al. (2008): Novel mutation and the first prenatal screening of cathepsin D deficiency (CLN10). Acta Neuropathol 117, 201

Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008): The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. Mol Biol Cell 19, 2092–100

Gieselmann V, Hasilik A, von Figura K (1985): Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. J Biol Chem 260, 3215–20

Glick D, Barth S, Macleod KF (2010): Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol 221, 3–12

Gordon PB, Seglen PO (1988): Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. Biochem Biophys Res Commun 151, 40–7

Haapanen A, Ramadan UA, Autti T, Joensuu R, Tyynelä J (2007): In vivo MRI reveals the dynamics of pathological changes in the brains of cathepsin D-deficient mice and correlates changes in manganese-enhanced MRI with microglial activation. Magn Reson Imaging 25, 1024–31

Haltia M (2003): The neuronal ceroid-lipofuscinoses. J Neuropathol Exp Neurol 62, 1–13

Haltia M (2006): The neuronal ceroid-lipofuscinoses: From past to present. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1762, 850-6

Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y (2007): The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J Biol Chem 282, 37298–302

Hasilik A, Neufeld EF (1980): Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. J Biol Chem 255, 4937–45

Hersheson J, Burke D, Clayton R, Anderson G, Jacques TS, Mills P, Wood NW, Gissen P, Clayton P, Fearnley J, et al. (2014): Cathepsin D deficiency causes juvenile-onset ataxia and distinctive muscle pathology. Neurology 83, 1873–5

Horst M, Hasilik A (1991): Expression and maturation of human cathepsin D in baby-hamster kidney cells. Biochem J 273(Pt 2), 355–61

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, et al. (2009): Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. Mol Biol Cell 20, 1981–91

Hossain MI, Marcus JM, Lee JH, Garcia PL, Singh V, Shacka JJ, Zhang J, Gropen TI, Falany CN, Andrabi SA (2021): Restoration of CTSD (cathepsin D) and lysosomal function in stroke is neuroprotective. Autophagy 17, 1330–48

Jabs S, Quitsch A, Käkelä R, Koch B, Tyynelä J, Brade H, Glatzel M, Walkley S, Saftig P, Vanier MT, Braulke T (2008): Accumulation of bis(monoacylglycero)phosphate and gangliosides in mouse models of neuronal ceroid lipofuscinosis. J Neurochem 106, 1415–25

Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen E-L (2004): Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. J Cell Sci 117, 4837–48

Jalanko A, Braulke T (2009): Neuronal ceroid lipofuscinoses. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1793, 697–709

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J 19, 5720–8

Kaufmann A, Beier V, Franquelim HG, Wollert T (2014): Molecular Mechanism of Autophagic Membrane-Scaffold Assembly and Disassembly. Cell 156, 469–81

Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2007): Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy 3, 452–60

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy 8, 445–544

Koch S, Molchanova SM, Wright AK, Edwards A, Cooper JD, Taira T, Gillingwater TH, Tyynelä J (2011): Morphological and Functional Correlates of Synaptic Pathology in the Cathepsin D Knock-Out Mouse Model of Congenital Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. J Neuropathol Exp Neurol 70, 1089–96

Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, et al. (2000): Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. J Neurosci 20, 6898–906

Koike M, Shibata M, Ohsawa Y, Nakanishi H, Koga T, Kametaka S, Waguri S, Momoi T, Kominami E, Peters C, et al. (2003): Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. Mol Cell Neurosci 22, 146–61

Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, et al. (2005): Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). Am J Pathol 167, 1713–28

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006): Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. Nature 441, 880–4

Kuma A, Matsui M, Mizushima N (2007): LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. Autophagy 3, 323–8

Kyttälä A, Lahtinen U, Braulke T, Hofmann SL (2006): Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1762, 920–33

Lamark T, Johansen T (2021): Mechanisms of Selective Autophagy. Annu Rev Cell Dev Biol 37, 143–69

Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013): The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat Rev Mol Cell Biol 14, 759–74

Laurent-Matha V, Derocq D, Prébois C, Katunuma N, Liaudet-Coopman E (2006): Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. J Biochem 139, 363–71

Lee AY, Gulnik SV, Erickson JW (1998): Conformational switching in an aspartic proteinase. Nat Struct Biol 5, 866–71

Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang H-G (2010): The Association of AMPK with ULK1 Regulates Autophagy. PLoS ONE 5, 15394

Levine B, Kroemer G (2008): Autophagy in the Pathogenesis of Disease. Cell 132, 27–42

Lizama BN, Chu CT (2021): Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease. Mol Aspects Med 82, 100972

Mann SS, Hammarback JA (1994): Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. J Biol Chem 269, 11492–97

Marques ARA, Di Spiezio A, Thießen N, Schmidt L, Grötzinger J, Lüllmann-Rauch R, Damme M, Storck SE, Pietrzik CU, Fogh J, et al. (2019): Enzyme replacement therapy with

recombinant pro-CTSD (cathepsin D) corrects defective proteolysis and autophagy in neuronal ceroid lipofuscinosis. Autophagy 1–15

Mauvezin C, Neufeld TP (2015): Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. Autophagy 11, 1437–8

Mehanna S, Suzuki C, Shibata M, Sunabori T, Imanaka T, Araki K, Yamamura K, Uchiyama Y, Ohmuraya M (2016): Cathepsin D in pancreatic acinar cells is implicated in cathepsin B and L degradation, but not in autophagic activity. Biochem Biophys Res Commun 469, 405–11

Metcalf P, Fusek M (1993): Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. EMBO J 12, 1293–302

Meyer S, Yilmaz U, Kim Y-J, Steinfeld R, Meyberg-Solomayer G, Oehl-Jaschkowitz B, Tzschach A, Gortner L, Igel J, Schofer O (2015): Congenital CLN disease in two siblings. Wien Med Wochenschr 165, 210–13

Mitchison HM, Lim MJ, Cooper JD (2004): Selectivity and types of cell death in the neuronal ceroid lipofuscinoses. Brain Pathol 14, 86–96

Mizushima N (2007): Autophagy: process and function. Genes Dev 21, 2861–73

Mizushima N, Yoshimori T (2007): How to Interpret LC3 Immunoblotting. Autophagy 3, 542–5

Mizushima N, Klionsky DJ (2007): Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. Annu Rev Nutr 27, 19–40

Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001): Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. J Cell Biol 152, 657–68

Mizushima N, Yoshimorim T, Levine B (2010): Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell 140, 313–26

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011): The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. Annu Rev Cell Dev Biol 27, 107–32

Mutka A-L, Haapanen A, Käkelä R, Lindfors M, Wright AK, Inkinen T, Hermansson M, Rokka A, Corthals G, Jauhiainen M, et al. (2010): Murine cathepsin D deficiency is associated with dysmyelination/myelin disruption and accumulation of cholesteryl esters in the brain. J Neurochem 112, 193–203

Myllykangas L, Tyynelä J, Page-McCaw A, Rubin GM, Haltia MJ, Feany MB (2005): Cathepsin D-deficient Drosophila recapitulate the key features of neuronal ceroid lipofuscinoses. Neurobiol Dis 19, 194–9

Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, von Figura K, Peters C, Yamamoto K, Saftig P, Uchiyama Y (2001): Involvement of Nitric Oxide Released from Microglia–Macrophages in Pathological Changes of Cathepsin D-Deficient Mice. J Neurosci 21, 7526–33

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 A 42, 561–7

Palmieri M, Pal R, Nelvagal HR, Lotfi P, Stinnett GR, Seymour ML, Chaudhury A, Bajaj L, Bondar VV, Bremner L, et al. (2017): mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. Nat Commun 8, 14338

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T (2007): p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J Biol Chem 282, 24131–45

Parenti G, Andria G, Ballabio A (2015): Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. Annu Rev Med 66, 471–86

Partanen S, Storch S, Löffler H-G, Hasilik A, Tyynelä J, Braulke T (2003): A replacement of the active-site aspartic acid residue 293 in mouse cathepsin D affects its intracellular stability, processing and transport in HEK-293 cells. Biochem J 369, 55–62

Prieto Huarcaya S, Drobny A, Marques ARA, Di Spiezio A, Dobert JP, Balta D, Werner C, Rizo T, Gallwitz L, Bub S, et al. (2022): Recombinant pro-CTSD (cathepsin D) enhances SNCA/α-Synuclein degradation in α-Synucleinopathy models. Autophagy 18, 1127–51

Redecker B, Heckendorf B, Grosch H-W, Mersmann G, Hasilik A (1991): Molecular Organization of the Human Cathepsin D Gene. DNA Cell Biol 10, 423–31

Regensburger M, Minakaki G, Kettwig M, Huchzermeyer C, Eisenhut F, Haack TB, Kohl Z, Winkler J (2020): Novel Biallelic CTSD Gene Variants Cause Late-Onset Ataxia and Retinitis Pigmentosa. Mov Disord 35, 1280–2

Rijnboutt S, Kal AJ, Geuze HJ, Aerts H, Strous GJ (1991): Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. J Biol Chem 266, 23586–92

Robak LA, Jansen IE, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, Jankovic J, Heutink P, Shulman JM (2017): Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease. Brain 140, 3191–203

Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, Klionsky DJ (2009): In search of an „autophagomometer". Autophagy 5, 585–9

Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Köster A, Hess B, Evers M, von Figura K (1995): Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. EMBO J 14, 3599–608

Samarel AM, Ferguson AG, Decker RS, Lesch M (1989): Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation. Am J Physiol-Cell Physiol 257, C1069–79

Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Winslow AR, Rubinsztein DC (2009): Methodological considerations for assessing autophagy modulators: A study with calcium phosphate precipitates. Autophagy 5, 307–13

Sarkar S, Carroll B, Buganim Y, Maetzel D, Ng AHM, Cassady J, Cohen M, Chakraborty S, Wang H, Spooner E, et al. (2013): Impaired autophagy in the lipid storage disorder Niemann–Pick type C1 disease. Cell Rep 5, 1302–15

Scarborough P, Dunn B (1994): Redesign of the substrate specificity of human cathepsin D: the dominant role of position 287 in the S2 subsite. Protein Eng Des Sel 7, 495-502

Schorey JS, Fortenberry SC, Chirgwin JM (1995): Lysine residues in the C-terminal lobe and lysosomal targeting of procathepsin D. J Cell Sci 108, 2007–15

Schulz A, Ajayi T, Specchio N, de Los Reyes E, Gissen P, Ballon D, Dyke JP, Cahan H, Slasor P, Jacoby D, Kohlschütter A (2018): Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease. N Engl J Med 378, 1898–907

Seehafer SS, Pearce DA (2006): You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. Neurobiol Aging 27, 576–88

Seranova E, Connolly KJ, Zatyka M, Rosenstock TR, Barrett T, Tuxworth RI, Sarkar S (2017): Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases. Essays Biochem 61, 733–49

Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampanato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A (2008): A block of autophagy in lysosomal storage disorders. Hum Mol Genet 17, 119–29

Shacka JJ, Roth KA (2007): Cathepsin D deficiency and NCL/Batten disease: there's more to death than apoptosis. Autophagy 3, 474–76

Shacka JJ, Klocke BJ, Young C, Shibata M, Olney JW, Uchiyama Y, Saftig P, Roth KA (2007): Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. J Neurosci 27, 2081–90

Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, MacDonald M, Yankner B, Yuan J (2006): Regulation of intracellular accumulation of mutant Huntingtin by Beclin 1. J Biol Chem 281, 14474–85

Siintola E, Partanen S, Strömme P, Haapanen A, Haltia M, Maehlen J, Lehesjoki A-E, Tyynelä J (2006): Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. Brain 129, 1438–45

Simonati A, Williams RE (2022): Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: The Multifaceted Approach to the Clinical Issues, an Overview. Front Neurol 13, 811686

Steinfeld R, Reinhardt K, Schreiber K, Hillebrand M, Kraetzner R, Bruck W, Saftig P, Gartner J (2006): Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder. Am J Hum Genet 78, 988–98

Stroikin Y, Dalen H, Lööf S, Terman A (2004): Inhibition of autophagy with 3-methyladenine results in impaired turnover of lysosomes and accumulation of lipofuscin-like material. Eur J Cell Biol 83, 583–90

Takahiko K, Koichi H, Shinsei G, Tetsuya F, Shiro M, Tamotsu M, Akira M (1992): Proteolytic processing sites producing the mature form of human cathepsin D. Int J Biochem 24, 1487–91

Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004): LC3 conjugation system in mammalian autophagy. Int J Biochem Cell Biol 36, 2503–18

Tayebi N, Lopez G, Do J, Sidransky E (2020): Pro-cathepsin D, Prosaposin, and Progranulin: Lysosomal Networks in Parkinsonism. Trends Mol Med 26, 913–23

Tyynelä J, Palmer DN, Baumann M, Haltia M (1993): Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. FEBS Lett 330, 8–12

Tyynelä J, Sohar I, Sleat DE, Gin RM, Donnelly RJ, Baumann M, Haltia M, Lobel P (2000): A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration. EMBO J 19, 2786–92

University College London (2019): NCL Mutation Database. https://www.ucl.ac.uk/ncl/SummaryTableMay2015.htm, Zugriff am 28.10.2023

Vargas JNS, Wang C, Bunker E, Hao L, Maric D, Schiavo G, Randow F, Youle RJ (2019): Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. Mol Cell 74, 347-62

Vargas JNS, Hamasaki M, Kawabata T, Youle RJ, Yoshimori T (2023): The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. Nat Rev Mol Cell Biol 24, 167–85

Varvagiannis K, Hanquinet S, Billieux M, De Luca R, Rimensberger P, Lidgren M, Guipponi M, Makrythanasis P, Blouin J, Antonarakis S, et al. (2018): Congenital Neuronal Ceroid Lipofuscinosis with a Novel CTSD Gene Mutation: A Rare Cause of Neonatal-Onset Neurodegenerative Disorder. Neuropediatrics 49, 150–3

Vetvicka V, Vetvickova J, Hilgert I, Voburka Z, Fusek M (1997): Analysis of the interaction of procathepsin D activation peptide with breast cancer cells. Int J Cancer 73, 403–9

Vetvicka V, Vetvickova J, Fusek M (1998): Effect of procathepsin D and its activation peptide on prostate cancer cells. Cancer Lett 129, 55–9

Vetvicka V, Vetvickova J, Benes P (2004): Role of enzymatically inactive procathepsin D in lung cancer. Anticancer Res 24, 2739–43

Vidoni C, Follo C, Savino M, Melone MAB, Isidoro C (2016): The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. Med Res Rev 36, 845–70

von Figura K, Hasilik A (1986): Lysosomal Enzymes and Their Receptors. Annu Rev Biochem 55, 167–93

Walls KC, Klocke BJ, Saftig P, Shibata M, Uchiyama Y, Roth KA, Shacka JJ (2007): Altered Regulation of Phosphatidylinositol 3-kinase Signaling in Cathepsin D-Deficient Brain. Autophagy 3, 222–9

Williams RE, Mole SE (2012): New nomenclature and classification scheme for the neuronal ceroid lipofuscinoses. Neurology 79, 183–91

Wirth M, Joachim J, Tooze SA (2013): Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. Semin Cancer Biol 23, 301–9

Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006): Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy. Mol Biol Cell 17, 5094–104

Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E-L (2009): 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. Autophagy 5, 1180–5

Yonezawa S, Takahashi T, Wang XJ, Wong RN, Hartsuck JA, Tang J (1988): Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D. J Biol Chem 263, 16504–11

Zeman W, Dyken P (1969): Neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): relationship to amaurotic family idiocy? Pediatrics 44, 570-83

Zhu Y, Conner GE (1994): Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. J Biol Chem 269, 3846–51

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Annika Wolf, die mir als direkte Betreuerin zur Seite stand und mit ihren zahlreichen Ideen, konzeptionellen Anregungen und Lösungsansätzen für wissenschaftliche Probleme entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Auch für die tatkräftige Unterstützung bei der Datenauswertung möchte ich ihr ausdrücklich danken.

Ferner möchte ich Prof. Dr. Dr. med. Robert Steinfeld als meinem Doktorvater für die Möglichkeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen danken, diese Arbeit mit seiner Unterstützung anfertigen zu können. Besonders möchte ich hierbei für die Überlassung der interessanten wissenschaftlichen Fragestellung danken.

Für die Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Kristina Bersch, Kristina Lang, Uta Bickmeyer und Leonie Herholz bedanken, die mir in vielen Situationen mit ihrer Expertise und ihrem umfangreichen Wissen zur Seite standen.

Tanja Wilke und Kathrin Schreiber möchte ich ausdrücklich für die Unterstützung und die zahlreichen Ratschläge bei der Arbeit im Labor danken.

Zuletzt gebührt mein Dank Dr. med. Johanna Leyhe für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und ihre redaktionellen Hinweise.

Lebenslauf

Ich, Ole Lehmbäcker, wurde am 09.11.1992 in Berlin geboren. Bereits früh in meiner Kindheit zog ich nach Hamburg, wo ich meine Schulzeit verbrachte. Nach Besuch des Helene-Lange-Gymnasiums in Hamburg-Eimsbüttel erlangte ich im Sommer 2011 die allgemeine Hochschulreife. Im Anschluss absolvierte ich einen Bundesfreiwilligendienst (BFD) im Berufsgenossenschaftlichen Unfallkrankenhaus Hamburg-Bergedorf auf einer Station für Querschnittgelähmte.

Im Wintersemester 2012/13 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Jahr 2017 nahm ich die Arbeit an meinem Promotionsvorhaben auf. Mein Praktisches Jahr begann ich im Mai 2018 in der chirurgischen Klinik des Krankenhauses Franz Trappeiner in Meran (Italien), gefolgt von einem Aufenthalt in der bariatrischen Abteilung des Aberdeen Royal Infirmary in Aberdeen, Schottland (Vereinigtes Königreich), im Rahmen des PJ. Das zweite Tertial absolvierte ich in der Inneren Medizin der Universitätsmedizin Göttingen (UMG), das dritte Tertial in der neurologischen Klinik des St. Vincenz Krankenhauses Paderborn.

Im Frühjahr 2019 schloss ich das Medizinstudium mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich ab und erhielt meine Approbation als Arzt im Juli 2019. Seit November 2019 arbeite ich als Assistenzarzt in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG).