

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Aus der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“

Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Sektionsleiter: Prof. Dr. Dr. Andreas Hermann

Themenvergebender Hochschullehrer: PD Dr. phil. nat. habil. Moritz Frech

**Untersuchungen über den Einfluss eines gestörten
Organellentransports auf die Autophagie und Mitophagie im
Morbus Niemann Pick Typ C, unter Verwendung eines
humanen Zellmodells aus Patienten-spezifischen neural
differenzierten induzierten pluripotenten Stammzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Doctor rerum humanarum)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Maik Liedtke, geb. am 17.04.1993 in Gelsenkirchen

Rostock, 20.06.2022

ERSTGUTACHTER

PD Dr. phil. nat. habil. Moritz J. Frech

Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Sektion für
Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“

ZWEITGUTACHTER

Prof. Dr. med. Andreas Wree

Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie

DRITTGUTACHTER

Prof. Dr. Anja Bräuer

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Fakultät VI - Medizin
und Gesundheitswissenschaften

DATUM DER VERTEIDIGUNG

31.01.2023

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	- 1 -
1.1 Niemann-Pick Typ C	- 1 -
1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen als Modellsystem für NP-C	- 3 -
1.3 Mitochondrien und Neurodegeneration	- 5 -
1.3.1 Morphologie und Funktion von Mitochondrien	- 5 -
1.3.2 Transport von Mitochondrien in neurodegenerativen Erkrankungen.....	- 8 -
1.4 Defekte der Autophagie als charakteristisches Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen	- 11 -
1.5 Mitophagie und Neurodegeneration.....	- 17 -
2 Zielsetzung	- 20 -
3 Material und Methoden	- 22 -
3.1 Zellkultur	- 22 -
3.1.1 Verwendete Zelllinien.....	- 22 -
3.1.2 Kultivierung neuraler Progenitorzellen (NPZs) und neural differenzierter Zellen (NDZs).....	- 22 -
3.1.3 Behandlung der Zellen	- 23 -
3.2 Immunfluoreszenz-Färbungen.....	- 23 -
3.3 Transduktion lebender Zellen	- 24 -
3.4 Fluoreszenz-basierte Auswertungsmethoden.....	- 25 -
3.4.1 Kolokalisationsanalyse	- 25 -
3.4.2 Bestimmung des Anteils gebildeter Autolysosomen	- 25 -
3.5 Untersuchung des Transports von Organellen	- 26 -
3.5.1 Live-Cell-Imaging	- 26 -
3.5.2 Bewegungsanalyse von Zellorganellen.....	- 26 -
3.5.3 Filtern der Rohdaten und Grenzwertfindung	- 28 -
3.5.4 Berechnung des Z-Scores und der Stopps	- 29 -

Inhaltsverzeichnis

3.6 Untersuchung der mitochondrialen Morphologie und Funktion.....	- 30 -
3.6.1 Untersuchung der mitochondrialen Morphologie.....	- 30 -
3.6.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials.....	- 31 -
3.6.3 Bestimmung der ATP-Konzentration.....	- 32 -
3.7 Proteinbiochemische Methoden	- 32 -
3.7.1 Proteinextraktion	- 32 -
3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	- 33 -
3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	- 33 -
3.7.4 Western Blot	- 34 -
3.8 Statistik	- 34 -
4 Ergebnisse	- 36 -
4.1 Untersuchung der Morphologie und Funktion von Mitochondrien...	- 36 -
4.2 Analyse der Funktion von Mitochondrien.....	- 38 -
4.3 Transport von Mitochondrien	- 44 -
4.4 Degradation von Mitochondrien durch Mitophagie	- 47 -
4.5 Analyse der Autophagie.....	- 56 -
4.6 Analyse des Transports von Lysosomen und Autophagosomen	- 62 -
4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse	- 66 -
5 Diskussion.....	- 68 -
5.1 Morphologie und Funktion von Mitochondrien	- 68 -
5.2 Transport von Mitochondrien	- 72 -
5.3 Defekte in Mitophagie und Autophagie	- 75 -
5.4 Organellentransport bei der Mitophagie und Autophagie.....	- 83 -
6 Zusammenfassung.....	- 89 -
7 Literaturverzeichnis	- 91 -
8 Abbildungsverzeichnis	- 116 -
9 Tabellenverzeichnis	- 117 -
10 Abkürzungsverzeichnis	- 118 -

11 Anhang.....	- 121 -
11.1 Verwendete Materialien	- 121 -
11.1.1 Verbrauchsmaterialien	- 121 -
11.1.2 Geräte	- 121 -
11.1.3 Chemikalien und Reagenzien	- 122 -
11.1.4 Puffer und Lösungen.....	- 123 -
11.1.5 Medien	- 124 -
11.1.6 Kits	- 125 -
11.1.7 Antikörper.....	- 125 -
11.1.8 Software.....	- 126 -
11.2 Publikationen	- 127 -
11.3 Tagungsbeiträge.....	- 127 -
12 Danksagung.....	- 128 -
13 Lebenslauf.....	- 129 -

1 Einleitung

1.1 Niemann-Pick Typ C

Der Morbus Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte, monogenetische neurodegenerative Erkrankung. Die Prävalenz liegt im Durchschnitt bei 1/120 000 Geburten, ist über alle ethnischen Gruppen verteilt, variiert jedoch von Land zu Land sehr stark (Patterson, 2001). Die Krankheit zeigt keine Genotyp-Phänotyp Korrelation und zeichnet sich durch ein sehr heterogenes Spektrum an Symptomen aus. Dabei zeigen die Patienten sowohl eine viszerale, mit Symptomen wie z.B. einer Hepatosplenomegalie, als auch eine neurologische Ausprägung, welche durch Hypotonie, Verlust motorischer Fähigkeiten, Ataxie, Krämpfe, Schluckstörungen (Dysphagie), Sprechstörungen (Dysathrie), die vertikale supranukleäre Blickparese (engl. vertical supranuclear gaze palsy, VSGP) und Demenz gekennzeichnet ist (Vanier, 2010). Hinzu kommen häufig psychische Probleme. Die Charakterisierung der Krankheit erfolgt dabei anhand des Alters in dem die ersten Symptome auftreten (Wraith & Guffon et al., 2009). Sie wird in die perinatale, infantile, juvenile (frühe und späte) und adulte Form unterteilt. Die systemischen Symptome treten dabei immer vor den neurologischen auf, sind allerdings bei 10-15% aller Erkrankten nicht vorhanden (Garver et al., 2007).

Die perinatale Form zeichnet sich, vor allem durch Erkrankungen der Leber, wie eine fötale Aszites, einer Verlängerung des Neugeborenen Ikterus und einer progressiven Hepatosplenomegalie, aus und tritt in den ersten Monaten nach der Geburt auf. Neurologische Symptome treten sehr selten auf und die Kinder versterben meist vor dem 6. Lebensmonat (Geberhiwot et al., 2018; Moreno et al., 2008). Bei der frühen-infantilen Form, treten die ersten Symptome zwischen dem 3. Lebensmonat und dem 2. Lebensjahr auf. Charakteristisch ist auch hier die Hepatosplenomegalie, gefolgt von einer verzögerten motorischen Entwicklung und Hypotonie. Bei der späten-infantilen Form, welche zwischen 2 und 6 Jahren beginnt, verlieren die Kinder hingegen ihre zuvor erlernten motorischen Fähigkeiten wieder, was sich durch häufiges Fallen und Tollpatschigkeit äußert. Hinzukommen können progressive Ataxie, Dystonie, Dysphagie und Dysarthrie. Meistens sterben die Erkrankten

1 Einleitung

zwischen dem 7. und 12. Lebensjahr (Kelly et al., 1993). Treten die ersten Symptome zwischen dem 6. und 15. Lebensjahr auf, spricht man von der juvenilen Form von NP-C. Sie ist durch eine über Jahre hinweg vorhandene Hepatosplenomegalie und eine verzögerte schulische und feinmotorische Entwicklung gekennzeichnet. Später kommen progressive Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie, Dystonie und Kataplexie, sowie die VSGP hinzu. Die juvenile Ausprägung führt meist zum Tode innerhalb der ersten 20 Lebensjahre (Imrie & Wraith, 2001). Die adulte Form wird häufig auch als „schwächere juvenile Form“ bezeichnet und tritt erst ab einem Alter von 15 Jahren auf. Besonders ist dabei die psychische Manifestation in Form von Psychosen und Depressionen (Patterson et al., 2012; Walterfang et al., 2013; Wraith & Baumgartner et al., 2009).

NP-C entsteht durch Mutationen im *NPC1-Gen* (95% der Fälle, OMIM # 257220) oder *NPC2-Gen* (5% der Fälle, OMIM # 607625) was zu einer Akkumulation von unveresterten Glykolipiden und Cholesterol in späten Endosomen (engl. late endosomes = LEs) und Lysosomen (engl. lysosomes = LYs) führt. Da die Akkumulation von krankheitsrelevanten Proteinen und Lipiden in LEs/LYs das charakteristische Merkmale der Klasse der lysosomalen Speichererkrankungen (engl. lysosomal storage diseases, LSDs) ist, wird auch NP-C dieser Klasse zugeordnet (Vance & Karten, 2014). Das *NPC1-Gen* kodiert ein 1278 Aminosäuren langes Protein mit 13 transmembran Domänen, drei großen und vier kleinen luminalen und sechs zytoplasmatischen Schleifen, sowie einem zytoplasmatischen Schwanz (Davies & Ioannou, 2000). Das *NPC2-Gen* hingegen kodiert ein lediglich 131 Aminosäuren langes lösliches Glykoprotein (Naureckiene et al., 2000), welches sich im Lumen von LEs und LYs befindet. Das NPC1- und NPC2-Protein sind zusammen für den Abtransport von Cholesterol aus diesen Organellen verantwortlich. Dabei werden zunächst durch Endozytose Lipoproteine geringer Dichte (engl. low density lipoprotein, LDL) in die LEs und LYs aufgenommen. Die lysosomale saure Lipase (engl. lysosomal acid lipase, LAL) spaltet die Cholesterolester (CE) hydrolytisch in unverestertes Cholesterol (engl. unesterified cholesterol, UC) und Fettsäuren (engl. fatty acids, FA). Das NPC2-Protein bindet UC und transportiert es zum

membranständigen NPC1-Protein. Dieses sorgt für das Ausschleusen von UC aus den LEs und LYs (Lamri et al., 2018; Pfeffer, 2019).

Bis heute sind über 500 verschiedene Mutationen im *NPC1*-Gen und 29 Mutationen im *NPC2*-Gen bekannt (Völkner, Liedtke, Hermann & Frech, 2021), von denen die meisten Missens-Mutationen sind, welche durch die Substitution von Aminosäuren zu Fehlfaltungen und zum proteasomalen Abbau der Proteine führen (Parenti, 2009). Die Diagnose für NP-C erfolgt klinisch durch den biochemischen Nachweis des akkumulierten Cholesterols mittels Filipin-Färbung an Fibroblasten von Patienten und durch Sequenzierung der beiden Gene (Polese-Bonatto et al., 2019). Allerdings sind Mutationen bekannt, die zu einem „varianten Phänotyp“ führen bei der keine bzw. nur eine geringe Akkumulation von Cholesterol nachweisbar ist (Völkner, Liedtke & Untucht et al., 2021). Seit der Entdeckung 1997 wurden bereits viele pathophysiologische Merkmale von NP-C aufgeklärt, wohingegen die Mechanismen die zur Ausprägung bestimmter Verläufe der Erkrankung führen, weiterhin nicht vollständig bekannt sind. Darüber hinaus gibt es bis heute keine heilende Therapie, was vor allem durch die geringe Prävalenz und dementsprechend geringe Anzahl an Probanden für klinische Testreihen zur Etablierung von Diagnose- und Behandlungsverfahren beeinflusst wird (Patterson & Platt, 2004). Die Verwendung von humanen *in vitro* Zellmodellsystemen zur Aufklärung von pathophysiologischen Mechanismen wird im Gegensatz dazu vor allem durch die schwierige Gewinnung von betroffenem Gewebe limitiert. So können Zellen aus Leber oder Gehirn häufig erst postmortal gewonnen werden, was eine Analyse der Progression von NP-C nahezu unmöglich macht. Eine Alternative dazu sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZs) (Völkner, Liedtke, Hermann & Frech, 2021).

1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen als Modellsystem für NP-C

Die Beschreibung der sogenannten „Yamanaka-Faktoren“ zur Reprogrammierung von Fibroblasten in unterschiedlichste Zelltypen im Jahr 2006 lieferte die erste Grundlage zur Herstellung von iPSZs (Takahashi & Yamanaka, 2006). Darauf aufbauend werden bis heute für viele lysosomale Speichererkrankungen Modelle auf Basis von iPSZs zur Aufklärung

1 Einleitung

pathophysiologischer Mechanismen und für die Testung neuer Therapieansätze verwendet (Long et al., 2016; Park et al., 2008; Trilck et al., 2013; Völkner et al., 2022). Dabei können aus nahezu allen Zelltypen krankheitsrelevante Zelltypen generiert werden. Häufig werden dazu Fibroblasten verwendet, welche durch Einbringen der „Yamanka-Faktoren“, z.B. mittels viraler Systeme, in das Stammzellstadium zurückversetzt werden. Aufgrund der Pluripotenz dieses Zelltyps können diese anschließend in nahezu alle gewünschten Zelltypen, wie Zellen des zentralen Nervensystems, differenzieren. Der Vorteil dabei ist, dass das genetische Material des Spenders der Fibroblasten unverändert bleibt und so patientenspezifische Zellsysteme aus krankheitsrelevanten Zelltypen generiert werden können, welche wiederum bei der Entwicklung neuer Behandlungs- und Interventionsstrategien Anwendung finden (Trilck et al., 2013; Völkner et al., 2022).

Für NP-C1 und NP-C2 wurde das erste iPSZ-basierte Zellmodell im Jahre 2013 beschrieben (Trilck et al., 2013). Seitdem wurde dieses Zellmodell zur Aufklärung vieler pathophysiologischer Mechanismen verwendet. Dabei konnte die bereits in Maus- und Rattenmodellen, sowie Fibroblasten beschriebene und für NP-C charakteristische Akkumulation von Cholesterol und Glykosphingolipiden (Trilck et al., 2017; Völkner, Liedtke & Untucht et al., 2021) mittels Filipin-Färbung nachgewiesen werden (Vanier & Latour, 2015). Auch der seltener auftretende biochemisch-variante Phänotyp von NP-C1 konnte identifiziert werden, welcher zwar auf zellulärer Ebene kaum Indizien für eine NP-C1 Erkrankung zeigt, die Patienten jedoch symptomatisch schwer betroffen sind (Völkner, Liedtke & Untucht et al., 2021). Darüber hinaus wurde die Untersuchung von funktionellen Parametern durchgeführt. Neben dem Nachweis der Generierung von Aktionspotentialen als Funktionalitätsnachweis der Neurone, wurde ein geringfügig weniger negatives Ruhepotential bei Neuronen nachgewiesen, welche eine homozygote Mutation im *NPC*-Gen tragen. Zusätzlich zeigte die Studie einen reduzierten Ca^{2+} -Einstrom aufgrund einer erhöhten Expression der GluA2-Untereinheit von AMPA-Rezeptoren (Rabenstein et al., 2017). Weitere Analysen zeigten, dass auch das Zytoskelett in Form einer Hypophosphorylierung von Vimentin und GFAP (engl. glial fibrillary acidic

protein, GFAP) und eine daraus resultierende Veränderung der Struktur dieser Intermediärfilamente bei NP-C auftritt (Peter et al., 2017). Auch lieferte das Modell Ergebnisse in Bezug auf das erhöhte Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS). Dies wird vermutlich durch eine verminderte Expression der Katalase und eine daraus resultierende reduzierte Aktivität des antioxidativen Systems bedingt (Jürs et al., 2020). Auch die Verwendung des Zellmodells zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten erbrachte bereits vielversprechende Ergebnisse. So führte die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen durch eine Verbesserung der Faltung und Prozessierung des NPC1-Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu dessen verbesserten Transport in die Lysosomen und einer Reduktion des Cholesterolgehaltes in den Zellen (Völkner et al., 2022). Neben der Verwendung des Zellmodells zur Aufklärung biochemischer und funktioneller pathophysiologischer Mechanismen bietet das Modell also eine Alternative zu Tiermodellen für die Evaluierung neuer Behandlungsstrategien bei NP-C. Interessanterweise wurden die meisten Studien in Bezug auf Mitochondrien bisher lediglich in Maus- und Rattenmodellen (Yu et al., 2005) oder nicht krankheitsassoziierten Zelltypen wie CHO-Zellen (engl. chinese hamster ovary) und Fibroblasten durchgeführt (Kennedy et al., 2012; Woś et al., 2016). Ähnliches gilt für die Analyse der Prozesse der Mitophagie (Sarkar et al., 2013) und Autophagie (Singhal et al., 2020). Zusätzlich sind Daten bezüglich des Transports von Mitochondrien und anderen Zellorganellen in humanen neuronalen Zellen nahezu nicht vorhanden.

1.3 Mitochondrien und Neurodegeneration

1.3.1 Morphologie und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma abgetrennte Zellorganellen. Die äußere Membran (engl. outer mitochondrial membrane, OMM) bildet eine schwammartige Struktur, welche für kleine, ungeladene Moleküle durchlässig ist, größere Moleküle wie Proteine jedoch aktiv mit Hilfe von Translokasen transportiert werden müssen. Die innere Membran (engl. inner mitochondrial membrane, IMM) hingegen ist undurchlässig und besteht aus großen Einfaltungen, den sogenannten Cristae, in den die Enzyme der Atmungskette (Komplexe I bis IV, Coenzym Q und Cytochrom c) und die ATP-

1 Einleitung

Synthese lokalisiert sind. Dazwischen liegt der Intermembranraum (Hoppins et al., 2011; Kühlbrandt, 2015).

Mitochondrien sind essentiell für das Überleben nahezu aller eukaryotischen Zellen. Sie regulieren die Synthese unterschiedlichster Grundbausteine, wie Aminosäuren und Nucleotide, schützen die Zelle vor oxidativem Stress und erhöhten Kalziumlevel und liefern die für eine Vielzahl an Prozessen nötige Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) (Herst et al., 2017).

Der Prozess der ATP-Gewinnung wird auch als oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) bezeichnet (Wallace et al., 2010). Dabei entstehen ungepaarte Elektronen, welche mit O₂ hochreaktive freie Radikale (Superoxid-Ionen) bilden. Diese werden in sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS), wie H₂O₂ oder Hydroxy-Ionen (-OH) umgewandelt (Duchen, 2004). ROS sind zwar in geringen Mengen an intrazellulären Signalwegen beteiligt, werden jedoch auch mit einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen, so auch mit NP-C, in Verbindung gebracht (Jürs et al., 2020). Auch für den Morbus Huntington (engl. Huntington's disease, HD), den Morbus Parkinson (engl. Parkinson's disease, PD) und den Morbus Alzheimer (engl. Alzheimer's disease, AD) ist ein Einfluss beschädigter Mitochondrien an der Ausbildung der Erkrankung beschrieben, welche sich durch erhöhten oxidativen Stress, eine veränderte Ca²⁺-Homöostase und eine erhöhte Induktion der Apoptose äußert (Mattson et al., 2008).

Dem entgegen steht das antioxidative Verteidigungssystem der Mitochondrien, welche DNA, Proteine und Lipide vor oxidativen Schäden durch ROS in höheren Konzentrationen schützt (Holzerová & Prokisch, 2015). Die richtige Balance zwischen ATP- und ROS-Produktion ist also ein entscheidender Faktor für die Funktion der Zelle. Für den Prozess der ATP-Produktion ist dabei das mitochondriale Membranpotential (MMP) essentiell, welches häufig als Marker für die Funktionalität der Mitochondrien verwendet wird (Coppotelli & Ross, 2016). Ein verändertes MMP ist neben NP-C (Balboa et al., 2017) auch für viele weitere neurodegenerative Erkrankungen beschrieben (Panov et al., 2002) und fungiert häufig als erstes Indiz für eine Schädigung der Mitochondrien. Ein reduziertes MMP resultiert weiterhin in

Problemen bei der Regulation von Ca^{2+} , was seinerseits wiederum einen Einfluss auf die Funktion von Enzymen in der Zelle hat (Cali et al., 2012). Es wird z.B. vermutet, dass die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) an der Pathophysiologie des Morbus Alzheimer beteiligt ist (Oka et al., 2017) und dass die Proteinkinase C (PKC) durch eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase bei NP-C1 betroffen zu sein scheint (Rabenstein et al., 2017).

In Falle von Fehlfunktionen von Mitochondrien, was sich z.B. durch ein reduziertes MMP äußert, werden Mitochondrien zunächst durch Teilung (engl. fission) verkleinert und dann durch die sogenannte Mitophagie abgebaut, um die Zelle vor erhöhtem Stress und der Induktion der Apoptose zu schützen (Twig et al., 2008). Im Gegensatz dazu, resultiert ein erhöhter Energiebedarf in Form von ATP oder Nährstoffmangel in der Biogenese neuer Mitochondrien und der Fusion (engl. fusion) dieser zu dynamischen Netzwerken (Herst et al., 2017; Rossignol et al., 2004). Dabei fusionieren auch teilweise geschädigte mit funktionellen Mitochondrien, um den Stress der Zelle zu reduzieren (Youle & van der Bliek, 2012). Das Gleichgewicht der Prozesse der „fusion“ und „fission“ fungiert also als eine Form der Qualitätskontrolle für Mitochondrien und ist essentiell für das Überleben der Zelle. Die Teilung von Mitochondrien wird primär durch Drp1 (engl. dynamin-related GTPase 1) und die Fusion durch Mitofusin (Mfn) und Opa1 (engl. optic dominant atrophy 1) reguliert (Itoh et al., 2013). Eine fehlerhafte Regulation von Drp1 wird mit AD assoziiert (Cho et al., 2009), wohingegen eine reduzierte Funktion von Mfn z.B. für die Charcot-Marie-Tooth Neuropathie (CMT) (Reilly et al., 2011) bekannt ist. Für NP-C ist diesbezüglich eine Anhäufung von Mitochondrien in distalen Bereichen der Zelle beschrieben, was auf eine erhöhte Biogenese und Fusion hindeutet (Woś et al., 2016). Die Cluster in distalen Bereichen der Zelle weisen weiterhin auf Defekte im Transport der Mitochondrien hin (Frazier et al., 2006). Der Transport wird dabei über die Funktion und Morphologie der Mitochondrien reguliert. Eine Verkleinerung der Mitochondrien oder ein verändertes MMP induziert z.B. den retrograden Transport der Mitochondrien für ihren Abbau mittels Proteasom oder Mitophagie (Gomes & Scorrano, 2013).

1 Einleitung

1.3.2 Transport von Mitochondrien in neurodegenerativen Erkrankungen

Die Größe von Neuronen macht einen Transport von Mitochondrien entlang weiter Strecken notwendig. Zwar können Mitochondrien auch in den Axonen synthetisiert werden, der Großteil jedoch muss, nach der Neusynthese im Zellsoma, entlang der Axone (anterograder Transport) in die Dendriten transportiert werden (Amiri & Hollenbeck, 2008), um dort z.B. die Energieversorgung mit ATP bei der Mobilisierung synaptischer Vesikel zu gewährleisten (Verstreken et al., 2005) oder die Ca^{2+} -Homöostase aufrechtzuerhalten (Tang & Zucker, 1997). Andersrum müssen geschädigte Organellen zurück zum Soma transportiert werden (retrograder Transport), um dort proteasomal oder mittels Mitophagie abgebaut zu werden. Dies erfordert ein sehr streng kontrolliertes und einwandfrei funktionierendes Transportsystem. Das Bewegungsschema von Mitochondrien ist sehr komplex. Es ist durch häufige Richtungswechsel und Stopps gekennzeichnet und wird vor allem durch den hohen Energiebedarf z.B. in prä- und postsynaptischen Bereichen, aktiven Wachstumskegeln oder bei der Ausbildung von axonalen Verzweigungen bestimmt (Sheng & Cai, 2012).

Mitochondrien werden entlang der Mikrotubuli mit Hilfe von Motorproteinen und speziellen Adapterproteinen transportiert. Der Transport über große Entfernungen ist dabei abhängig von der Polarität und Organisation der Mikrotubuli, wobei diese meist vom negativ geladenen Ende im Soma in Richtung der Dendriten zum positiv geladenen Ende ausgerichtet sind. Der Transport in Richtung des positiven Endes, also der anterograde Transport, wird hauptsächlich durch Proteine der Kinesin Superfamilie (KIFs) reguliert, der entgegengesetzte, retrograde Transport, durch Dynein (Hirokawa et al., 2010).

Die Bindung von KIFs an Mitochondrien erfolgt über die Interaktion mit dem Adapterprotein Milton, welches an die mitochondriale Rho GTPase (Miro) in der äußeren Membran der Mitochondrien und an das C-terminale Ende der schweren Kette des Kinesins bindet (Stowers et al., 2002). In Säugetieren sind sowohl für Miro (Miro1 und Miro2) als auch für Milton (engl. trafficking-protein-Kinesin-binding-1/2, TRAK1 und TRAK2) zwei Isoformen bekannt, welche

direkt mit KIF5 interagieren. Der Komplex aus Miro1 und TRAK2 ist dabei der zentrale Regulator für den anterograde Transport von Mitochondrien (MacAskill et al., 2009).

Dynein reguliert den retrograden Transport von Mitochondrien in Axonen. In den Dendriten hingegen ist Dynein, durch die gemischte Polarität der Mikrotubuli, für den Transport in beide Richtungen verantwortlich (Karki & Holzbaur, 1999). Bekannte Hilfsproteine des retrograden Transports von Mitochondrien sind Dynaktin (King & Schroer, 2000) oder Snapin (Cai et al., 2010).

Im Gegensatz zum Transport über weite Strecken ist der Transport über kurze Distanzen, z.B. in Wachstumskegeln oder den Nervenenden vermutlich vom Aktin-Zytoskelett, welches dort das primäre zytoskeletale Protein darstellt, und dem Motorprotein Myosin abhängig. Dieser Transport ist jedoch deutlich langsamer (Morris & Hollenbeck, 1995).

Ein defekter Transport von Mitochondrien ist ein zentrales Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen. In Bezug auf NP-C ist dabei jedoch wenig bekannt. Für AD ist hingegen beschrieben, dass Amyloid- β und Tau die Bindung von Kinesin Motorproteinen an die Mikrotubuli verhindern und so den anterograden Transport inhibieren (Hiruma et al., 2003; Stamer et al., 2002). Tau stabilisiert darüber hinaus die Bindung von Myosin II an Aktinfilamente (Wang, X. et al., 2019), was sich auf den Transport speziell in den distalen Bereichen von neuronalen Zellen auswirken kann (Pathak et al., 2010). Für CMT sind Defekte sowohl im anterograden, als auch retrograden Transport von Mitochondrien, jedoch keinen anderen Organellen beschrieben, welche ebenfalls vermutlich primär durch ein defektes Zytoskelett zu erklären sind (Baloh et al., 2007). Bei der amyotrophen lateralen Sklerosen (ALS) hingegen ist der anterograde Transport inhibiert, der retrograde Transport jedoch verbessert (Vos et al., 2007). Eine weitere Studie beschrieb darüber hinaus, dass der Transport der Mitochondrien lediglich in distalen Bereichen der Zelle betroffen zu sein scheint (Naumann et al., 2018). Wie oben beschrieben, ist für die Degradation beschädigter Mitochondrien ein funktioneller retrograder Transport essentiell. In diesem Zusammenhang beschreibt eine Studie, dass Parkin, welches ein zentrales Protein während des Abbaus von beschädigten

1 Einleitung

Mitochondrien darstellt und mit Formen von PD assoziiert ist, auch deren retrograden Transport reguliert (Cai et al., 2012). Dieser Befund wird durch die Tatsache unterstützt, dass LRRK2 (engl. Leucine-rich repeat kinase 2) über Miro ebenfalls die Degradation von Mitochondrien, sowie ihren retrograden Transport reguliert und Mutationen im Gen für LRRK2 eine der häufigsten Ursachen für Parkinson sind (Corti et al., 2011; Wang, W. et al., 2016). So reguliert die Funktion der Mitochondrien in distalen Bereichen ihren anterograden Transport, wohingegen der retrograde Transport durch ihre Degradation kontrolliert wird.

Bei der Analyse von Transportprozessen der Mitochondrien muss darüber hinaus berücksichtigt werden, dass ungefähr 2/3 aller Mitochondrien in Neuronen stationär sind (Sheng & Cai, 2012). Es wird vermutet, dass diese entweder von den Motorproteinen dissoziieren oder aber mittels „Ankerproteinen“ immobilisiert werden. Syntaphilin ist eines dieser Ankerproteine für Mitochondrien in Axonen (Kang et al., 2008). Syntaphilin bindet dabei reversibel, sowohl an die äußere Membran der Mitochondrien als auch an Mikrotubuli und verhindert so den Weitertransport. Darüber hinaus binden Mitochondrien entlang der Axone an Neurofilamente (NF) (Hirokawa, 1982), was die Mobilität zusätzlich reguliert. Diese Bindung ist sowohl abhängig vom Phosphorylierungsstatus der NFs als auch vom MMP (Wagner et al., 2003). Untersuchungen an einem Knockout-Modell der leichten Kette der Neurofilamente (NF-L), zeigten eine gesteigerte Mobilität der Mitochondrien, was zu der Vermutung führte, dass NFs den Transport von Mitochondrien durch die Bildung physischer Barrikaden reguliert (Perrot & Julien, 2009). Mutationen bei NF-L sind für CMT beschrieben und werden als einer der Gründe für den reduzierten Transport der Mitochondrien angeführt (Brownlee et al., 2002). Die Vermutung liegt also nahe, dass auch das veränderte Zytoskelett bei NP-C (Peter et al., 2017) einen negativen Einfluss auf den Transport von Organellen hat, was wiederum die Funktion der Organellen bei unterschiedlichsten zellulären Prozessen beeinflusst. Interessant sind dabei vor allem die Prozesse der Autophagie und speziell der Mitophagie. So reguliert das Transportverhalten der Mitochondrien ihren Abbau über die Mitophagie (Safiulina, Kuum, Choubey, Hickey & Kaasik,

2019) für die wiederum ein funktionierender Transport anderer Organellen wie Autophagosomen und Lysosomen essentiell ist (Cabukusta & Neefjes, 2018).

1.4 Defekte der Autophagie als charakteristisches Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen

Die Autophagie (griechisch. autóphagos „sich selbst verzehrend“) ist ein intrazellulärer Signalweg zum Abbau von Proteinen und Lipiden, aber auch ganzer Zellorganellen und dient zum Recycling von Nährstoffen. Dieser Prozess wird besonders bei Nährstoffmangel zur Energiegewinnung verwendet, schützt die Zelle aber auch vor der Aggregation von potentiell toxischem Material (Mizushima et al., 2008). Dabei wird das zu degradierende Material in sogenannte Autophagosomen aufgenommen und zu Lysosomen transportiert, um dort abgebaut zu werden. Der Prozess ist in drei Schritte unterteilt: Initiation, Reifung und Degradation. Der erste Schritt bei der Bildung der Autophagosomen ist die Fusion von Vesikeln unterschiedlichsten Ursprungs. Die Vesikel werden von membranösen Strukturen wie der Plasmamembran (Ravikumar et al., 2010), dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Hayashi-Nishino et al., 2009), dem Golgi-Apparat (van der Vaart et al., 2010) oder Mitochondrien (Hailey et al., 2010) abgeschnürt und formen die sogenannte Phagophore, welche durch Fusion mit weiteren Vesikeln zu einer Doppelmembran-Struktur wird (Abb.1, 1). Während der Schließung der beiden Enden dieser Doppelmembran werden so Teile des Zytoplasmas und darin befindliche Materialien eingeschlossen. In diesen Prozess sind eine Vielzahl von Proteinen und Proteinkomplexen involviert, welche als ATG-Proteine (engl. autophagy-related proteins, ATG) bezeichnet werden. Initiiert wird die Autophagie durch einen Komplex aus den Proteinen ULK1 und ULK2 (engl. Unc-51 like autophagy activating kinase, ULK1/2), ATG13 und FIP200 (engl. focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa, FIP200). Die Aktivität dieses Komplexes wird wiederum durch drei Hauptsignalwege reguliert, dem mTORC1- (engl. mammalian target of rapamycin complex 1), dem AMPK- (engl. adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) und dem p53-Signalweg. mTORC1 inaktiviert die Autophagie durch Phosphorylierung von ULK1/2 und ATG13, wohingegen AMPK die Autophagie durch Inaktivierung von mTORC1 und Aktivierung von ULK1 und VPS34 (engl.

1 Einleitung

vacuolar protein sorting 34, VSP34) induziert. Der Transkriptionsfaktor p53 reguliert hingegen die Transkription unterschiedlicher in die Autophagie involvierter Proteine (Akers et al., 2012) (Abb.1, 2). Der ULK1/2-ATG13-FIP200-Komplex reguliert die Autophagie über den PI3K-Komplex (Phosphoinositid-3-Kinasen, PI3K), welcher VPS34, Beclin-1 und ATG14 enthält. Dabei wird Beclin-1 von ULK1 phosphoryliert, was zur Lösung von dessen Inhibitor Bcl-2 und weiterhin zur Induktion der Bildung der Phagophore führt (Abb.1, 3) (Russell et al., 2013). Die Elongation der Phagophore wird durch einen Komplex aus ATG5-ATG12-ATG16L1 katalysiert. Die Bildung dieses Komplexes wird wiederum durch ATG7 und ATG10 kontrolliert (Abb.1, 4) (Puri et al., 2013). Parallel dazu erfolgt die Prozessierung von ATG8, auch als LC3B bezeichnet (engl. microtubuli-associated protein 1 light chain 3B, MAP1LC3B, kurz LC3B). Dabei wird pro-LC3B zunächst durch ATG4B zu LC3BI umgewandelt, an welches im Anschluss durch ATG7 und ATG3 Phosphatidylethanolamin (PE) gebunden wird, um LC3BII zu erhalten (Kabeya et al., 2000). LC3BII wird während der Schließung der Phagophore in die Membran eingebaut (Abb.1, 5) und fungiert als Bindungsstelle für Sequestome 1 (SQSTM1/p62) (Kocaturk & Gozuacik, 2018), welches darüber hinaus an der Oberfläche von zu degradierendem Material bindet und so über die Interaktion mit LC3BII die Aufnahme von Material in die Autophagosomen reguliert (Pankiv et al., 2007).

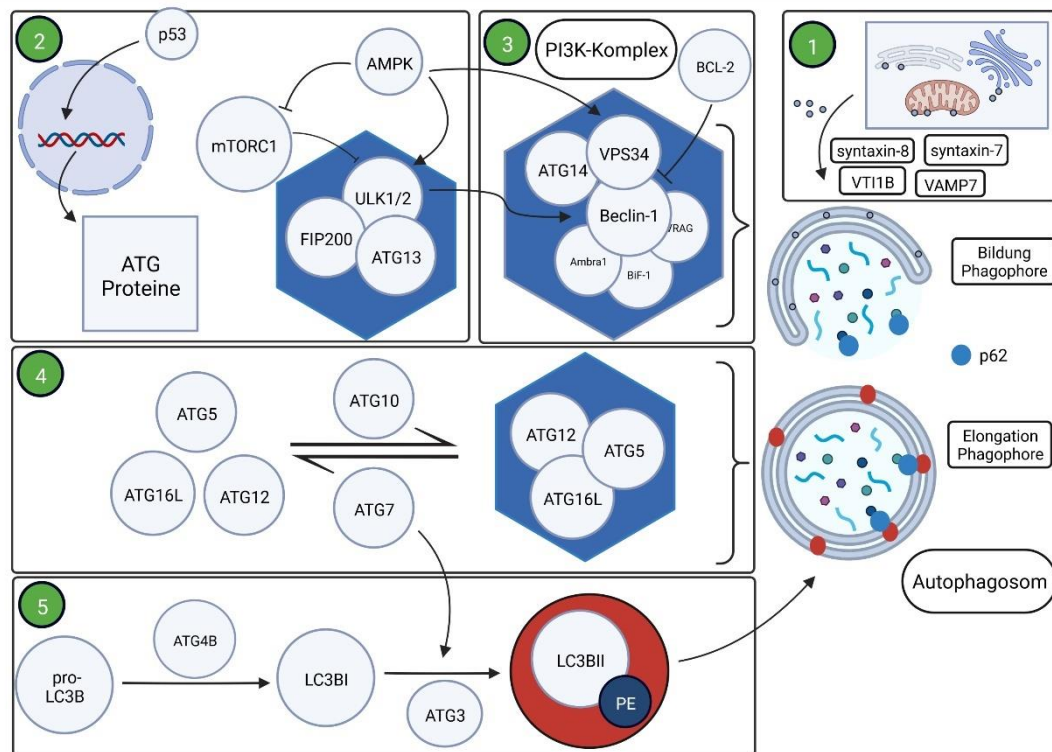


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Autophagie

1 Die Phagosom wird aus membranösen Vesikeln, abgeschnürt von der Plasmamembran, dem ER, dem Golgi-Apparat und von Mitochondrien mit Hilfe von syntaxin-7, syntaxin-8, VAMP/ und VT11B gebildet. 2 Die Induktion der Ausbildung erfolgt dabei über AMPK und mTORC1, welche den Komplex aus ULK 1/2, FIP200 und ATG13 regulieren. 3 ULK1 phosphoryliert und aktiviert Beclin-1 und den PI3K-Komplex, was schlussendlich zur Induktion der Bildung der Phagosom um das mit p62 markierte Material führt. 4 Die Elongation der Phagosom reguliert wiederum ein Komplex aus ATG5-ATG12-ATG16L1, welcher mit Hilfe von ATG10 und ATG7 gebildet wird. 5 Parallel wird mit Hilfe von ATG4B, ATG3 und ATG7 pro-LC3B zunächst zu LC3BI und weiter zu LC3BII umgewandelt und dieses in die Membran der Autophagosomen eingebaut. LC3BII fungiert dabei als Bindepertner für p62. (Abbildung gestaltet mit BioRender.com)

Die gebildeten Autophagosomen werden entlang der Mikrotubuli mit Hilfe von Dynein und RILP (engl. Rab-interacting lysosomal protein, RILP) zurück zum Zellsoma transportiert (Khobreakar et al., 2020; Ravikumar et al., 2005), wo sie mit Lysosomen fusionieren (Abb.2, 1). Dabei wird zunächst ein definierter Anteil des LC3BII durch ATG4B aus der Membran entfernt und zu LC3BI recycelt (Abb.2, 2), was vermutlich als Signal für vollständig prozessierte Autophagosomen dient und die Fusion mit Lysosomen induziert (Maruyama & Noda, 2017; Yu et al., 2012).

Auch der retrograde Transport und die Positionierung der Lysosomen spielt für die Fusion eine entscheidende Rolle. Neben Dynein ist Jip4 (engl. c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)-interacting protein 4, Jip4) als Adapterprotein für

1 Einleitung

Lysosomen an Dynein in diesen Prozess involviert (Cabukusta & Neefjes, 2018). Es wird vermutet, dass die Positionierung der Lysosomen die Autophagie über eine direkte Interaktion mit mTORC1 reguliert. Korolchuk et al. beschrieben diesbezüglich, dass in der Zellperipherie lokalisierte Lysosomen die Aktivität von mTORC1 erhöhen, was zur Inhibierung der Bildung von Autophagosomen führt. Andersrum inaktivieren perinukleäre Lysosomen mTORC1, was zur Aktivierung der Autophagie führt. Durch die Positionierung der Lysosomen in der Nähe des Zellkerns wird darüber hinaus ihre Fusion mit Autophagosomen verbessert (Abb.2, 3) (Korolchuk et al., 2011). Die ablaufenden vesikulären Fusionsprozesse werden durch SNARE-Proteine (engl. soluble NSF attachment protein receptors, SNARE) unterstützt (Furuta & Amano, 2010; Moreau et al., 2011). So regulieren VAMP7 (engl. vesicle-associated membrane protein), syntaxin-7, syntaxin-8 und VT11B (engl. Vesicle Transport Through Interaction With T-SNAREs 1B) während der Bildung der Phagophore die Fusion der Precursor-Lipid-Tropfen, welche vom ER, dem Golgi-Apparat oder den Mitochondrien abgeschnürt werden (Abb.1, 1) (Moreau et al., 2013). VAMP3 hingegen reguliert die Fusion von Autophagosomen und Endosomen zu Amphisomen, wohingegen VAMP8 zusammen mit VAMP7 und VT11B die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen zu Autolysosomen katalysiert (Abb.2, 4) (Fader et al., 2009).

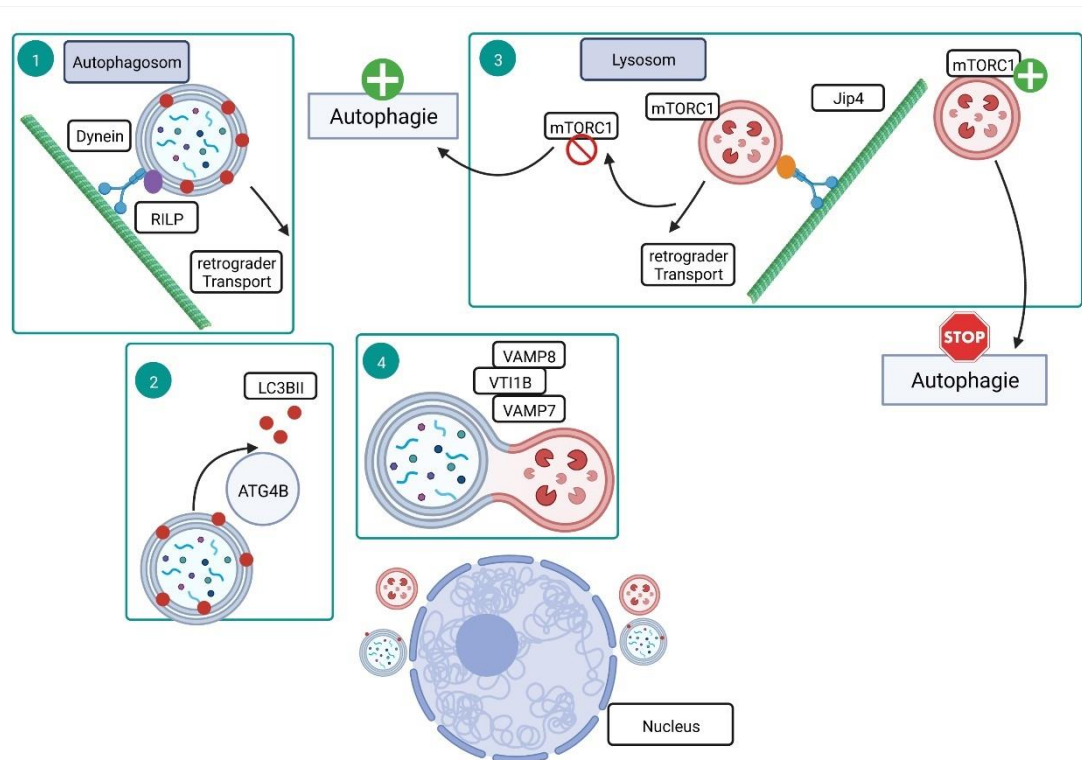


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen

1 Autophagosomen werden entlang der Mikrotubuli mit Hilfe von Dynein, reguliert durch RILP, retrograd transportiert. 2 Bevor sie mit Lysosomen fusionieren wird durch ATG4B ein definierter Anteil an LC3BII aus der Membran entfernt. 3 Lysosomen in der Zellperipherie aktivieren mTORC1 und inhibieren so die Autophagie. Der retrograde Transport der Lysosomen erfolgt durch Dynein entlang der Mikrotubuli mit Jip4 als Adapterprotein. Die perinukleäre Lokalisation der Lysosomen führt dann zur Lösung von mTORC1 und dessen Inaktivierung, was wiederum die Autophagie induziert. 4 Die Fusion von Autophagosomen in perinukleären Bereichen wird durch die SNARE-Proteine VAMP8, VAMP7 und VT11B katalysiert. (Abbildung gestaltet mit BioRender.com)

Aufgrund der Tatsache, dass viele neurodegenerative Erkrankungen mit der Akkumulation von Proteinen und Lipiden einhergehen, ist die Analyse der Autophagie Inhalt vieler Studien und wird als vielversprechender Ansatz für therapeutische Interventionen angesehen. Zur Analyse wird dabei meist das Verhältnis von LC3BII zu LC3BI und die Expression von p62 verwendet, was im Falle einer Akkumulation der Proteine auf Defekte in der Autophagie hinweist (Klionsky et al., 2007). Die Ursachen für die Defekte sind dabei jedoch sehr verschieden. Für AD ist z.B. bekannt, dass durch eine reduzierte Aktivität von PICALM (engl. phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein) die Endozytose von SNARE-Proteinen gehemmt wird, was einen Einfluss auf die Bildung der Autophagosomen, sowie deren Fusion mit Lysosomen hat (Moreau et al., 2014). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expression von

1 Einleitung

Beclin-1 bei AD reduziert ist, was die Induktion der Autophagie inhibiert (Pickford et al., 2008). Für ALS hingegen ist beschrieben, dass die charakteristische Akkumulation von SOD1 (engl. superoxide dismutase 1, SOD1) oder TDP-43 (engl. TAR DNA-binding protein 43, TDP-43) durch einen behinderten Abbau dieser Proteine aufgrund von Mutationen im Gen für SQSTM1/p62 zu erklären ist (Gal et al., 2009). Weitere Mutationen im Zusammenhang mit Autophagie bei ALS sind beschrieben für TBK1 (engl. TANK-binding kinase 1) (Freischmidt et al., 2015) und OPTN (engl. optineurin) (Shen et al., 2015). Wie oben bereits beschrieben hat auch der Transport von Autophagosomen und Lysosomen einen großen Einfluss auf die Autophagie. Für PD ist diesbezüglich ein reduzierter Transport von Autophagosomen durch eine Hyperaktivierung von LRRK2 bekannt, was weiterhin die Reifung der Autophagosomen verhindert (Boecker et al., 2021). Auch für NP-C sind bereits Defekte im Signalweg der Autophagie beschrieben worden. In humanen Fibroblasten sowie CHO-Zellen ist beschrieben, dass die Akkumulation von LC3BII und Autophagosomen durch eine defekte Fusion dieser mit Lysosomen zu erklären ist. Dies ist vermutlich durch eine fehlerhafte Lokalisierung der SNARE-Proteine VAMP3 und VAMP8 bedingt (Sarkar et al., 2013). In einem anderen Modell, basierend auf patienten-spezifischen iPSCs, konnte darüber hinaus die Akkumulation von p62 sowie LC3BII durch Reduktion des Cholesterolgehaltes und Korrektur der Mutation im *NPC1*-Gen reduziert werden, was für eine Funktion des NPC1-Proteins im Signalweg der Autophagie spricht. Die Autoren vermuten dabei, dass der veränderte Cholesterolgehalt in der Membran von Lysosomen und späten Endosomen sich auf die Fusion mit Autophagosomen auswirkt, jedoch ist der genaue Zusammenhang noch nicht vollends bekannt (Maetzel et al., 2014). Auch der Einfluss des Cholesterolgehaltes auf den Transport und die Positionierung von Lysosomen und Autophagosomen ist in NP-C kaum untersucht. Unabhängig von NP-C wird jedoch vermutet, dass ORP1L (engl. oxysterol-binding protein-related protein 1L, ORP1L) je nach Cholesterolgehalt die Bindung von Autophagosomen an das ER induziert, was zum einen deren Transport inhibiert und weiterhin, durch Interaktion mit HOPS (engl. homotypic fusion and vacuole protein-sorting), auch die Fusion dieser mit Endosomen und Lysosomen inhibiert (Wijdeven et al., 2016). Dies könnte als Verbindung

zwischen NP-C, dem erhöhten Cholesterolgehalt und der defekten Autophagiefunktion, bedarf jedoch noch weitergehender Analysen speziell des Signalwegs der Autophagie und der dort auftretenden Defekte.

1.5 Mitophagie und Neurodegeneration

Neben der unspezifischen Degradation von im Zytosol aufgenommenen Materials, ist eine Vielzahl spezifischer Abbauewege entlang des autophagolysosomalen Systems bekannt. Einer dieser speziellen Teilbereiche ist die Mitophagie. Während dieses Prozesses werden selektiv geschädigte Mitochondrien abgebaut und recycelt. Die Selektivität wird dabei durch die Bindung von speziellen Autophagie-Rezeptoren an die Mitochondrien gewährleistet. Die Bindung dieser Rezeptoren zur Induktion des Abbaus wird primär über das MMP reguliert. Bei physiologischen MMP (Abb. 3a) wird die Serin-/Threonin-Protein-Kinase PTEN-induzierte Kinase 1 (PINK1) durch Translokasen in der äußeren (engl. translocase of the outer membrane, TOM) und inneren (engl. translocase of the inner membrane, TIM) Membran der Mitochondrien in diese aufgenommen und dort durch die Peptidase MPP (engl. matrix processing peptidase, MPP) und PARL (engl. presenilin-associated rhomboid-like protein, PARL) geschnitten (Becker et al., 2012). Anschließend wird es über TIM und TOM aus den Mitochondrien und zum Proteasom zur Degradation transportiert (Menzies et al., 2015). Geschädigte Mitochondrien hingegen weisen häufig Veränderungen des MMPs auf (Abb. 3b). Depolarisierte Mitochondrien treten häufig bei Teilung eines Mitochondriums während der Zellteilung oder während der Qualitätskontrolle von geschädigten Mitochondrien auf, was zur Induktion der PINK1/Parkin-vermittelten Mitophagie führt (Kim & Lemasters, 2011). In diesem Falle akkumuliert PINK1 an der äußeren Membran und rekrutiert die Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin, was den Abbau des Mitochondriums mittels Mitophagie induziert. Dabei fungieren auch Miro1 (Safiulina, Kuum, Choubey & Gogichaishvili et al., 2019) und zu geringem Maße auch Miro2 (Woo et al., 2021) wohl als zusätzliche Faktoren für die Rekrutierung von Parkin zu den depolarisierten Mitochondrien. Parkin ubiquitiniert Proteine wie VDAC1 (engl. voltage-dependent anion-selective channel protein 1), Tom20 und Miro1 in der äußeren Membran der Mitochondrien (Geisler et al., 2010), was wiederum zur

1 Einleitung

Translokation von SQSTM1/p62 zu den Mitochondrien führt und die lokale Bildung von Autophagosomen induziert (Abb. 3) (Narendra et al., 2010).

Neben p62 sind weitere Rezeptoren bekannt, welche Mitochondrien für die Degradation mittels Mitophagie markieren. Diese sind unter anderem NBR1 (engl. neighbor of BRCA1 gene 1, NBR1) und Optineurin (OPTN), welche beide sowohl Ubiquitin-, als auch LC3B-Bindestellen haben. Dabei muss OPTN zunächst durch TBK1 (TANK-bindende Kinase 1) phosphoryliert werden, um dann an LC3B zu binden (Wild et al., 2011). TBK1 wiederum wird durch geschädigte Mitochondrien, die Expression von PINK1 und Parkin und die Ubiquitinierung von Rezeptoren aktiviert (Heo et al., 2015). Experimente in OPTN-Knock-Out-Modellen zeigten darüber hinaus, dass nach Induktion von Schäden an Mitochondrien die ULK1 Rekrutierung in diesen Zellen inhibiert ist (Lazarou et al., 2015), was die generelle Induktion der Autophagie-abhängigen Degradation von Mitochondrien reduziert.

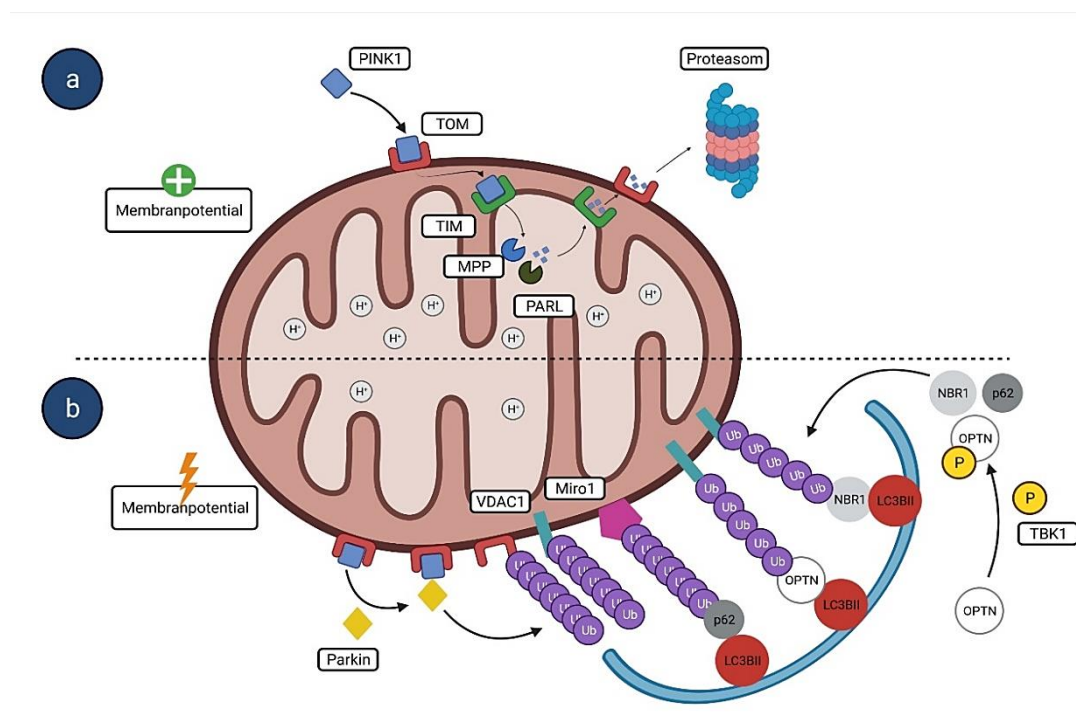


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Mitophagie

a Bei physiologischem MMP wird PINK1 über TOM und TIM in die Mitochondrien aufgenommen, dort durch MPP und PARL gespalten und über das Proteasom abgebaut. **b** Bei zu niedrigem MMP akkumuliert PINK1 an der äußeren Membran der Mitochondrien, was zur Rekrutierung von Parkin führt. Parkin ubiquitiniert wiederum Proteine in der OMM, wie VDAC und Miro1. Dies führt zur Translokation von Proteinen der Autophagie wie p62, NBR1 und OPTN, welche die Bindung der Mitochondrien an die sich bildende Phagophore vermitteln. OPTN muss dabei zunächst durch Phosphorylierung von TBK1 aktiviert werden. (Abbildung gestaltet mit BioRender.com)

Eine defekte Mitophagie wird mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. Für PD ist bekannt, dass Mutationen in den Genen für PINK1, Parkin (Song et al., 2013) und LRRK2 (Esteves & Cardoso, 2017) zu einer Akkumulation defekter Mitochondrien führt, was zu einem erhöhten ROS-Vorkommen und einer reduzierten ATP-Produktion führt (Wang, B. et al., 2016). Im Zusammenhang mit ALS sind hingegen stehen OPTN und TBK1 im Fokus vieler Studien im Zusammenhang mit Mitophagie. Es ist beschrieben, dass durch Mutationen in den Genen der beiden Proteine der Abbau von beschädigten Mitochondrien mittels Mitophagie deutlich reduziert ist (Oakes et al., 2017). Für NP-C wird vermutet, dass die mit dem erhöhten Cholesterolgehalt assoziierten lysosomalen Defekte zu einer Hyperaktivität von mTORC1 führen, was sowohl die generelle Autophagie, als auch den Abbau defekter Mitochondrien verhindern könnte (Davis et al., 2021). In einem Zellmodell von AD wurde hingegen beschrieben, dass ein erhöhter Cholesterolgehalt zwar die Mitophagie in Form der Translokation von PINK1 und der Bildung von Autophagosomen um Mitochondrien induziert, der Abbau der beschädigten Mitochondrien jedoch reduziert ist (Roca-Agujetas et al., 2021). Wie genau sich der erhöhte Cholesterolgehalt also auf die Mitophagie und Autophagie auswirkt ist weiterhin nicht komplett verstanden.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss des Transportes von Mitochondrien, Lysosomen und Autophagosomen auf die Ausprägung des pathophysiologischen Phänotyps bei NP-C zu untersuchen. In diesem Zusammenhang werden neben dem Transport der Organellen speziell die Prozesse der Mitophagie und Autophagie analysiert, um in diesem Bereich bestehende Wissenslücken bei NP-C zu schließen. Die Untersuchungen wurden dabei in vier Themenbereiche unterteilt:

1. Untersuchung der Morphologie, der Funktion und des Transports von Mitochondrien

Defekte Mitochondrien sind für AD, PD und ALS sowie in NPC-defizienten Fibroblasten und Knockout-Mäusen beschrieben. Um dies für das hier verwendete iPSZ-basierte Zellmodelle zu untersuchen, wird zunächst anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen die Morphologie der Mitochondrien bewertet und anschließend sowohl das Membranpotential und die ATP-Produktion als auch die Expression zentraler mitochondrialer Proteine (Tom20, Hsp60, Miro1 und Miro2) proteinbiochemisch untersucht. Dies soll einen Überblick über die Funktion der Mitochondrien bei NP-C liefern. Auf Grund der Größe von Neuronen ist darüber hinaus der Transport der Mitochondrien über weite Strecken essentiell. Anhand von mikroskopischen Aufnahmen lebender Zellen über mehrere Minuten wird die Kinetik des Transports von Mitochondrien untersucht, um eine Aussage über mögliche Transportdefizite und eine daraus resultierende mögliche fehlerhafte Lokalisation treffen zu können.

2. Untersuchungen des Abbaus von Mitochondrien mittels Mitophagie

Beschädigte Mitochondrien werden neben dem Proteasom über das autolysosomale System abgebaut und recycelt. Für NP-C ist bereits in Mausmodellen und humanen Fibroblasten eine defekte Autophagie beschrieben worden, allerdings sind die Gründe für die Ausprägung dieses Phänotyps nicht bekannt. Die Analyse des Abbaus von Mitochondrien über die Mitophagie erfolgt mittels Expressionsanalysen der involvierten Schlüsselproteinen Parkin, p62 und LC3B, sowie deren Transport zum

Wirkungsort anhand von Kollokalisationsanalysen mit Mitochondrien. Dabei wird neben dem Verhalten unter physiologischen Kulturbedingungen auch die Reaktion auf eine pharmakologisch induzierte Schädigung der Mitochondrien evaluiert.

3. Analyse der Autophagie

Neben Mitochondrien erfolgt der Abbau fehlgefalteter Proteine und Lipide über die Autophagie. Analog zur Mitophagie wird die Expression und Translokation essentieller Proteine (p62 und LC3B), sowohl unter basalen Bedingungen als auch als Reaktion auf Nährstoffmangel und nach der Blockade des Abbaus der Autophagosomen mit Bafilomycin A1 untersucht. Zusätzlich wird der zentrale Schritt der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen während der Autophagie untersucht. Hierzu werden die Zellen mit einem Tandem-Sensor transduziert, bei dem LC3B sowohl mit RFP als auch mit GFP gekoppelt ist und der Anteil der gebildeten Autolysosomen quantitativ anhand mikroskopischer Aufnahmen bestimmt.

4. Einfluss des Transports von Lysosomen und Autophagosomen auf die Prozesse der Mitophagie und Autophagie

Ein funktionierender Transport von Lysosomen und Autophagosomen ist für die Prozesse der Autophagie und Mitophagie essentiell, um die Fusion der Organellen zu gewährleisten und die Degradation von potentiell zelltoxischem Material aufrechtzuerhalten. Die Analyse des Transports beider Organellen erfolgt analog zu den Mitochondrien durch Untersuchung unterschiedlichster kinetischer Parameter. Dies wird anhand von Videoaufnahmen lebender Zellen durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Fibroblasten Zelllinie	Mutation	Alter des Spenders	Ursprung
Ctrl A	GM08398	-	8 Jahre	Coriell*
Ctrl B	GM05659	-	1 Jahr	Coriell*
NPC1-A	A113011-3	c.1180T>C	unbekannt	Centogene AG**
NPC1-B	GM18436	c.1836A>C/ c.1628delC	unbekannt	Coriell*
NPC1-C	GM18453	c.3182T>C	1 Jahr	Coriell*
NPC2	GM18455	c.58G>C;c.140G>T	unbekannt	Coriell*

* NIGMS Human Genetic Cell Repository am Coriell Institute for Medical Research (Camden, USA)

** Centogene AG (Rostock, Deutschland)

Alle Zelllinien wurden von männlichen Spendern gewonnen.

3.1.2 Kultivierung neuraler Progenitorzellen (NPZs) und neural differenzierter Zellen (NDZs)

Die NPZs wurden nach dem Auftauen in einer Dichte von 100 000 Zellen/cm² auf Poly-L-Ornithin (PLO, 15 µg/ml) und Laminin (10 µg/ml) beschichteten Zellkulturplatten in Proliferationsmedium (40 % Dulbecco's verändertem Eagle medium (DMEM), 60 % DMEM/F-12, 1X B27, 0,5 % Penicillin/Streptomycin, 20 ng/ml Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. basic fibroblast growth factor, FGF2) und 20 ng/ml Epidermalem Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF)) ausgesät. Die NPZs wurden bei einer Konfluenz von 90 % mittels Accutase von den Zellkulturplatten abgelöst. Die Reaktion wurde mit der doppelten Menge an Proliferationsmedium gestoppt und die Suspension in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Proliferationsmedium resuspendiert und 100 000 Zellen/cm² auf mit PLO und Laminin beschichteten Zellkulturplatten ausgesät. Die Kultivierung der Zellen

erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂. Die terminale Differenzierung erfolgte durch Aussaat der NPZs in einer Dichte von 45 000 Zellen/cm² auf PLO/Laminin beschichteten Zellkulturplatten in Differenzierungsmedium (40% DMEM, 60% DMEM/F-12, 1X B27, 0,5% Penicillin/Streptomycin). Über 6 Wochen Differenzierungszeit bildete sich eine Mischkultur aus für Klasse III β -Tubulin positiven Neuronen und für GFAP positiven Astrozyten. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

3.1.3 Behandlung der Zellen

Zur Induktion der Autophagie wurde die Zellen für 6 h in HBSS (engl. Hank's Balanced Salt Solution) versetzt mit 5 mg/ml Magnesium und 6,6 mg/ml Kalzium (HBSS^{+/+}) kultiviert, um nährstoffarme Kulturbedingungen zu simulieren.

Zur Untersuchung der Produktion von Autophagosomen und der Induktion der Autophagie wurde die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen mit 50nM Bafilomycin A1 (BafA1) für 6h blockiert. BafA1 hemmt die vakuoläre Protonenpumpe (H⁺-ATPase) und verhindert so die Ansäuerung der Lysosomen. Dies führt zu einem Anstieg des pH-Wertes und zur Inhibierung der Funktion von lysosomalen Hydrolasen und weiterhin zur Blockierung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen.

Die Induktion der Mitophagie erfolgte mittels 20 μ M Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) für 6h. CCCP reduziert das MMP durch Erhöhung der Membranpermeabilität von Mitochondrien für Protonen. Dies führt zur Depolarisation der Mitochondrien und führt daraufhin zur Induktion ihres Abbaus mittels Mitophagie.

3.2 Immunfluoreszenz-Färbungen

Für die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die NDZs zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) versetzt mit 5 mg/ml Magnesium und 6,6 mg/ml Kalzium (PBS^{+/+}) gewaschen und anschließend für 10 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) auf Eis fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1% Triton X-100 in PBS^{+/+} für 5 min auf Eis. Zur Reduktion der unspezifischen Bindung von Antikörpern wurden die Zellen für 30 min mit 3% normalem Ziegenerum (engl. normal

3 Methoden

goat serum, NGS) in PBS^{+/+} inkubiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen Tom20 (Maus, 1:100), Hsp60 (Kaninchen, 1:100), Miro1 (Maus, 1:100), Miro2 (Kaninchen, 1:100), Parkin (Maus, 1:50), LC3BII/I (Kaninchen, 1:100), ATG4B (Kaninchen, 1:100) und p62 (Kaninchen, 1:100) erfolgte in 1 % NGS in PBS^{+/+} über Nacht bei 4°C. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (anti-Mause IgG konjugiert mit AlexaFluor488 und anti-Kaninchen IgG konjugiert mit AlexaFluor568) in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % NGS in PBS^{+/+} für 2 h bei Raumtemperatur (RT). Zuletzt erfolgte nach erneutem Waschen die Inkubation mit DAPI (250 ng/ml) für 5 min, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Deckgläschen mit Fluoromount-G® auf Objektträgern befestigt und 12 h getrocknet. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Laser Scanning Mikroskop 900 ausgestattet mit einem motorisierten Scan-Tisch 130x100 STEP, einem Laser-Module URGB mit einem Diodenlaser mit Anregungswellenlängen von 405 nm, 488 nm und 561 nm, einem Plan-APOCHROMAT 63x/1.4 Oil Objektiv, und einem GaAsP-PMT Detektor, unter Verwendung der ZEN Software Blue 2.

3.3 Transduktion lebender Zellen

Um Mitochondrien, Lysosomen und Autophagosomen in lebenden Zellen sichtbar zu machen wurde die CellLight™ BacMam 2.0 Technologie von Thermo Fisher Scientific verwendet. Dabei werden mit GFP oder RFP fusionierte Proteine, welche für das jeweilige Zellorganell spezifisch sind, mit Hilfe eines Insektenvirus (Baculovirus) in die Zellen eingebracht. Die NDZs wurden dazu mit 30 viralen Partikeln pro Zelle (PPC) in Differenzierungsmedium für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das nötige Volumen an Virussuspension wurde anhand von Formel 1 berechnet. Die Viruskonzentration betrug 1x10⁸ Viren pro ml.

$$\text{Virussuspension (mL)} = \frac{\text{Zellzahl} * 30 \text{ PPC}}{\text{Viruskonzentration} \left(\frac{\text{Viruslast}}{\text{ml}} \right)}$$

Formel 1 Berechnung der zu verwendenden Menge an Virussuspension

Das Volumen der Virussuspension wurde anhand der Zellzahl der zu transduzierenden Zellen, der notwendigen Viruspartikel pro Zelle (engl. particles per cell, PPC) und der durch den Hersteller angegebenen Viruskonzentration berechnet.

3.4 Fluoreszenz-basierte Auswertungsmethoden

3.4.1 Kolokalisationsanalyse

Zur Analyse der Kolokalisation von Proteinen und/oder Organellen in der Zelle wurden diese zunächst, wie in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschrieben, immunzytochemisch (Parkin/Miro1, p62/Miro1) gefärbt oder mit Hilfe der BacMam 2.0 Technologie (RFP-Mitochondrien/GFP-LC3B) sichtbar gemacht. Anschließend wurden für jede Zelllinie und jede gewählte Bedingung in 3-4 unabhängigen Experimenten 10 Fotos mit Hilfe des Laser Scanning Mikroskops 900 und einem Plan-APOCHROMAT 63x/1.4 Oil Objektiv gemacht und der Pearson Koeffizient mit der Fiji ImageJ Software (National Institutes of Health, Version 1.53c) und dem JaCoP PlugIn (Version 2.1.1) bestimmt.

3.4.2 Bestimmung des Anteils gebildeter Autolysosomen

Die Bestimmung des Anteils an Autophagosomen und Autolysosomen erfolgte durch Fluoreszenzintensitätsmessungen anhand fluoreszenzmikroskopischer Bilder. Für jede Zelllinie wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten jeweils 10 Fotos analysiert. Die Analyse erfolgte mit der „Measure“-Funktion der Fiji ImageJ Software (Version 1.53c) nach manueller Festsetzung eines Grenzwertes für die Fluoreszenzintensität. Es wurde ein Tandem-Sensor aus mit RFP und GFP markiertem LC3B mittels CellLight™ BacMam 2.0 Technologie in die Zellen eingebracht, um LC3B-positive Vesikel sichtbar zu machen. Die Unterscheidung zwischen Autophagosomen und Autolysosomen erfolgte dabei durch die Tatsache, dass durch die Reduktion des pH-Wertes nach Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen das GFP-Signal unterdrückt wird und die fusionierten Vesikel (Autolysosomen) lediglich rot erscheinen. Die Autophagosomen fluoreszieren hingegen gelb/orange, da sie sowohl rot (RFP) als auch grün (GFP) fluoreszieren. Das Verhältnis der roten (RFP) zur grünen (GFP) Fluoreszenz erlaubt also die Evaluation des Anteils von gebildeten Autolysosomen. Für die Bildung des Verhältnisses von roter zu grüner Fluoreszenz wurden die Bilder zuvor in die einzelnen Kanäle geteilt und separat die Intensität der Kanäle bestimmt.

3.5 Untersuchung des Transports von Organellen

3.5.1 Live-Cell-Imaging

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.3 beschrieben mit der CellLight™ BacMam 2.0 Technologie transduziert und so die jeweiligen Organellen (Mitochondrien, Lysosomen und Autophagosomen) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die lebenden Zellen mit dem Zeiss AxioObserver Mikroskop von Zeiss mikroskopiert. Es wurden von 4 unabhängigen Experimenten jeweils 4 Videos mit 300 Bildern und einer Geschwindigkeit von 4 Bildern/Sekunde gemacht. Die Zellen wurden währenddessen bei 37°C in EXS-HEPES Puffer (151 mM NaCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 2,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10mM Glucose, pH 7,4) gehalten.

3.5.2 Bewegungsanalyse von Zellorganellen

Die in Abschnitt 3.5.1 aufgenommenen Videos wurde mit der Fiji ImageJ Software (NIH) und dem TrackMate PlugIn (Ershov et al., 2021) ausgewertet. Die Einstellungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2 Verwendete Einstellungen der Transportanalyse mit TrackMate (ImageJ)

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
pixel width	0,23	Initial thresholding	NONE
pixel height	0,23	select view	HyperStack Displayer
voxel depth	1	Set filters on spots	quality above 2
crop settings	not applied	select a tracker	linear motion LAP tracker
select a detector	DoG detector	initial search radius	2
estimated blob diameter	1,6	search radius	2
threshold	2	Max. frame gap	2
use median filter	NO	Set filters on tracks	duration of track ≥3s
Do sub-pixel localization	YES		

Es wurden die folgenden 10 kinetischen Parameter ausgewertet:

- 1) Zurückgelegte Entfernung (engl. Track Displacement): Entfernung zwischen dem letzten und ersten Punkt der gesamten Bewegung.
- 2) Gesamte Strecke (engl. Total Distance Travelled):

$$\text{Gesamte Strecke} = \sum d_{i,i+1}$$

Formel 2 Mathematische Darstellung der Gesamtstrecke eines Organells

Insgesamt zurückgelegte Strecke eines Organells.

- 3) Maximale Entfernung (engl. Max Distance Travelled): Maximale Entfernung des Partikels zum Startpunkt.
- 4) Effektivität der Bewegung (engl. Confinement Ratio):

$$\text{Effektivität der Bewegung} = \frac{\text{zurückgelagerte Entfernung}}{\text{Gesamte Strecke}}$$

Formel 3 Mathematische Darstellung der Effektivität der Bewegung

Quotient aus der zurückgelegten Strecke (Start-Ziel) und der Gesamtstrecke (Summe aller Streckenabschnitte)

- 5) Mittlere Geschwindigkeit (engl. Track Mean Speed): Durchschnittsgeschwindigkeit über die gesamte Bewegung.
- 6) Maximale Geschwindigkeit (engl. Track Maximum Speed): Maximale Geschwindigkeit zwischen zwei Punkten in der Bewegung.
- 7) Minimale Geschwindigkeit (engl. Track Minimum Speed): Minimale Geschwindigkeit zwischen zwei Punkten in der Bewegung.
- 8) Median der Geschwindigkeit (engl. Track Median Speed): Median Geschwindigkeit über die gesamte Bewegung.
- 9) Geraden-Geschwindigkeit (engl. Mean Straight Speed)

$$\text{Geraden - Geschwindigkeit} = \frac{\text{zurückgelegte Entfernung}}{\text{Dauer der Bewegung}}$$

Formel 4 Mathematische Darstellung der Geraden-Geschwindigkeit

Geschwindigkeit des Objekts auf einer geraden Linie zwischen dem ersten und letzten Punkt der Bewegung

- 10) Dauer der Bewegung (engl. Track Duration): Zeit zwischen dem ersten und letzten Punkt der gesamten Bewegung.

3 Methoden

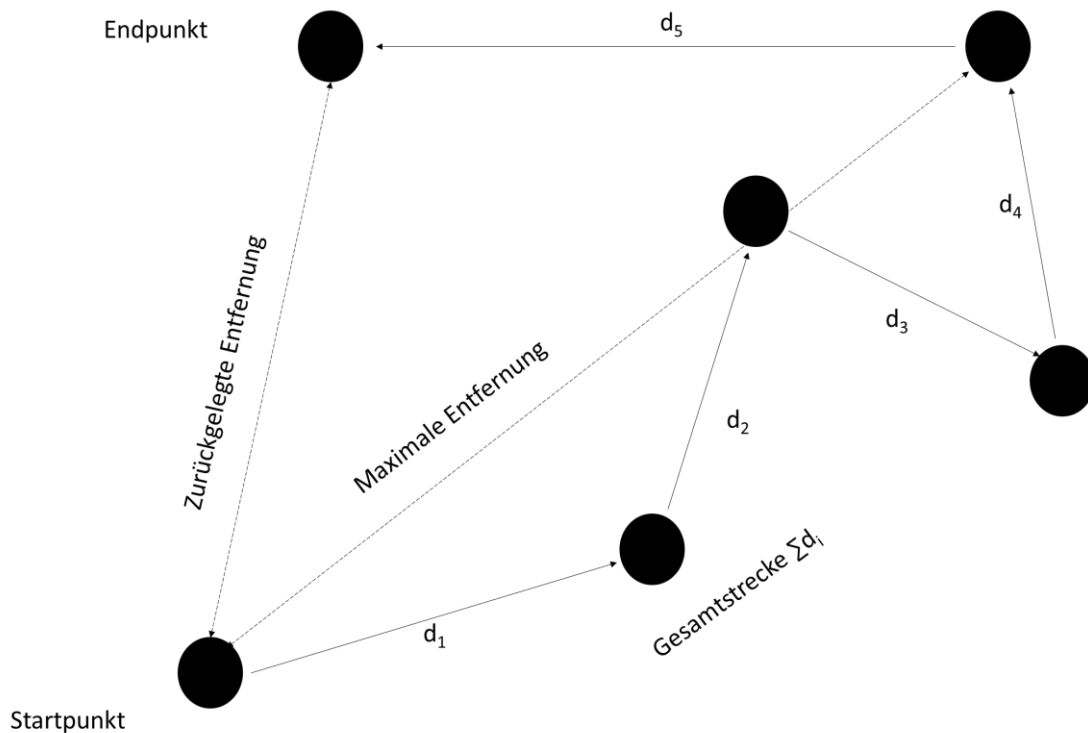


Abbildung 4 Schematische Darstellung der analysierten Entfernungparameter

Die Graphik zeigt schematisch die ausgewerteten Entfernungparameter. Die zurückgelegte Entfernung ist die Entfernung zwischen Start und Ziel eines Organells unabhängig von den einzelnen Streckenabschnitten. Sollte das Organelle wieder an seinem Startpunkt ankommen ist dieser Wert 0. Die Maximale Entfernung gibt den Wert des am weitesten von Startpunkt entfernten Punkts während der gesamten Bewegung aus. Die Gesamtstrecke ist die Summe aller einzelnen Strecken während der gesamten Bewegung eines Organells.

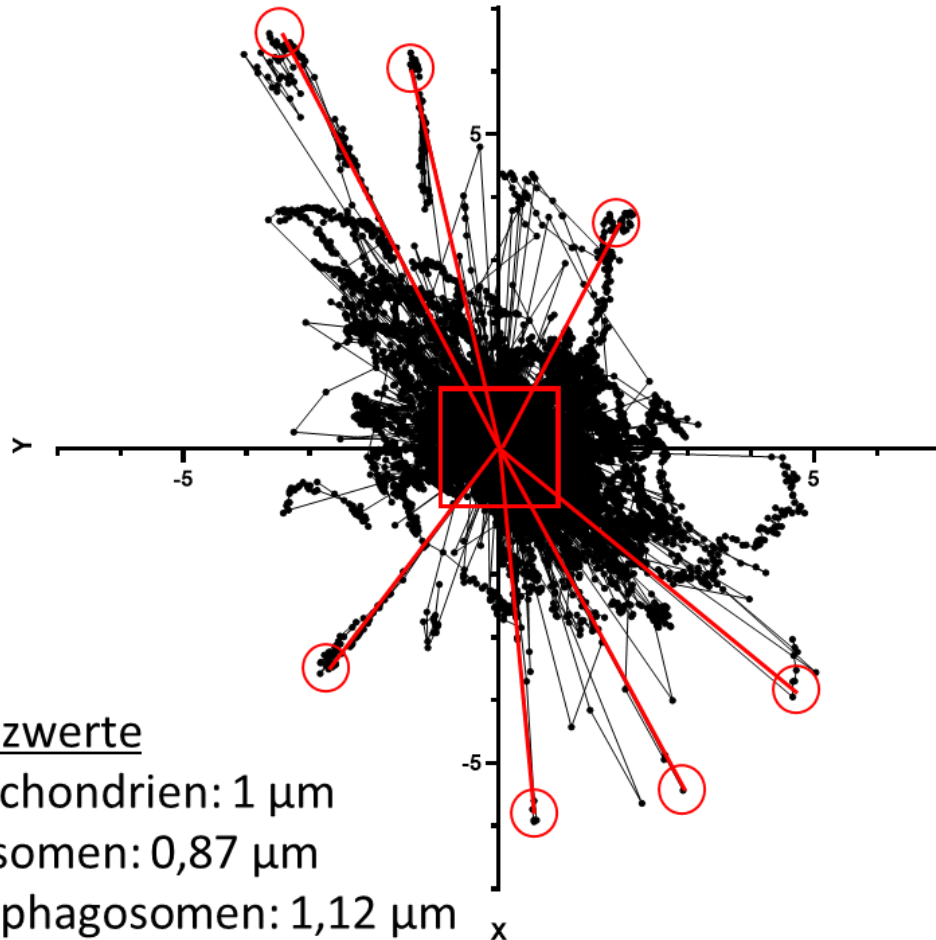
3.5.3 Filtern der Rohdaten und Grenzwertfindung

Um einen besseren Überblick über das Bewegungsverhalten der Organellen zu erhalten, wurden zunächst die X- und Y-Koordinaten über die Zeit von allen Organellen eines Videos gegeneinander aufgetragen (Abbildung 5). Dabei wurde der Startpunkt der Bewegung aller Organellen auf den Ursprung des Koordinatensystems (0/0) normiert.

Anhand der graphischen Darstellung konnte der Parameter der Maximalen Entfernung (siehe Abschnitt 3.5.2) als Grundlage für die Definition eines Grenzwertes zwischen „sich bewegenden“ und „stationären“ Organellen ausgemacht werden. Anschließend wurde die maximale Entfernung (zum Startpunkt), ermittelt durch das TrackMate Programm der ImageJ Software, jedes einzelnen Organells aller Zelllinien für die Berechnung des Grenzwertes verwendet. Der Grenzwert für jedes Organell ergab sich aus dem Mittelwert +

Standardabweichung ($MW + 1s$) und ist in Abbildung 5 für jedes Organell dargestellt.

Maximale Entfernung zum Startpunkt



Grenzwerte

Mitochondrien: $1 \mu\text{m}$

Lysosomen: $0,87 \mu\text{m}$

Autophagosomen: $1,12 \mu\text{m}$

Abbildung 5 Schematische Darstellung der Grenzwertbestimmung

Graphische Darstellung des Parameters der „maximalen Entfernung“ (zum Startpunkt) beispielhaft für Mitochondrien, normalisiert auf 0/0 als Startpunkt. Das rote Quadrat gibt den Bereich der stationären Mitochondrien an (Grenzwert $1 \mu\text{m}$). Die roten Striche und Kreise zeigen beispielhaft die weiteste Entfernung einzelner Mitochondrien während ihrer gesamten Bewegung. Die berechneten Grenzwerte für alle drei Organellen sind ebenfalls dargestellt.

3.5.4 Berechnung des Z-Scores und der Stopps

Mit Ausnahme der Dauer der Bewegung wurden die in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen kinetischen Parametern aus Gründen der Übersichtlichkeit in einem Z-Score für jeden Parameter zusammengefasst. Die Berechnung erfolgte nach Formel 5.

3 Methoden

$$Z(P_X^{Mut}) = \frac{\overline{P_X^{Mut}} - \overline{P_X^{Ctrl}}}{\frac{SD_X^{Mut}}{\sqrt{N_X^{Mut}}} + \frac{SD_X^{Ctrl}}{\sqrt{N_X^{Ctrl}}}}$$

Formel 5 Berechnung des Z-Scores für die 10 kinetischen Parameter

Der Z-Score gibt den Unterschied zwischen zwei Zelllinien für jeden der 10 ausgewerteten Parameter an. Die in der Formel verwendeten Abkürzungen sind nachfolgend erklärt.

$Z(P_X^{Mut})$ = Z-Score von Parameter x (z.B. Mittlere Geschwindigkeit) einer NPC-defizienten Zelllinie im Vergleich zu Ctrl A.

P_X^{Mut} = Mittelwert von Parameter x der NPC-defizienten Zelllinie.

P_X^{Ctrl} = Mittelwert von Parameter x der Kontroll-Zelllinie (Ctrl A).

SD_X^{Mut} = Standardabweichung von Parameter x der NPC-defizienten Zelllinie.

SD_X^{Ctrl} = Standardabweichung von Parameter x der Kontroll-Zelllinie (Ctrl A).

N_X^{Mut} = Anzahl der Werte zur Berechnung des Mittelwertes von Parameter x NPC-defizienten Zelllinie.

N_X^{Ctrl} = Anzahl der Werte zur Berechnung des Mittelwertes von Parameter x der Kontroll-Zelllinie (Ctrl A).

Zusätzlich wurde anhand der X-, Y-Koordinaten über die Zeit die Anzahl an Stopps der einzelnen Organellen berechnet. Eine Geschwindigkeit niedriger als 0,05 $\mu\text{m/s}$ zwischen zwei Zeitpunkten wurde als Stopp definiert und die Anzahl an Stopps pro Organell für jedes Mitochondrium gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert der Stopps für jedes Video berechnet.

3.6 Untersuchung der mitochondrialen Morphologie und Funktion

3.6.1 Untersuchung der mitochondrialen Morphologie

Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, immunzytochemisch mit dem Antikörper gegen Tom20 gefärbt. Anschließend wurden 30 Fotos von 3 unabhängigen Experimenten aufgenommen und die Morphologie der Mitochondrien mit Hilfe der Fiji ImageJ Software (NIH) und dem Shape Descriptor PlugIn ausgewertet. Dabei wurden die Fläche, der Umfang und die Länge und Breite der Organellen bestimmt (siehe Abbildung 6) und daraus der Form Faktor (siehe Formel 6 und Abbildung 6b) und das Längen-Breiten-Verhältnis (siehe Formel 7 und Abbildung 6b) bestimmt.

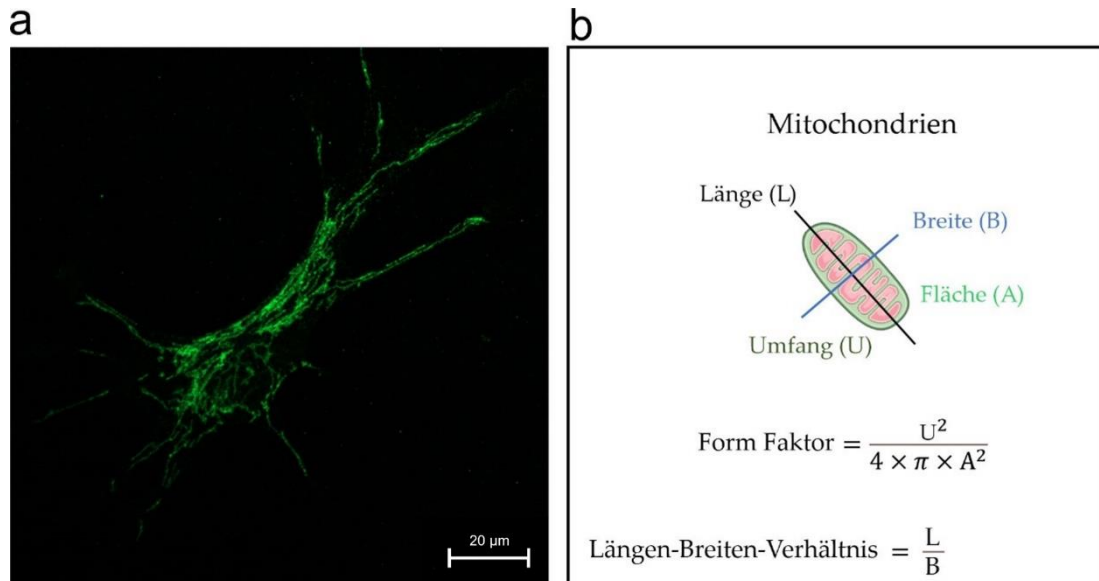


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Auswertung der mitochondrialen Morphologie

a Repräsentatives Bild einer Immunfluoreszenz-Färbung des mitochondrialen Markers Tom20. **b** Schematische Darstellung der ausgewerteten und berechneten Parameter zur Analyse der Morphologie von Mitochondrien.

$$\text{Form Faktor} = \frac{U^2}{4 \times \pi \times A^2}$$

Formel 6 Berechnung des mitochondrialen Form Faktors

Mit dem Umfang U und der Fläche A.

$$\text{Länge - Breite - Verhältnis} = \frac{L}{B}$$

Formel 7 Berechnung des Längen-Breiten-Verhältnisses

Mit der Länge L und der Breite B der Mitochondrien.

3.6.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Für die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials wurde der Farbstoff JC-10 verwendet. Dieser reichert sich selektiv in der Membran von Mitochondrien an und bildet dort, abhängig von Membranpotential Aggregate oder liegt als Monomer vor. Bei physiologischem Membranpotential bildet der Farbstoff Aggregate, welche bei Anregung mit einer Wellenlänge von 540 nm Licht einer Wellenlänge von 590 nm emittieren und rot erscheinen (engl. Excitation = Ex und Emission = Em). Bei niedrigem Membranpotential hingegen erfolgte keine Aggregatbildung des Farbstoffs und die Monomere emittieren bei Anregung mit einer Wellenlänge von 490 nm Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm, welches Grün erscheint. Somit kann das Verhältnis

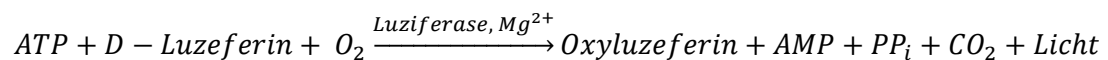
3 Methoden

zwischen roter und grüner Fluoreszenz als Maß für das Membranpotential der Mitochondrien verwendet werden.

Zur Färbung der Zellen wurden die NDZs für 30 min mit 20 µM des Farbstoffs JC-10 in HEPES/HBSS-Puffer bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität bei Ex=490 und Em=525 nm und Ex=540 und Em=590 nm mit einem Plattenlesegerät bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensität bei 590 nm und 525 nm berechnet.

3.6.3 Bestimmung der ATP-Konzentration

Zur Bestimmung der intrazellulären ATP Konzentration wurde das ATPLite Assay Kit der Firma Perkin Elmer® verwendet. Der Assay beruht dabei auf der Reaktion von ATP mit D-Luziferin mit Luziferase als Katalysator, bei dem Energie in Form von Luminiszenz freigesetzt wird. Die Reaktionsgleichung ist nachfolgend dargestellt.



Formel 8 Formel der Reaktion von ATP mit D-Luziferin

Adenosin-Triphosphat (ATP) reagiert mit D-Luziferin unter Sauerstoffeinfluss (O₂) mit Hilfe des Enzyms Luziferase und Magnesium-Ionen (Mg²⁺) als Ko-Faktor zu Oxyluziferin, Adenosin-Monophosphat (AMP), zwei Phosphatgruppen (PP_i), und Kohlenstoffdioxid (CO₂). Die überschüssige Energie wird in Form von Luminiszenz frei, dessen Intensität proportional zur vorhandenen Menge an ATP ist.

Dabei ist das emittierte Licht proportional zur ATP-Konzentration und kann somit als Nachweis verwendet werden.

Vor der Durchführung des Assays wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und anschließend für 5 min unter Schütteln mit dem im Kit enthaltenen Lyse-Puffer inkubiert. Nach Zugabe des ATP-Substrates wurde erneut zunächst für 5 min schüttelnd und dann noch für 10 min im Dunkeln inkubiert, bevor die Emission des Lichts in einem Plattenlesegerät der Firma TECAN gemessen wurde.

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Proteinextraktion

Zur Extraktion des Gesamtproteins wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend zum Lysieren der Zellen für 25 min mit RIPA-Puffer (TRIS 20 µM, NaCl 137 µM, Natrium Deoxycholat 12 µM, EDTA 2 µM,

0,1 % SDS, 1 % Triton® X-100, 10 % Glycerol), welchem sowohl ein EDTA-freier Protease Inhibitor (cOmplete™ Mini) sowie ein Phosphatase Inhibitor (PhosStop™) zugesetzt wurden, auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate für 20 min bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert, der Überstand als Proteinextrakt abgenommen und dann bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels des Pierce™ BCA Protein Assay Kits von Thermo Fisher Scientific. Der Assay beruht dabei auf der sogenannten Biuretreaktion, bei der Kupfer mit Protein in einer alkalischen Umgebung einen Chelatkomplex bildet. Dabei werden die zweifach geladenen Kupferionen (Cu^{2+}) zu Cu^{1+} reduziert. Diese reagieren im nächsten Schritt mit Bicinchoninsäure (BCA) was zu einer intensiven violetten Färbung führt. Die gebildeten BCA-Kupfer-Komplexe zeigen bei 562 nm eine starke Extinktion, welche proportional zur Proteinkonzentration ist. Durch Mitführen einer Standardreihe, kann so die Proteinkonzentration in Proben bestimmt werden.

Es wurden 10 µl des Proteinextrakts mit 20 µl ddH₂O verdünnt und in einer 96-Wellplatte mit 200 µl einer 1:50 Mischung der Komponenten A und B des Kits gemischt und für 45 min bei 37°C schüttelnd im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Lichtabsorption der Probe bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 562 nm in einem Plattenlesegerät gemessen. Die Absorption ist dabei proportional zur Menge an Protein in der Probe. Anschließend wird die Proteinkonzentration anhand einer Standardreihe bestimmt. Für die nachfolgende Gelelektrophorese wurden 20 µg Protein mit ddH₂O und 5x Laemmli-Puffer vermischt, um ein Gesamtvolumen von 25 µl zu erhalten. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und die Gelelektrophorese vorbereitet. Es wurde die Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell sowie die Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels (4-15 %) von Bio-Rad Laboratories verwendet. Der Elektrophorese Puffer bestand aus 250 mM TRIS, 2 M Glyzin und 0,1 % SDS. 25 µl der Proben, sowie 2 µl Precision plus Protein Dual Xtra Standard

3 Methoden

wurden in die Taschen pipettiert und die Elektrophorese in einem zwei Stufen Protokoll (5 min 100V, 25 min 300V) durchgeführt.

3.7.4 Western Blot

Für den Western Blot der Proteine wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System sowie die Trans-Bolt® Turbo™ Transfer Packs (Midi Format, 0,2µm Nitrozellulose) von Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Membranen wurde nach dem Blotten für 5 min in TRIS-Puffer (TBS, 20 mM TRIS und 137 mM NaCl (pH 7.5)) gewaschen und anschließend für 1 h in 5 % Rinderserum (engl. bovine serum albumin, BSA) in TBS mit 0,1 % Tween® 20 (TBST) inkubiert.

Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine mit primären Antikörpern hergestellt in unterschiedlichen Spezies gegen Tom20 (Maus, 1:1 000), Hsp60 (Kaninchen, 1:1 000), Parkin (Maus, 1:500), LC3BII/I (Kaninchen, 1:1 000), Miro1 (Maus, 1:1 000), Miro2 (Kaninchen, 1:1 000) und p62 (Kaninchen, 1:1 000) in der jeweiligen Verdünnung in 3 % BSA in TBST durch Inkubation über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln. Zur Normalisierung der Proteinmenge wurden die Membranen am nächsten Tag zunächst 3x für 5 min mit TBST gewaschen und bei Raumtemperatur (RT) mit einem primären Antikörper gegen GAPDH (Maus, 1:10 000) inkubiert. Nach erneuten Waschschritten erfolgte die Inkubation für 2h mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern gerichtet gegen die Wirtspezies der primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 000 in 3 % BSA in TBST. Die Membranen wurden erneut mit TBST, und zuletzt mit TBS gewaschen und dann getrocknet. Für die Visualisierung des Fluoreszenzsignals wurde das Odyssey Infrared Imaging System der LI-COR Biosciences GmbH verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mit der Image Studio Lite Software (Version 5.2).

3.8 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 8.1 (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Um die Daten auf Normalverteilung zu testen, wurde der D'Agostino-Pearson-Test verwendet. Normalverteilte Datensätze wurde mit Hilfe einer One- (Vergleich der NPC-defizienten Zellen mit den Kontrollzelllinien) oder Two-Way ANOVA (Vergleich der NPC-defizienten Zellen mit den Kontrollzelllinien sowie der Effekt der Behandlung auf die einzelnen Zelllinien) mit Dunnett's oder Sidak's *post hoc* Test auf

statistische Signifikanz untersucht. Für nicht normalverteilte Datensätze wurde der Kruskal-Wallis Rang-Test angewendet. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Mit */#/\$ = $p < 0,05$, **/##/\$\$ = $p < 0,01$, ***/###/\$\$\$ = $p < 0,001$. * zeigt die Signifikanz im Vergleich zu Ctrl A, # im Vergleich zu Ctrl B und \$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Zelllinie an. Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Morphologie und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert. Dazu gehören z.B. die ATP-Produktion sowie die Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes und die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS). Deswegen ist es nicht verwunderlich, dass eine Schädigung der Mitochondrien mit einer Vielzahl von Erkrankungen, so auch NP-C assoziiert ist. Der erste Schritt der Untersuchung von Mitochondrien in NP-C war demnach die Analyse ihrer Größe und Form. Anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen des Markers Mitochondriale Import-Rezeptor-Untereinheit TOM20 Homolog (Tom20), wurde wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, die Fläche (Abb. 7b), der Umfang (Abb. 7c), die Länge (Abb. 7d) und die Breite (Abb. 7e) mit Hilfe des „Shape Descriptor“ Plugins der ImageJ Software bestimmt und daraus anhand der Formeln (Abb. 3.6) der Form Faktor (Abb. 7f) und das Längen-Breiten-Verhältnis (Abb. 7g) berechnet. Es wurden 30 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten für jede Zelllinie analysiert.

a

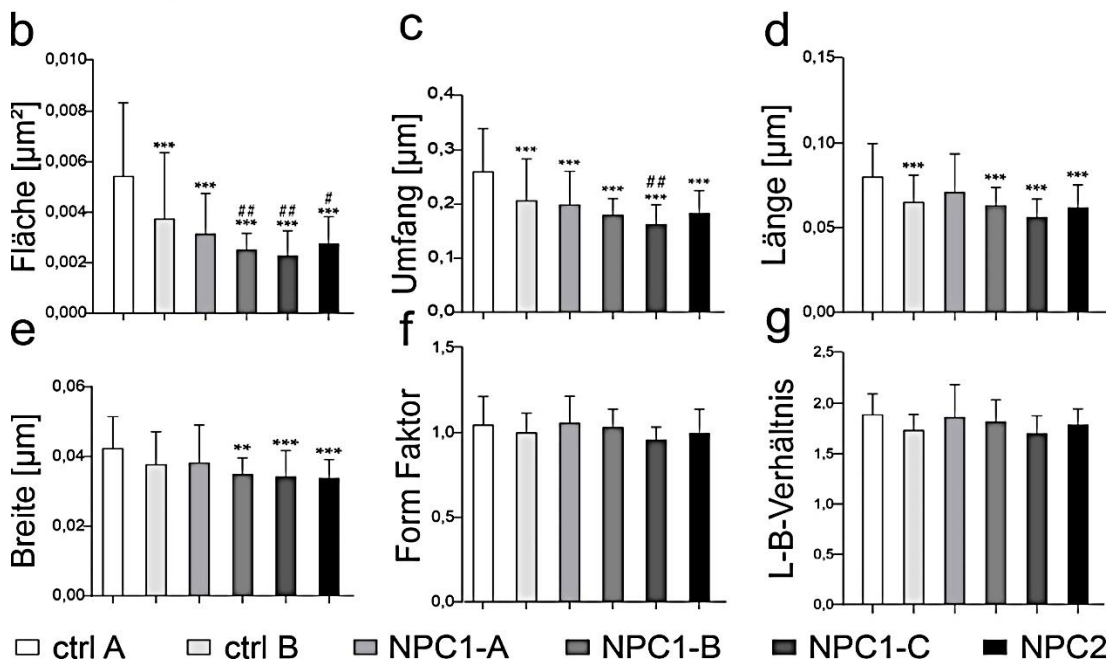
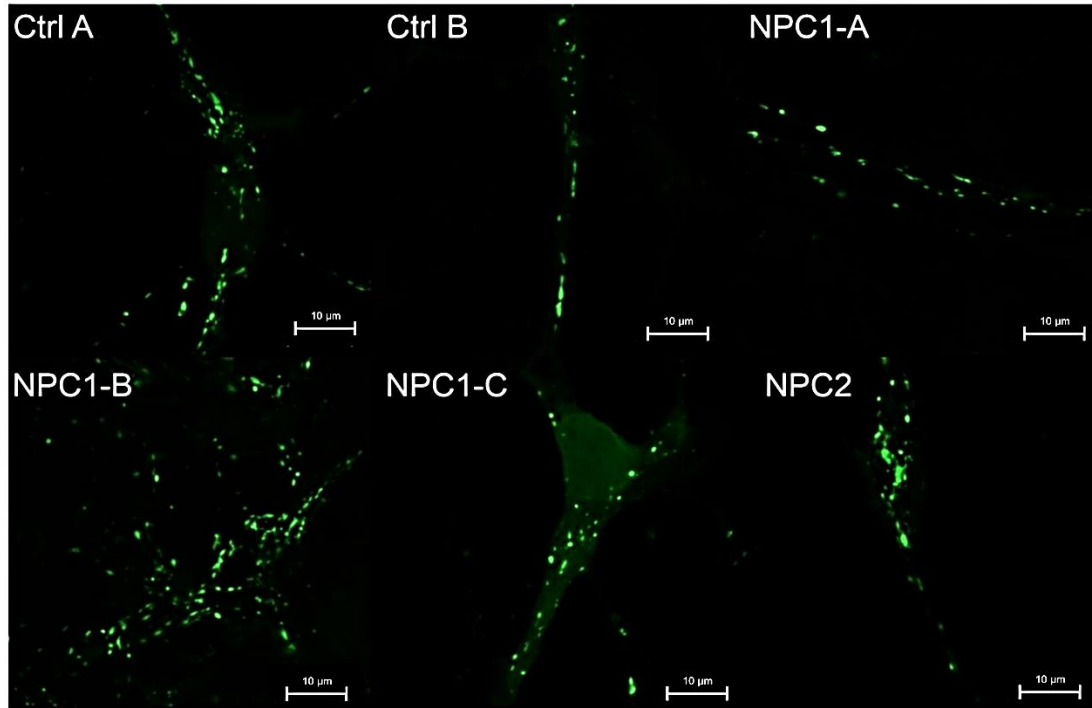


Abbildung 7 Analyse der mitochondrialen Morphologie

a Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz-Färbungen des mitochondrialen Markers Tom20. **b** Die Fläche der Mitochondrien war in allen NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Zu Ctrl B traten keine Unterschiede auf. **c** Der Umfang der Mitochondrien war in allen NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Zu Ctrl B war lediglich der Umfang der Zelllinie NPC1-C reduziert. **d** Die Länge war in allen NPC-defizienten Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie NPC1-A, im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Zu Ctrl B traten keine Unterschiede auf. **e** Die Breite war den NPC1-defizienten Zelllinien NPC1-B und NPC1-C, sowie in der NPC2-defizienten Zelllinie im Vergleich zu Ctrl A signifikant reduziert. Zu Ctrl B traten keine Unterschiede auf. **f** Der Formfaktor und **g** das Längen-Breiten-Verhältnis wiesen keine Unterschiede zwischen den Zelllinien auf. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

4 Ergebnisse

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass alle NPC1-, die NPC2-defiziente Zelllinie sowie die Ctrl B im Vergleich zu Ctrl A eine signifikant reduzierte Fläche und einen kleineren Umfang aufwiesen (Abb. 7b und 7c). Im Vergleich zu Ctrl B zeigten lediglich die Zelllinien NPC1-B, NPC1-C und NPC2 eine reduzierte Fläche, wohingegen der Umfang nur in der Zelllinie NPC1-C signifikant reduziert war. Im Vergleich zu Ctrl A war die Länge und Breite der Mitochondrien in den Zelllinien NPC1-B, NPC1-C und NPC2 signifikant reduziert. Allerdings unterschieden sich auch die beiden Kontrollzelllinien in Bezug auf die Länge der Mitochondrien (Abbildung 7d und 7e). Im Vergleich zu Ctrl B war die Länge und Breite der NPC-defizienten Zelllinien nicht verändert. Der berechnete Formfaktor (Abb. 7f) und das Längen-Breiten-Verhältnis (Abb. 7g) waren hingegen nicht verschieden. Generell waren die Mitochondrien der NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Ctrl A kleiner, jedoch von der Form her unverändert. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass sich auch die beiden Kontrollzelllinien in Fläche, Umfang und Länge der Mitochondrien unterschieden.

4.2 Analyse der Funktion von Mitochondrien

Neben der Größe und Form wurden die Anzahl und die Funktion der Mitochondrien genauer untersucht. Zur Quantifizierung der Anzahl der Mitochondrien wurde die Expression von Tom20 mittels Western Blot bestimmt (Abb. 8a und 8b). Die Expression von Hsp60 wurde als Marker für mitochondrialen Stress verwendet (Abb. 8a und 8c).

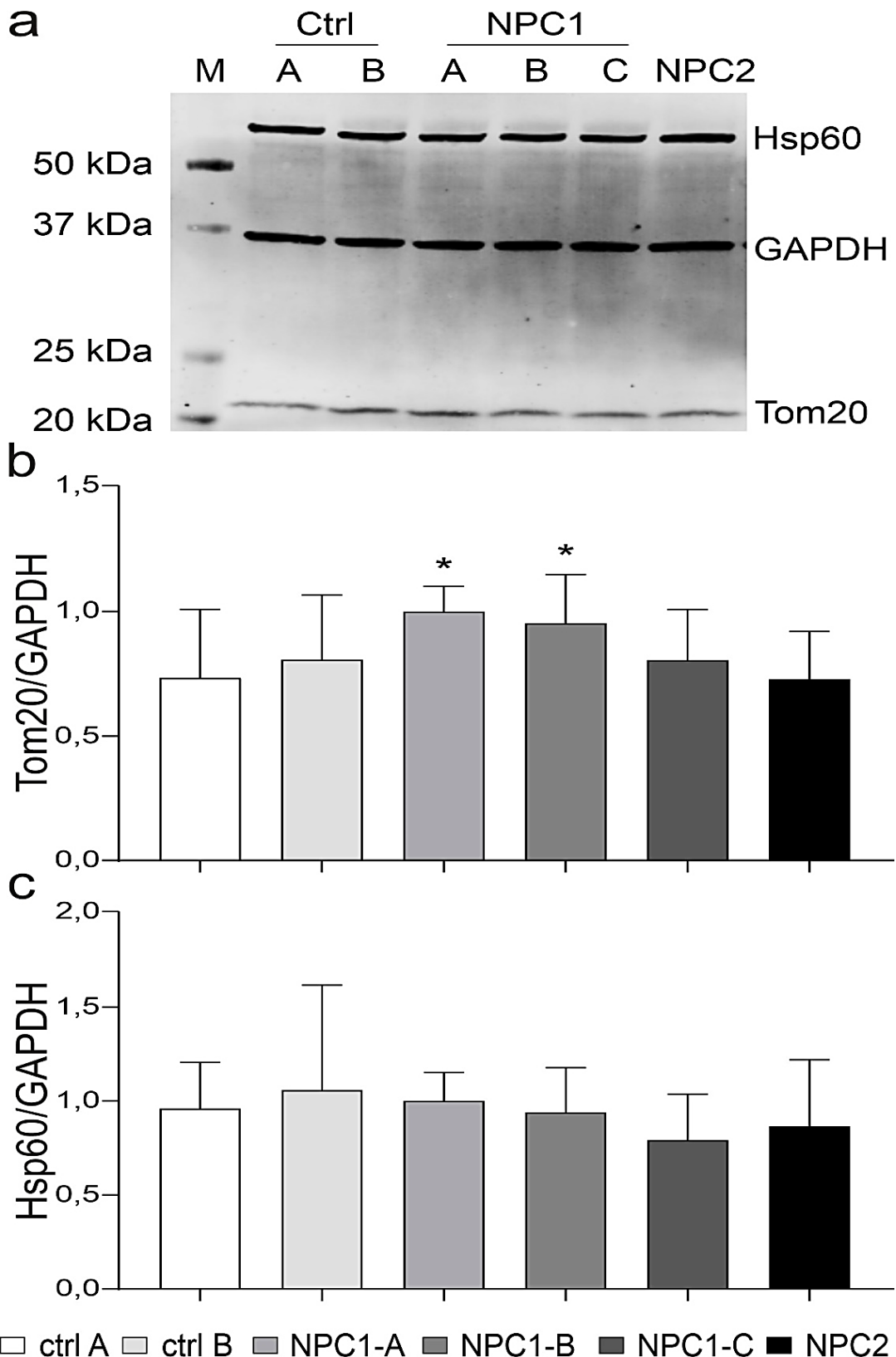


Abbildung 8 Analyse der Expression von Tom20 und Hsp60

a Repräsentativer Western Blot des mitochondrialen Markers Tom20 und des mitochondrialen Hitzeschockproteins Hsp60. GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Die Quantifizierung der Expression von Tom20 zeigte eine erhöhte Expression in den NPC1-defizienten Zelllinien NPC1-A und NPC1-B im Vergleich zu Ctrl A. **c** Die Analyse der Expression von Hsp60 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

4 Ergebnisse

Die Analyse der Expression von Tom20 (Abb. 8b) ergab ein erhöhtes Level in den NPC1-defizienten Zelllinien NPC1-A und NPC1-B im Vergleich zu Ctrl A, was auf mehr Mitochondrien hindeutet. Im Vergleich zu Ctrl B war dieser Anstieg jedoch nicht signifikant.

Ein erstes Indiz für Stress in Mitochondrien ist die Expression von Hsp60, welches als Chaperon bei der Faltung neusynthetisierter Proteine fungiert. Ein Anstieg des Proteinlevels könnte somit auf eine nötige Neusynthese von mitochondrialen Proteinen hindeuten, um die Produktivität zu steigern oder einer verminderten Aktivität entgegenzuwirken. Die Expression von Hsp60 (Abb. 8c) war jedoch nicht verändert, was nicht auf eine Stress-induzierte Proteinproduktion hindeutet.

Um die Vitalität der Mitochondrien bewerten zu können, wurde zusätzlich deren Membranpotential (Abb. 9a und 9b) und die ATP-Produktion (Abb. 9c) untersucht.

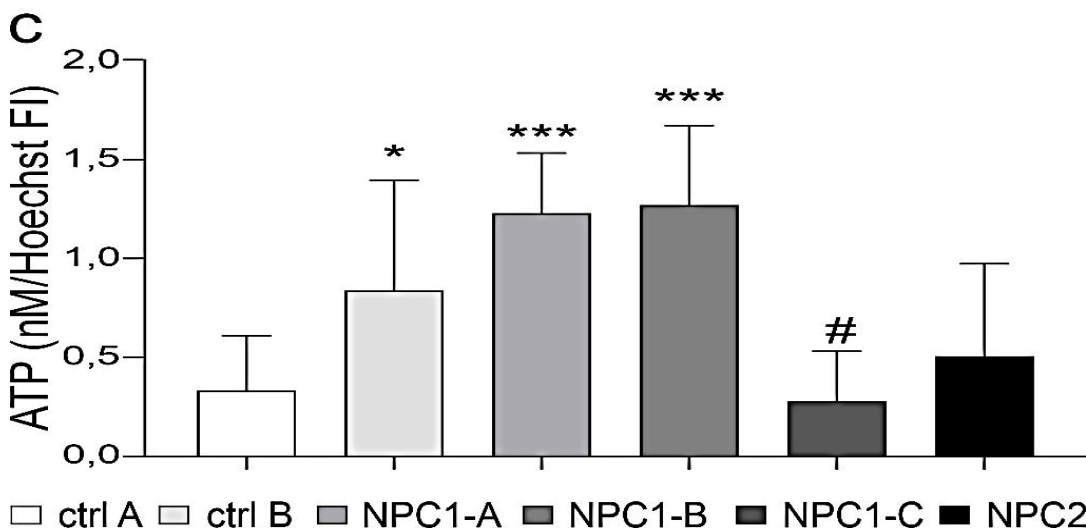
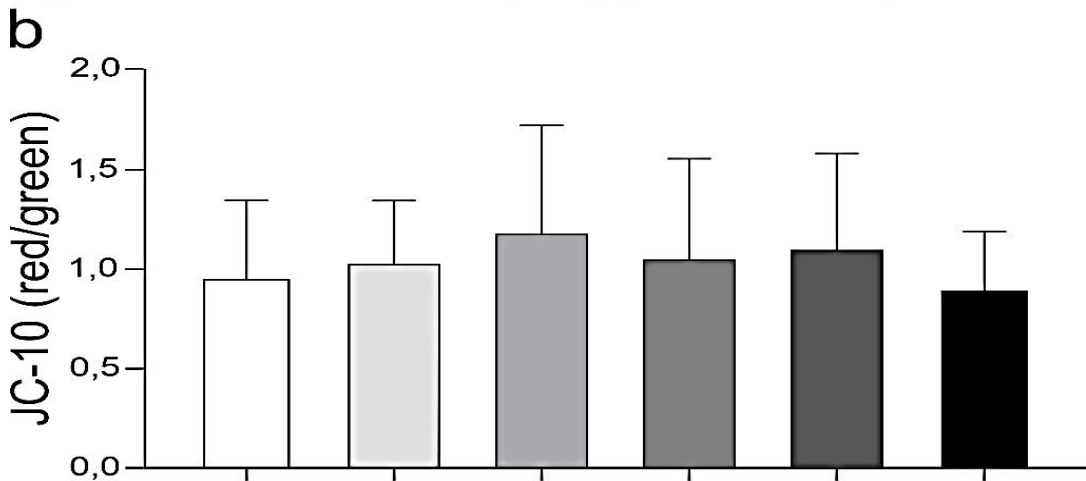
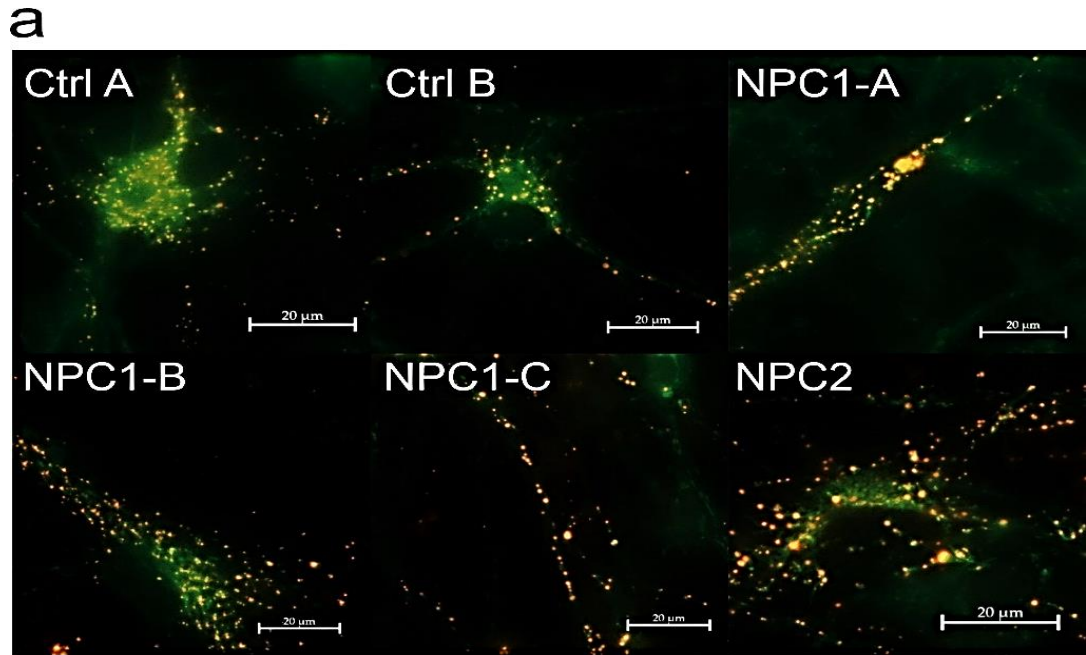


Abbildung 9 Analyse der Funktionalität der Mitochondrien

a Repräsentative Bilder des mittels JC-10 sichtbar gemachten mitochondrialen Membranpotentials. **b** Das mitochondriale Membranpotential wies keine Unterschiede zwischen den Zelllinien auf. **c** Die ATP Produktion war in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B signifikant im Vergleich zu Ctrl A erhöht. Im Vergleich zu ctrl B traten keine Unterschiede auf. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

4 Ergebnisse

Das Membranpotential der Mitochondrien zeigte keine Unterschiede zwischen den Zelllinien, was darauf hinweist, dass die Mitochondrien in NPC1- und NPC2-defizienten Zellen keine funktionellen Defizite aufweisen.

Die ATP-Produktion (Abb. 9c) war in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B im Vergleich zu Ctrl A erhöht, was auf einen erhöhten Energiebedarf der Zellen hindeuten könnte und mit der erhöhten Anzahl an Mitochondrien in diesen Zelllinien korreliert. Allerdings war auch hier im Vergleich zu Ctrl B kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

Die Proteine mitochondrialen Rho GTPase 1 und 2 (Miro1 und Miro2) werden mit vielen Prozessen, wie zum Beispiel dem Transport der Mitochondrien und ihrem Abbau durch die Mitophagie in Verbindung gebracht, weswegen eine Analyse dieser Proteine Hinweise auf potentiell beeinträchtigte Signalwege liefern könnte. Die Analyse der Expression von Miro1 und Miro2 ist in Abbildung 10 dargestellt.

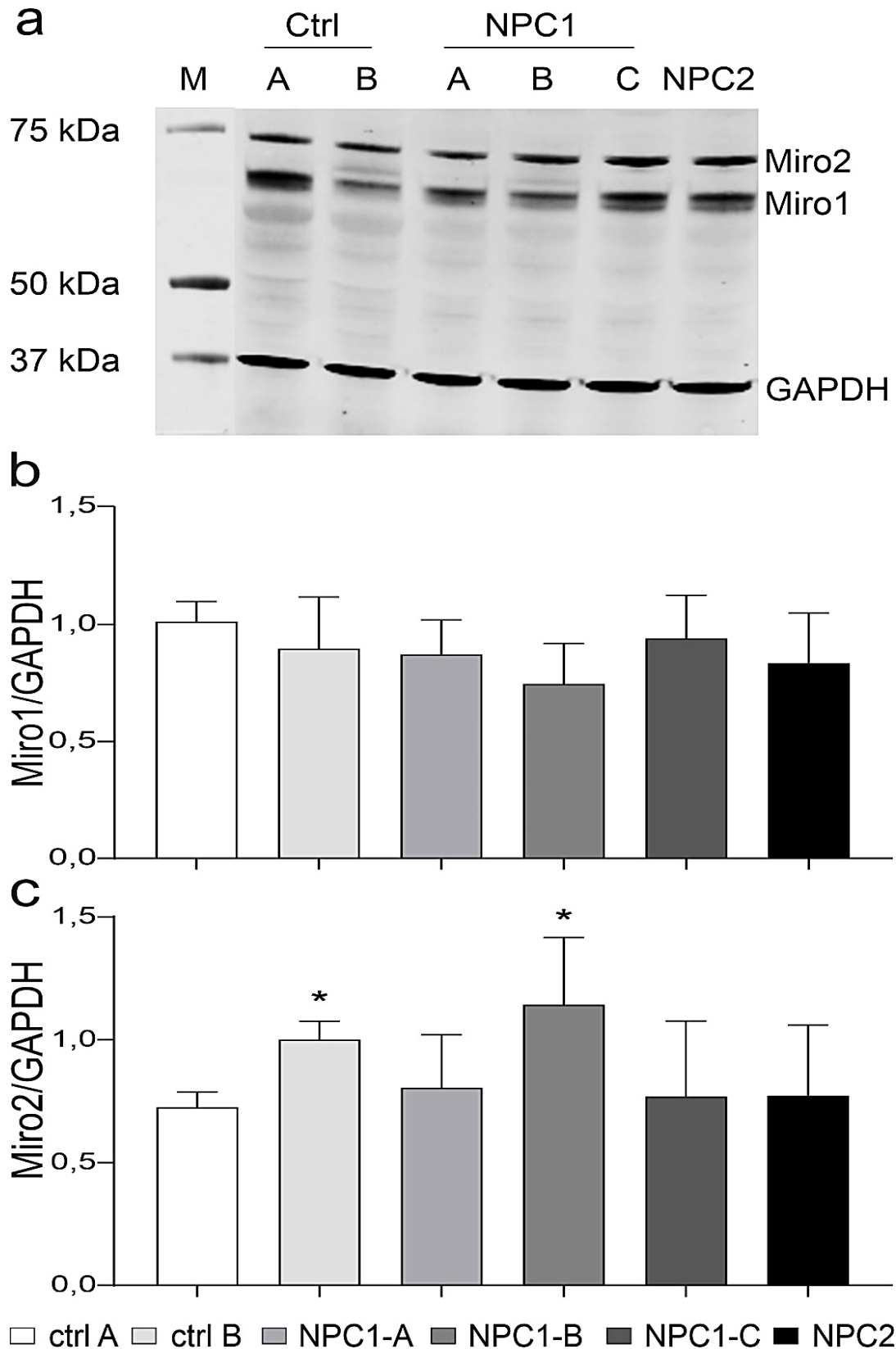


Abbildung 10 Analyse der Expression von Miro1 und Miro2

a Repräsentativer Western Blot der mitochondrialen Rho GTPase 1 und 2 (Miro1 und Miro2). GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Die Expression von Miro1 zeigte keine signifikanten Unterschiede in den NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den beiden Kontrollzelllinien, jedoch war die Miro1 Expression der Zelllinie NPC1-B reduziert. **c** Die Expression von Miro2 war in Ctrl B und NPC1-B im Vergleich zu Ctrl A signifikant erhöht. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

4 Ergebnisse

Die Analyse von Miro1 (Abb. 10a und 10b) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien, auch wenn die Zelllinie NPC1-B eine leicht reduzierte Expression von Miro1 zeigte.

Die Proteinexpression von Miro2 (Abb. 10a und 10c) war in der Zelllinie NPC1-B signifikant im Vergleich zu Ctrl A erhöht. Jedoch zeigten auch die beiden Kontrollzelllinien ein signifikant verschiedenes Ergebnis.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der reduzierten Größe die Funktion der Mitochondrien nicht beeinträchtigt zu sein scheint. Lediglich zwei Zelllinien (NPC1-A und NPC1-B) zeigten sowohl eine erhöhte Anzahl an Organellen als auch eine gesteigerte ATP Produktion, was auf eine gesteigerte Aktivität hindeutet oder aber als eine Reaktion auf Probleme in den Zellen hindeuten könnte.

Die Zelllinien NPC1-B zeigte eine reduzierte Expression von Miro1, wohingegen die Miro2 Expression in dieser Zelllinie erhöht war. Da Miro1 und Miro2 in eine Vielzahl von Prozessen, wie z.B. den Transport der Mitochondrien, aber auch deren Abbau mittels Mitophagie involviert ist, wurden speziell diese Prozesse detaillierter untersucht.

4.3 Transport von Mitochondrien

Durch den hohen ATP-Bedarf und die große Entfernung zwischen Synthese der Mitochondrien im Zellsoma und Ausführung ihrer Funktion in Axonen und Dendriten ist ein funktionierender Transport essentiell für das Überleben von neuronalen Zellen. Mittels Live-Cell-Imaging wurde der Transport der Mitochondrien über 5 min aufgenommen und die Kinetik anhand von 11 Parametern bewertet (Abb. 11).

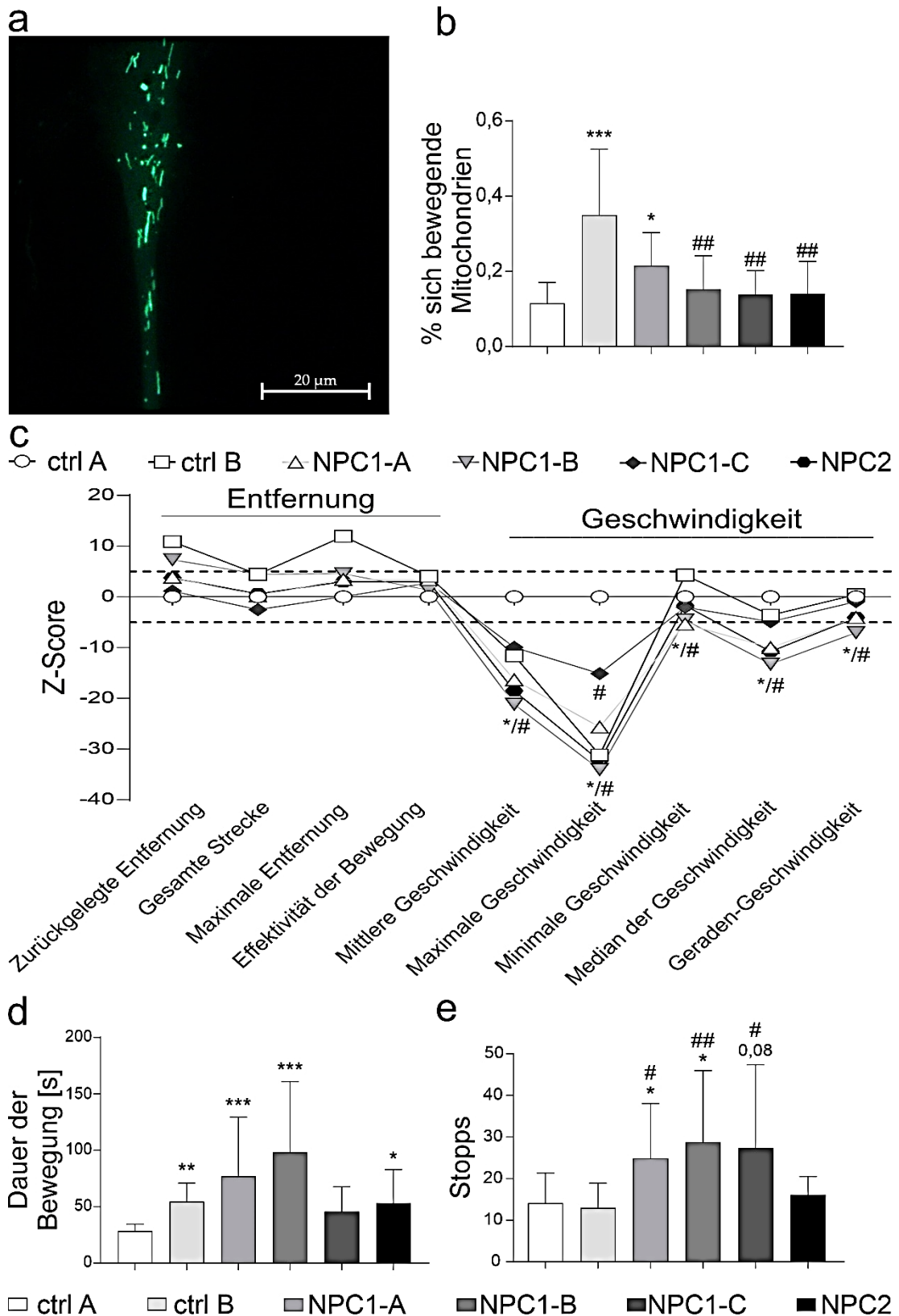


Abbildung 11 Analyse des Transports der Mitochondrien

a Repräsentatives Bild der mit der CellLight™ BacMam 2.0 für Mitochondrien transduzierten Ctrl A mit grün-fluoreszierenden Mitochondrien. **b** Der prozentuale Anteil, der sich bewegenden Mitochondrien ergab sich aus allen Mitochondrien, welche sich während ihres Weges weiter als der Grenzwert von ihrem Startpunkt entfernt haben. Die Zelllinie NPC1-A zeigte einen erhöhten Anteil sich bewegender Mitochondrien im Vergleich zu Ctrl A. Die anderen beiden NPC1-defizienten (NPC1-

4 Ergebnisse

B und NPC1-C) und die NPC2-defiziente Zelllinie zeigten einen reduzierten Anteil sich bewegender Mitochondrien im Vergleich zu Ctrl B. Auch die beiden Kontrollzelllinien zeigten signifikante Unterschiede zueinander. **c** Berechneter Z-Score für 9 kinetische Parameter. Im Vergleich zu den beiden Kontrollen zeigten die Zelllinien NPC1-A, NPC1-B und NPC2 eine Reduktion in den ausgewerteten Geschwindigkeitsparametern. Die Zelllinie NPC1-C hingegen zeigte lediglich im Vergleich zu Ctrl A eine reduzierte mittlere und maximale Geschwindigkeit, sowie einen reduzierten Median der Geschwindigkeit. Die Entfernungsparameter waren nicht verschieden. **d** Die Dauer der Bewegung war im Vergleich zu Ctrl A in den Zelllinien NPC1-A, NPC1-B und NPC2 signifikant erhöht. Im Vergleich zu Ctrl B traten keine Unterschiede auf. **e** Berechnete Anzahl der Stopps pro Bewegung. Die drei NPC1-defizienten Zelllinien zeigten eine erhöhte Anzahl an Stopps im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Abbildung 11b zeigt große Unterschiede zwischen den beiden Kontrollzelllinien, sowie zu den NPC-defizienten Zelllinien bezüglich des prozentualen Anteils der sich bewegenden Mitochondrien. So wiesen die NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zur Ctrl B einen reduzierten Anteil an sich bewegenden Mitochondrien auf. Im Vergleich zu Ctrl A hingegen war der prozentuale Anteil der sich bewegenden Mitochondrien in den NPC-defizienten Zelllinien leicht erhöht, auch wenn dies nur im Fall der Zelllinie NPC1-A statistisch signifikant war. Die Analyse der Geschwindigkeit und der zurückgelegten Strecke in Abbildung 11c zeigte ähnliche Unterschiede zwischen den beiden Kontrollzelllinien. So waren die zurückgelegte Strecke und die maximale Entfernung zum Startpunkt, sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit und die maximale Geschwindigkeit zwischen den beiden Kontrollzelllinien signifikant verschieden. Der Vergleich der NPC-defizienten Zelllinien mit beiden Kontrollzelllinien zeigte dennoch eine generell reduzierte Geschwindigkeit. Die mittlere Geschwindigkeit war in den Zelllinien NPC1-A, NPC1-B und NPC2 im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien signifikant reduziert. Für die Zelllinie NPC1-C war dies nur im Vergleich zu Ctrl A signifikant. Die maximale Geschwindigkeit war in allen NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Ctrl A signifikant reduziert. Zu Ctrl B zeigte die Zelllinie NPC1-C hingegen sogar eine signifikante Erhöhung des Parameters. Die anderen Zelllinien zeigten keine Unterschiede bezüglich der maximalen Geschwindigkeit im Vergleich zu Ctrl B. Die minimale Geschwindigkeit war in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B signifikant im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien reduziert. Die Zelllinien NPC1-C und NPC2 zeigten keine Unterschiede. Der Median der Geschwindigkeit war hingegen in allen NPC-

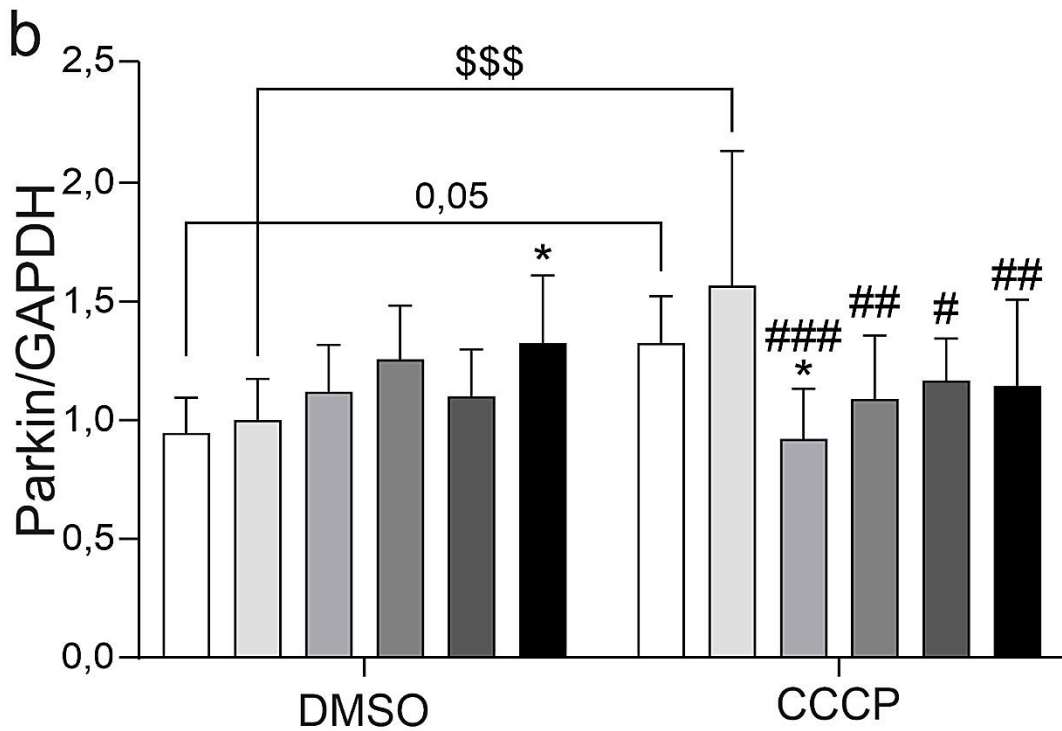
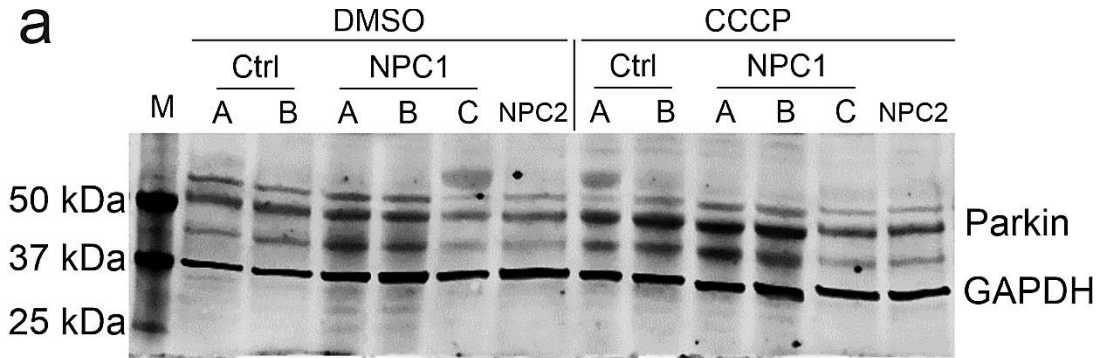
defizienten Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie NPC1-C, im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien reduziert. Das gleiche galt für die Geraden-Geschwindigkeit. Die zurückgelegte Strecke war nicht signifikant verschieden. Die Dauer der Bewegung (Abb. 11d) war ebenfalls nur im Vergleich zu Ctrl A signifikant in den NPC-defizienten Zelllinien erhöht, im Vergleich zu Ctrl B traten keine Unterschiede auf. Auch hier unterschieden sich die beiden Kontrollzelllinien signifikant voneinander. Interessanterweise war die Anzahl der Stopps (Abb. 11e) in allen NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien erhöht, was auf eine ungleichmäßigere Bewegung schließen lässt und die reduzierte Durchschnittsgeschwindigkeit erklären könnte.

4.4 Degradation von Mitochondrien durch Mitophagie

Eine reduzierte Geschwindigkeit der Mitochondrien könnte auf generelle Probleme bei Transportprozessen hindeuten, was eine Vielzahl anderer Prozesse beeinflusst. Während der Mitophagie werden die geschädigten Mitochondrien in Autophagosomen aufgenommen, welche dann zu den Lysosomen transportiert werden. Die beiden Organellen fusionieren und das aufgenommene Material wird durch lysosomale Hydrolasen und Proteasen degradiert. So werden Aminosäuren, Kohlenhydrate und Lipide für die Zelle recycelt. Dieser Prozess ist in eine Vielzahl von Teilprozessen unterteilt, an denen unterschiedlichste Proteine beteiligt sind. Im Falle von Schäden an den Mitochondrien erfolgt die Translokation von PINK1 und anschließend Parkin zu den Mitochondrien, welche, wiederum durch Ubiquitinierung bestimmter mitochondrialer Oberflächenproteinen, p62 rekrutieren, was zur Bildung von Autophagosomen um die markierten Mitochondrien und deren Abbau führt. Die Analyse der beschriebenen Teilschritte der Mitophagie nach Behandlung mit CCCP, zur Induktion von mitochondrialen Schäden, ist in den Abbildungen 12-18 dargestellt. Die Translokation bestimmter Proteine als Reaktion auf die CCCP Behandlung erfolgte dabei mit Hilfe von Kollisionsanalysen der jeweiligen Proteine und den Mitochondrien (Abb. 13 und 15). Um den Prozess der Aufnahme von Mitochondrien in Autophagosomen zu untersuchen, wurden die Zellen mit der BacMam 2.0 Technologie für Mitochondrien und Autophagosomen transduziert (Abb. 17a), um beide Organellen durch

4 Ergebnisse

Kopplung mit den Fluoreszenzmolekülen RFP (Mitochondrien) und GFP (Autophagosomen) sichtbar zu machen. Anschließend erfolgte eine Kolokalisationsanalyse (Abb. 17b) beider Fluoreszenzkanäle zur Analyse des Aufnahmeprozesses.



□ ctrl A □ ctrl B □ NPC1-A □ NPC1-B □ NPC1-C ■ NPC2

Abbildung 12 Analyse der Expression von Parkin nach Induktion der Mitophagie

a Repräsentativer Western Blot der Expression von Parkin mit und ohne CCCP-Behandlung. GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Die Expression von Parkin war unter basalen Bedingungen in der Zelllinie NPC2 erhöht. Nach der Behandlung mit CCCP zeigten lediglich die beiden Kontrollzelllinien einen signifikanten Anstieg der Expression. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass die Expression von Parkin unter basalen Bedingungen (DMSO) in der NPC2-defizienten Zelllinie im Vergleich zu Ctrl A erhöht war. Nach Induktion von mitochondrialen Schäden durch CCCP stieg

die Expression von Parkin lediglich in den beiden Kontrollzelllinien an. Die Translokation von Parkin wurde anhand von Kolokalisationsanalysen von Parkin und Miro1 mit und ohne CCCP-Behandlung evaluiert.

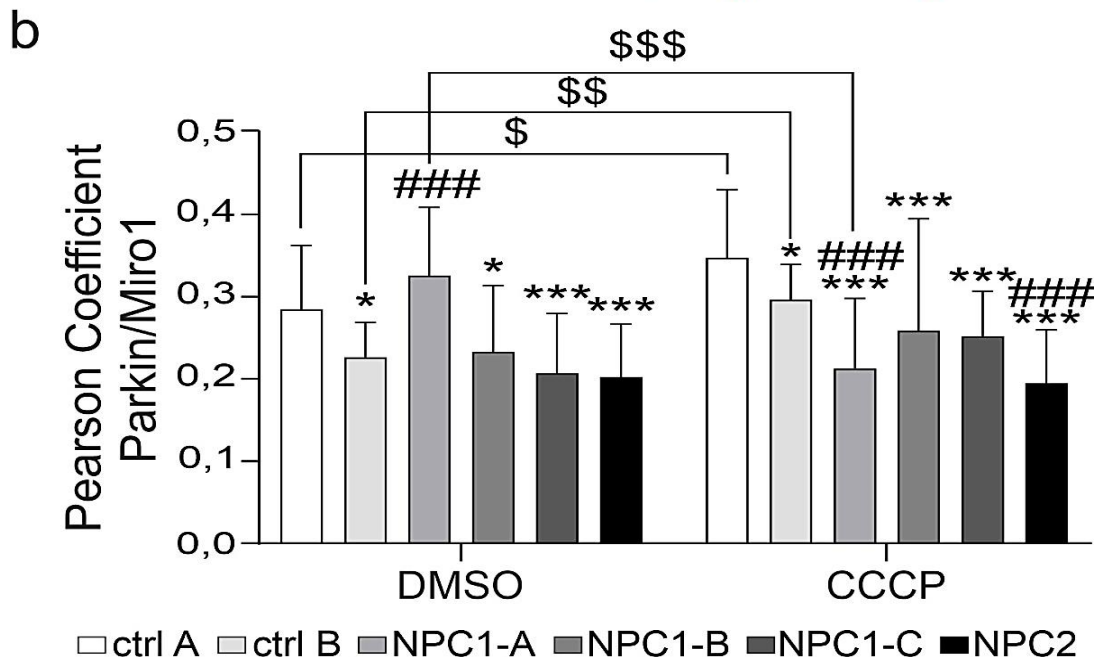
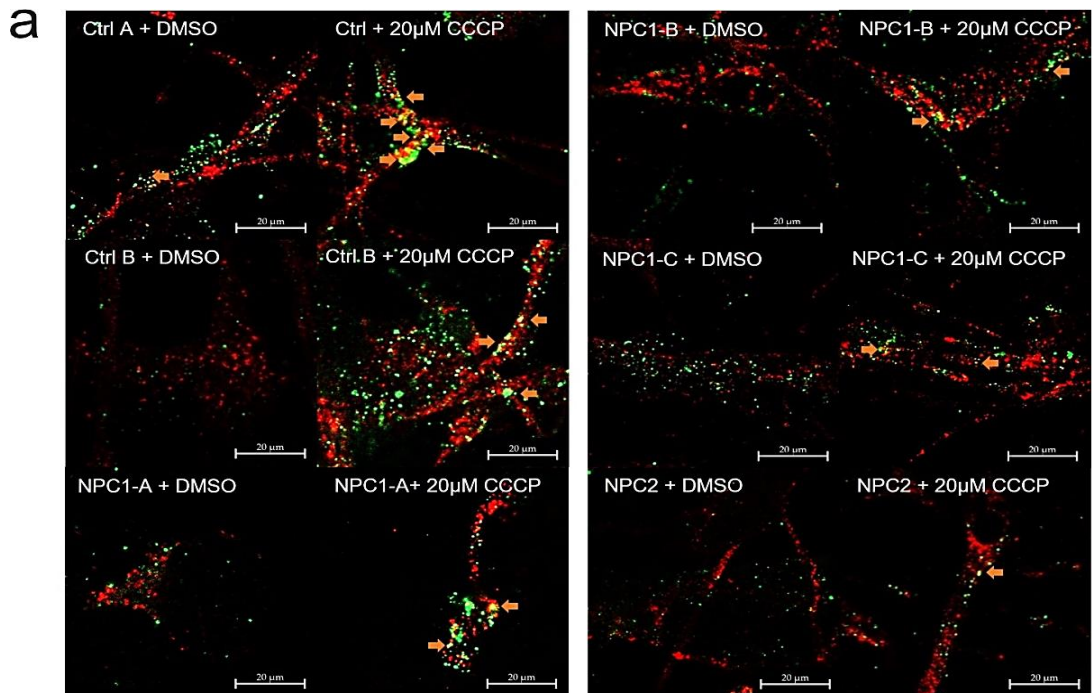
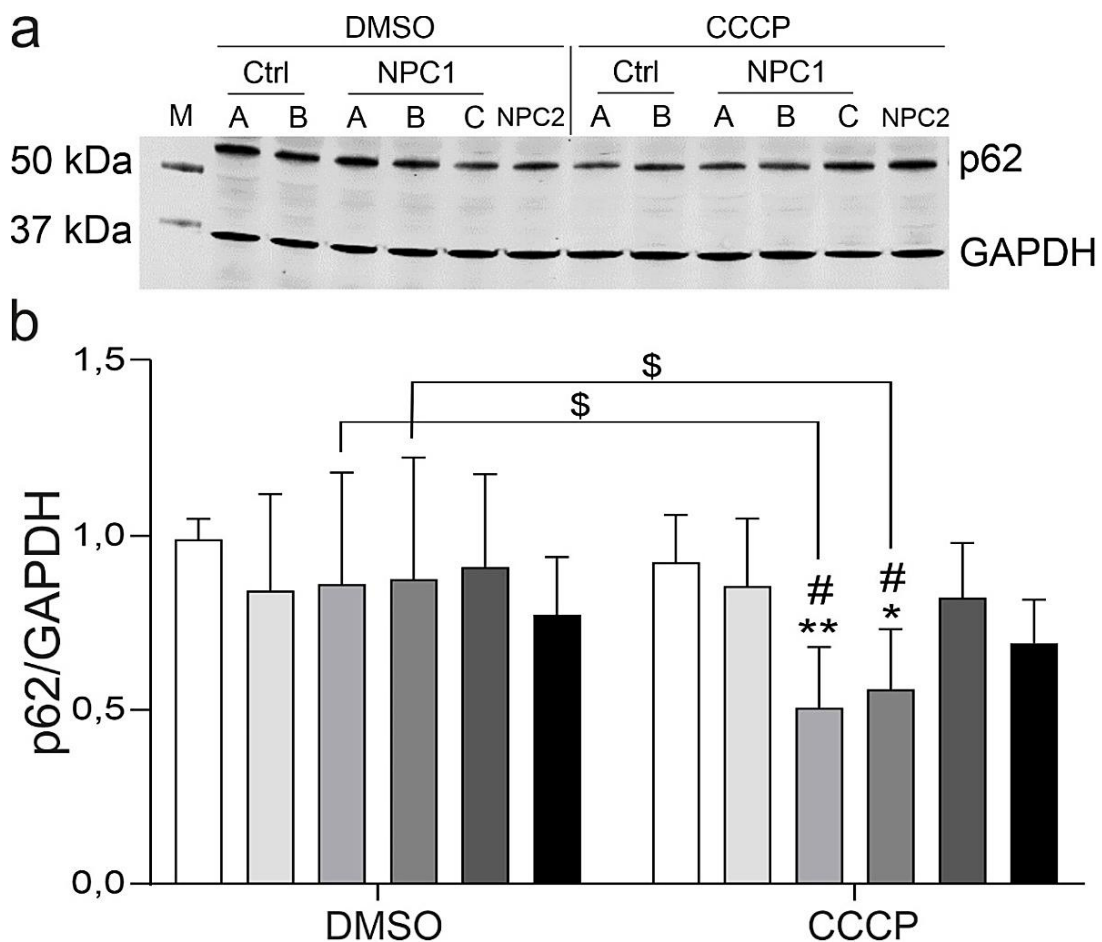


Abbildung 13 Analyse der Kolokalisation von Parkin und Miro1 nach Induktion der Mitophagie

a Repräsentative Bilder von Immunfluoreszenz-Färbungen von Miro1 (grün) und Parkin (rot) mit und ohne CCCP Behandlung. Die orangenen Pfeile heben Bereiche hervor in denen beide Fluoreszenzkanäle kolokalisieren. **b** Die Kolokalisation von Parkin und Miro1 unter basalen Bedingungen war in den Zelllinien NPC1-B, NPC1-C und NPC2 im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Die Zelllinie NPC1-A zeigte eine erhöhte Kolokalisation im Vergleich zu Ctrl B. Die CCCP-Behandlung führte lediglich in den Kontrollzelllinien zu einem Anstieg der Kolokalisation, wohingegen die Zelllinie NPC1-A eine Reduktion zeigte. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

4 Ergebnisse

Die Kolokalisation von Parkin und Miro 1 (Abb. 13) war ohne CCCP-Behandlung in den Zelllinien NPC1-B, NPC1-C und NPC2 im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Auch Ctrl B zeigte eine signifikant reduzierte Kolokalisation im Vergleich zu Ctrl A. Die Zelllinie NPC1-A hingegen wies gegenüber Ctrl B eine signifikant erhöhte Kolokalisation von Parkin und Miro1 auf. Nach CCCP-Behandlung stieg die Kolokalisation lediglich in den beiden Kontrollzelllinien an. In der Zelllinie NPC1-A war die Kolokalisation nach der Behandlung reduziert. Die Ubiquitinierung von Proteinen der OMM führt zur Rekrutierung von p62 zu den Mitochondrien, um die Aufnahme dieser in die sich bildende Phagophore zu vermitteln. In Abbildung 14 ist die Expression von p62 mit und ohne CCCP-Behandlung dargestellt.



□ ctrl A □ ctrl B ■ NPC1-A ■ NPC1-B ■ NPC1-C ■ NPC2

Abbildung 14 Analyse der Expression von p62 nach Induktion der Mitophagie
a Repräsentativer Western Blot der Expression von p62 mit und ohne CCCP-Behandlung. GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Die Expression von p62 war unter basalen Bedingungen in den NPC-defizienten Zelllinien nicht verändert. Nach Behandlung mit CCCP zeigten die Zelllinien NPC1-A und NPC1-B im Vergleich zu den Kontrollzelllinien eine deutliche Reduktion der p62-Expression. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Die Expression von p62 war unter basalen Bedingungen (Abb. 14, DMSO) nicht verändert. Die Behandlung mit CCCP führte in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B zu einer Reduktion des p62-Levels (Abb. 14; CCCP). Die Translokation von p62 zu den Mitochondrien wurde durch Analyse der Kolo­kalisierung von p62 und Miro1 mit und ohne CCCP-Behandlung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

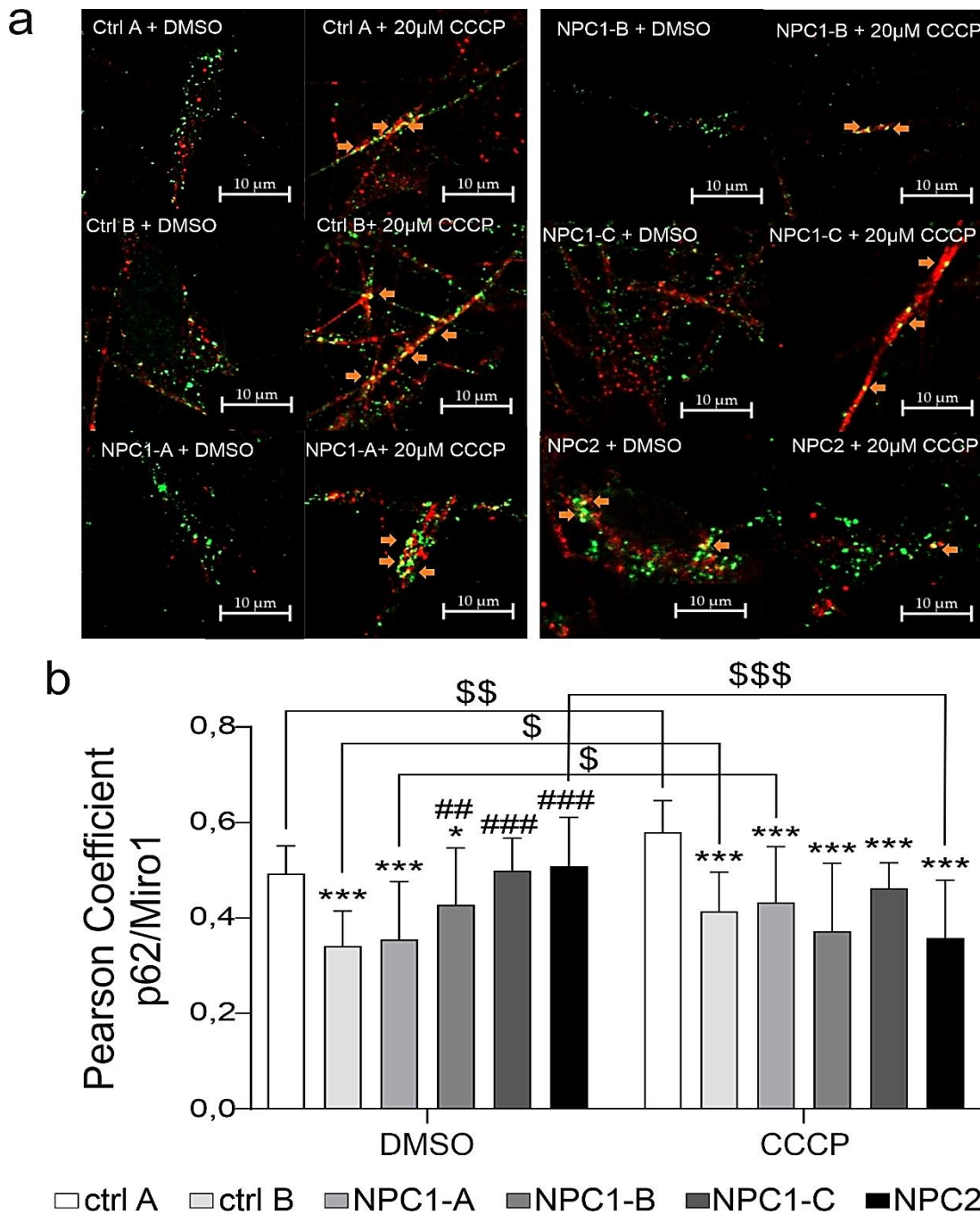


Abbildung 15 Analyse der Kolo­kalisierung von p62 und Miro1 nach Induktion der Mitophagie

a Repräsentative Bilder von Immunfluoreszenz-Färbungen von Miro1 (grün) und p62 (rot) mit und ohne CCCP-Behandlung. Die orangefarbene Pfeile heben Bereiche hervor in denen beide Fluoreszenzkanäle kolo­kalisieren. **b** Die Kolo­kalisierung von p62 und den

4 Ergebnisse

Mitochondrien war in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B unter basalen Bedingungen im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Im Vergleich zu Ctrl B zeigten die Zelllinien NPC1-B, NPC1-C und NPC2 eine erhöhte Kolokalisation von p62 und den Mitochondrien. Nach Induktion von mitochondrialen Schäden mit CCCP zeigten die Kontrollzelllinien und die Zelllinie NPC1-A einen Anstieg der Kolokalisation von p62 und Miro1. In der NPC2-Zelllinie war diese nach der Behandlung reduziert. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Die Kolokalisation von p62 und den Mitochondrien war unter basalen Bedingungen (Abbildung 15, DMSO) in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B im Vergleich zu Ctrl A reduziert. Im Vergleich zu Ctrl B zeigten die Zelllinien NPC1-B, NPC1-C und NPC2 eine erhöhte Kolokalisation von p62 und Miro1. Dabei zeigten auch die beiden Kontrollzelllinien ein signifikant verschiedenes Ergebnis. Nach Behandlung mit CCCP stieg die Kolokalisation von p62 und den Mitochondrien hingegen nur in der Kontrollzelllinie und geringfügig in der Zelllinie NPC1-A an (Abb. 15, CCCP).

Die Anzahl und Bildung neuer Autophagosomen wurden durch Analyse des Verhältnisses von LC3BII zu LC3BI mittels Expressionsanalysen der beiden Isoformen mit und ohne CCCP-Behandlung untersucht (Abb. 16). Darüber hinaus wurde die Aufnahme der Mitochondrien in Autophagosomen mittels Kolokalisationsanalysen der beiden Organellen untersucht. Auch hier wurde eine Schädigung der Mitochondrien durch Behandlung mit CCCP induziert (Abb. 17).

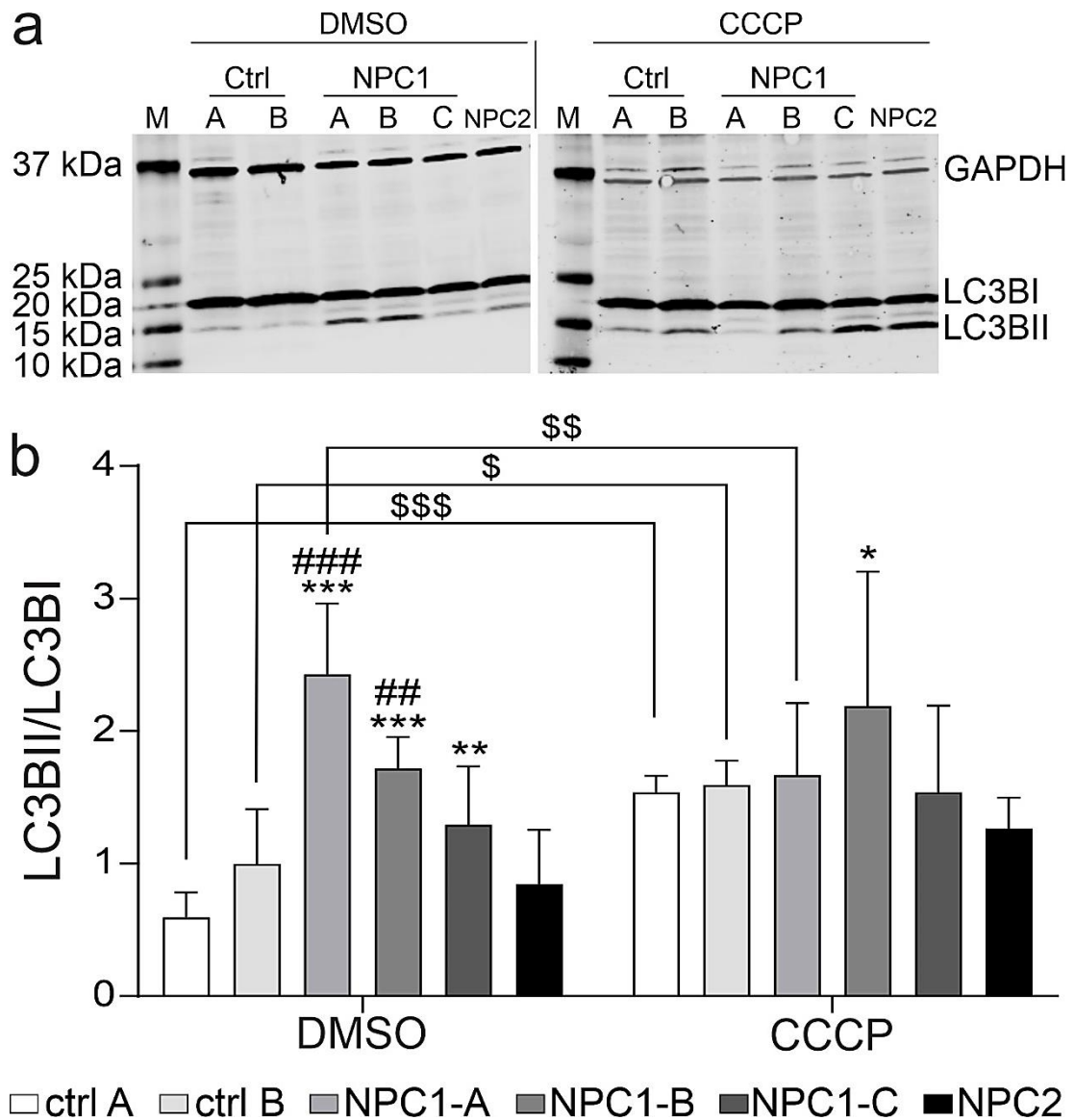


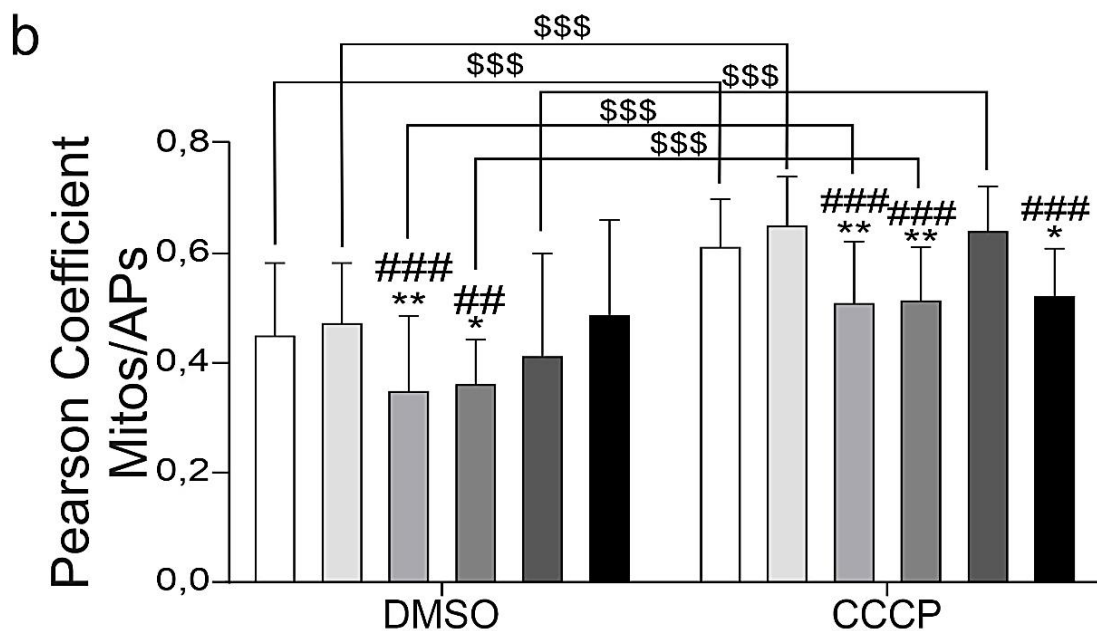
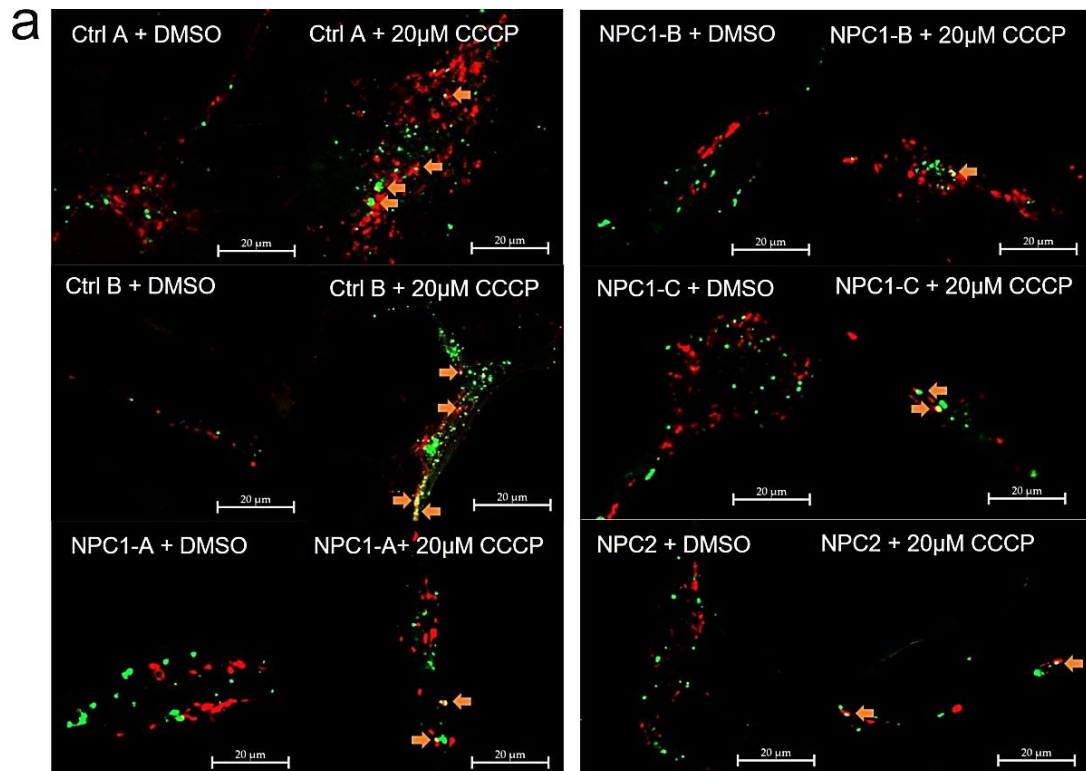
Abbildung 16 Analyse der Expression von LC3B während der Mitophagie

a Repräsentativer Western Blot der Expression von LC3BI und LC3BII mit und ohne CCCP-Behandlung. GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** In allen NPC1-defizienten Zelllinien war das LC3BII/LC3BI-Verhältnis unter basalen Bedingungen im Vergleich zu den beiden Kontrollzelllinien erhöht. Die CCCP-Behandlung bewirkte lediglich in den beiden Kontrollzelllinien einen Anstieg des Verhältnisses. In der Zelllinie NPC1-A war das Verhältnis nach der Behandlung reduziert. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass das Verhältnis von LC3BII/LC3BI, welches unter basalen Bedingungen in allen NPC-defizienten Zelllinien bereits signifikant erhöht war, nach Behandlung mit CCCP lediglich in den beiden Kontrollzelllinien gesteigert werden konnte. Die Aufnahme von Mitochondrien in Autophagosomen, während der Mitophagie wurde durch Kollisionsanalysen der beiden Organellen untersucht. Die Zellen wurden mit der BacMam 2.0 Technologie transduziert um die Organellen (LC3B-GFP

4 Ergebnisse

und RFP-Mitochondrien) sichtbar zu machen und anschließend mit CCCP behandelt.



□ ctrl A □ ctrl B ■ NPC1-A ■ NPC1-B ■ NPC1-C ■ NPC2

Abbildung 17 Analyse der Aufnahme von Mitochondrien in Autophagosomen
a Repräsentative Bilder der mit der BacMam 2.0 Technologie transduzierten Zellen, mit RFP-markierten Mitochondrien und GFP-markierten Autophagosomen mit und ohne CCCP-Behandlung. Die orangen Pfeile heben Bereiche hervor in denen beide Fluoreszenzkanäle kolokalisieren. **b** Die Kolokalisation von Mitochondrien und Autophagosomen war unter basalen Bedingungen in den Zelllinien NPC1-A und NPC1-B reduziert. Die Behandlung mit CCCP führte in allen Zelllinien mit Ausnahme

von der NPC2-Zelllinie zu einem Anstieg der Kolokalisation. Dieser Anstieg war in den Kontrollzelllinien deutlicher ausgeprägt. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Die Kolokalisation von Mitochondrien und Autophagosomen war in den NPC1-defizienten Zelllinien NPC1-A und NPC1-B unter basalen Bedingungen reduziert (Abb. 17, DMSO). Nach Behandlung mit CCCP stieg die Kolokalisation von Mitochondrien und Autophagosomen in allen Zelllinien, außer in der NPC2-Zelllinie, an. Dabei war der Anstieg in den NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den beiden Kontrollzelllinien deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 17, CCCP).

Nach der Aufnahme in die Autophagosomen und Fusion dieser mit Lysosomen werden die Mitochondrien degradiert. Dieser Abbau wurde durch Analyse der Expression von Miro1 nach Behandlung mit CCCP untersucht (Abb. 18), da Miro1 eines der Proteine in der OMM ist, welches, während der Mitophagie zunächst durch Parkin ubiquitiniert und anschließend von p62 erkannt wird.

4 Ergebnisse

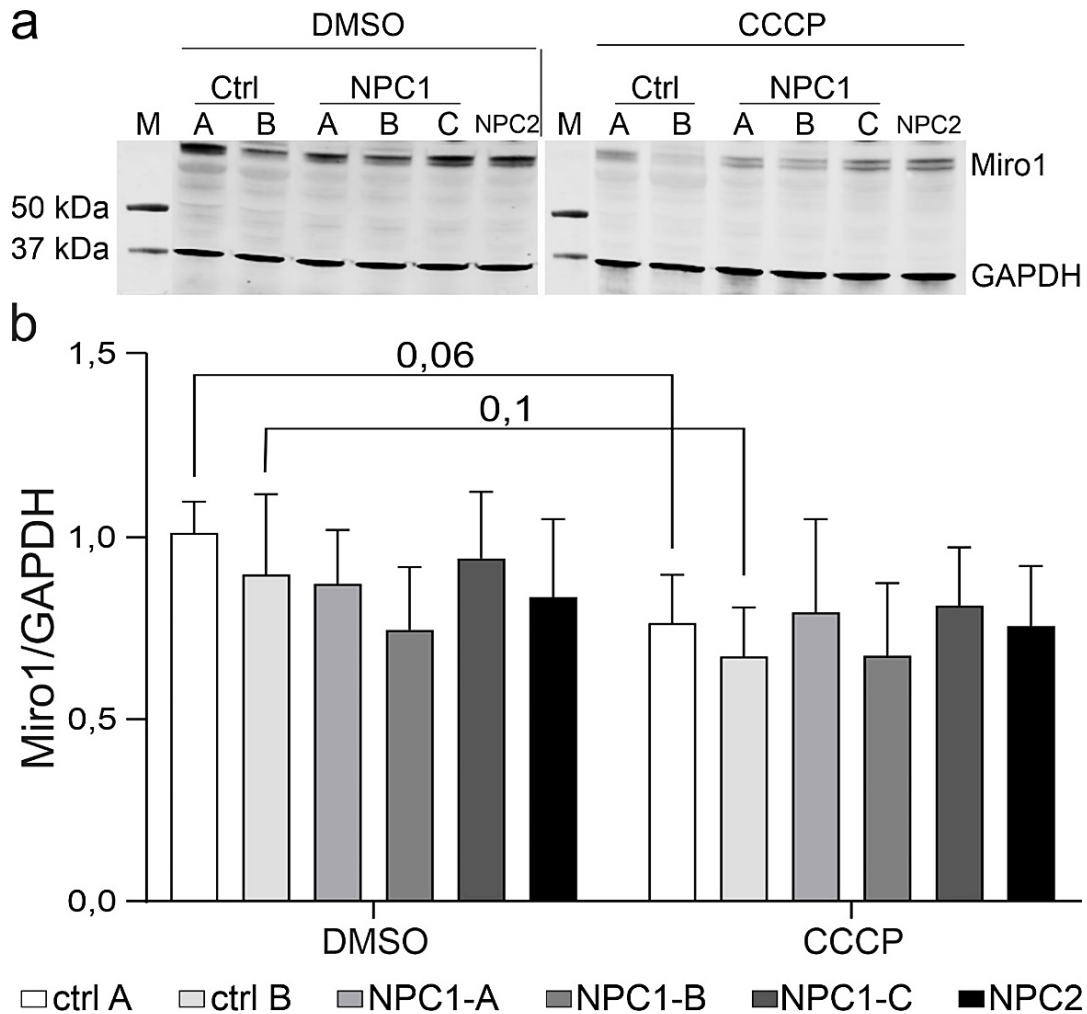


Abbildung 18 Analyse des Abbaus von Mitochondrien

a Repräsentativer Western Blot der Expression von Miro1 mit und ohne CCCP-Behandlung. GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Die Expression von Miro1 war unter basalen Bedingungen in den NPC-defizienten Zelllinien nicht verändert. Nach Behandlung mit CCCP war lediglich in den beiden Kontrollzelllinien eine Reduktion des Miro1-Levels zu erkennen. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass, im Vergleich zur DMSO-Behandlung, der Miro1-Level nach CCCP-Behandlung lediglich in den Kontrollzelllinien reduziert war.

Die offensichtlichen Probleme bei der Induktion der Mitophagie lassen weiterhin auch auf eine generelle Beeinträchtigung der Degradation von geschädigtem Material mittels Autophagie schließen. Daher wurden nachfolgend die Analyse dieses degradierenden Signalwegs durchgeführt.

4.5 Analyse der Autophagie

Die Analyse der Autophagie erfolgte anhand von Western Blot-Experimenten von p62 (Abb. 19), LC3B (Abb. 20) und ATG4B (Abb. 22) unter unterschiedlichen Bedingungen, sowie durch Analyse der Bildung von

Autolysosomen durch Fusion von Autophagosomen und Lysosomen anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen (Abb. 21). Um die Initiation der Autophagie zu untersuchen, wurde die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen mit Bafilomycin A1 (BafA1) für 6h blockiert, was zu einer Anreicherung von p62 und Autophagosomen (LC3BII/LC3BI) führen sollte. Zur Induktion des Prozesses der Autophagie wurden die Zellen wiederum für 6h in nährstoffarmem Medium (HBSS) kultiviert und ebenfalls die Expression von p62 und LC3B analysiert. Die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen unter basalen Bedingungen, als zentraler Schritt der Degradation, wurde mit Hilfe eines Tandem-Sensors evaluiert, bei dem LC3B sowohl mit RFP als auch mit GFP gekoppelt ist (Abb. 21a und 21b). Zuletzt wurde das Autophagie-regulierende Protein ATG4B untersucht (Abb. 22). ATG4B ist essentiell für die Umwandlung des zytosolischen LC3BI in LC3BII, welches in der Autophagosomenmembran verankert ist. Zudem ist ATG4B für das Recycling von LC3BII in LC3BI verantwortlich. Die Induktion der Autophagie durch die Simulation von Nährstoffmangel durch Kultivierung der Zellen in HBSS sollte also zu einem Anstieg des Proteinlevels von ATG4B führen.

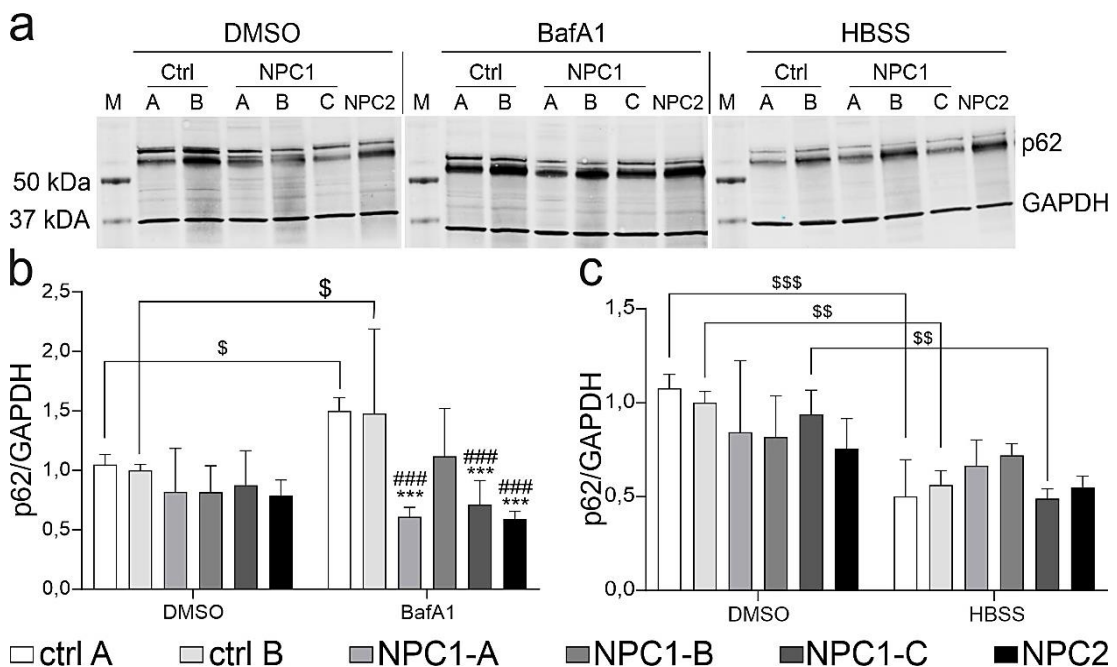


Abbildung 19 Analyse der Expression von p62 während der Autophagie

a Repräsentativer Western Blot der Expression von p62 unter basalen Bedingungen, nach Behandlung mit BafA1 und nach Kultivierung in nährstoffarmem Medium (HBSS). GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Unter basalen Bedingungen waren keine Unterschiede in der p62 Expression zu erkennen. Nach Behandlung mit BafA1 für 6h waren lediglich die beiden Kontrollzelllinien in der Lage die Expression zu steigern. **c** Die Kultivierung in nährstoffarmem Medium (HBSS) für 6h führte zu einer

4 Ergebnisse

Reduktion des p62 Levels in den beiden Kontrollzelllinien, sowie in der Zelllinie NPC1-C. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

In Abbildung 19b ist zu erkennen, dass die Expression von p62 nach Behandlung mit BafA1 lediglich in den beiden Kontrollzelllinien anstieg. Die Induktion der Autophagie durch Nährstoffmangel (HBSS, Abb. 19c) hingegen zeigte, dass p62 nur in den Kontrollzelllinien und der Zelllinie NPC1-C mittels Autophagie abgebaut werden konnte. In den beiden Kontrollzelllinien wurde dabei die Menge an p62 um 54 %, bzw. 44 % reduziert. Die Zelllinie NPC1-C baute 46 % an p62 ab. In den anderen drei NPC-defizienten Zelllinien war die Reduktion nicht signifikant und lag bei lediglich 22 % (NPC1-A), 13 % (NPC1-B) und 18 % (NPC2). Dies deutet darauf hin, dass in den Zelllinien NPC1-A, NPC1-B und NPC2 der Abbau mittels Autophagie weniger effektiv als in den Kontrollzelllinien zu sein scheint.

Unter den gleichen Bedingungen wurde die Bildung von Autophagosomen anhand des LC3BII/LC3BI-Verhältnisses bestimmt.

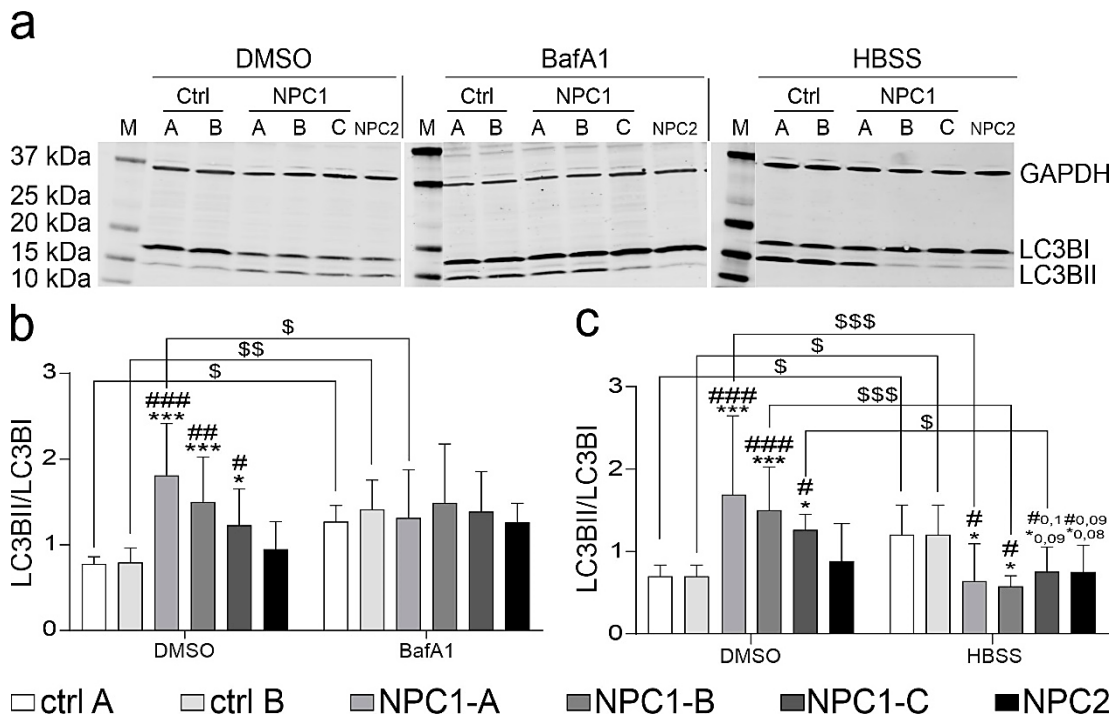


Abbildung 20 Analyse der Expression von LC3B während der Autophagie

a Repräsentativer Western Blot der Expression von LC3BI und LC3BII unter basalen Bedingungen, nach Behandlung mit BafA1 und nach Kultivierung in nährstoffarmem Medium (HBSS). GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Unter basalen Bedingungen war ein erhöhter LC3BII-Gehalt in den drei NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu beiden Kontrollen erkennbar. Nach Behandlung mit BafA1 für 6h waren lediglich die beiden Kontrollzelllinien in der Lage die Umwandlung von LC3BI zu LC3BII zu steigern. **c** Die Kultivierung in nährstoffarmem Medium führte zu einem

Anstieg des Verhältnisses von LC3BII/LC3BI in den beiden Kontrollzelllinien, wohingegen die NPC1- und die NPC2-defizienten Zellen eine Reduktion zeigten. Ctrl A = Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

In Abbildung 20 ist analog zu p62 das Ergebnis der Expressionsanalyse von LC3B sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach BafA1-Behandlung und nach Kultivierung in nährstoffarmem Medium dargestellt. Unter basalen Bedingungen (DMSO) ist eine deutlich erhöhte Menge an LC3BII in den drei NPC1-defizienten Zelllinien zu erkennen, was die Hypothese eines gestörten Abbaus dieser Vesikel und des darin aufgenommenen Materials unterstützt. Das Blockieren der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen mit BafA1 führte lediglich in den beiden Kontrollzelllinien zu einem Anstieg des LC3BII Levels und somit der Autophagosomen (Abb. 20b). Dies deutet darauf hin, dass die NPC1- und die NPC2-defiziente Zelllinien vermutlich schon das Maximum an Autophagosomen erreicht hatten und ihre Produktion nicht weiter gesteigert werden konnte. Unter nährstoffarmen Bedingungen (Abb. 20c) erhöhten die beiden Kontrollzelllinien die Umwandlung von LC3I zu LC3BII, um das Recycling von Proteinen und Lipiden zu erhöhen. In den NPC-defizienten Zelllinien hingegen war dies nicht zu sehen, was darauf hindeutet, dass scheinbar keine neuen Autophagosomen produziert wurden und lediglich die vorhandenen Vesikel langsam abgebaut werden konnten.

Während der Autophagie ist die Bildung von Autolysosomen durch Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen ein essentieller Schritt, um das in den Autophagosomen aufgenommene Material abzubauen. Dabei reguliert ATG4B sowohl die Bildung von LC3BI aus pro-LC3B als auch den Anteil an LC3BII in der Membran, was vermutlich zur Regulation der Fusion mit Lysosomen dient. Der Anteil an gebildeten Autolysosomen und die Expression von ATG4B sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

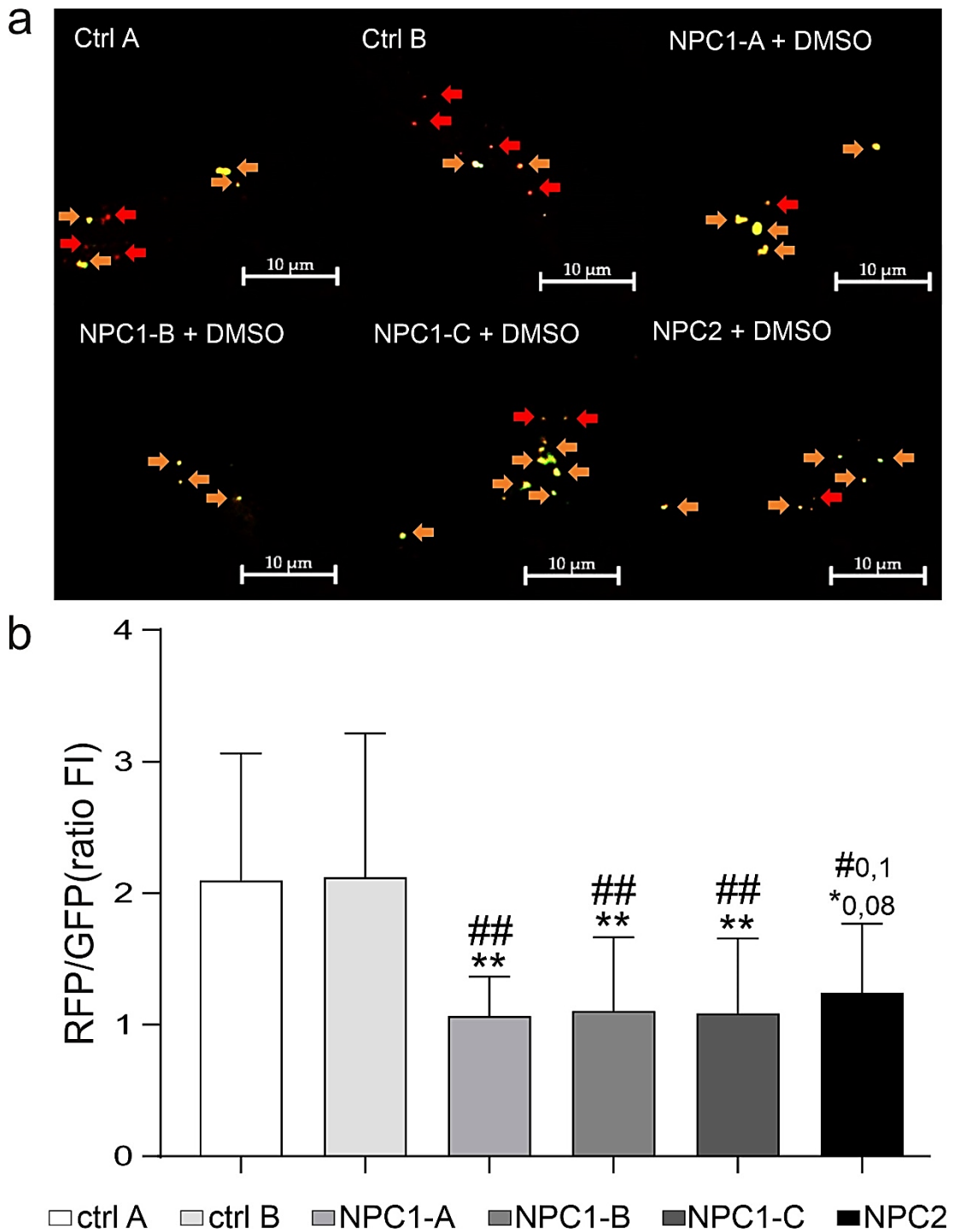


Abbildung 21 Analyse des Anteils gebildeter Autolysosomen

a Repräsentative Bilder der mit dem Tandem-Sensor RFP-GFP-LC3B transduzierten Zellen. Die orangenen Pfeile weisen auf RFP und GFP-positive Vesikel hin. Die roten Pfeile zeigen lediglich für RFP positive Vesikel. **b** Der Anteil an RFP-positiven Vesikeln war in allen NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu beiden Kontrollen signifikant reduziert. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Es ist zu erkennen, dass alle NPC-defizienten Zelllinien einen reduzierten Anteil an Autolysosomen (nur für RFP-positive Vesikel) im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien aufwiesen (Abb. 21), was vermutlich durch eine reduzierte

Fusion von Autophagosomen und Lysosomen zu erklären ist. Die Fusion der beiden Organellen wird vermutlich durch den LC3BII-Level in der Membran der Autophagosomen reguliert. Der LC3BII-Level wird durch die Peptidase ATG4B reguliert. Die Analyse der Expression von ATG4B ist in Abbildung 22 dargestellt.

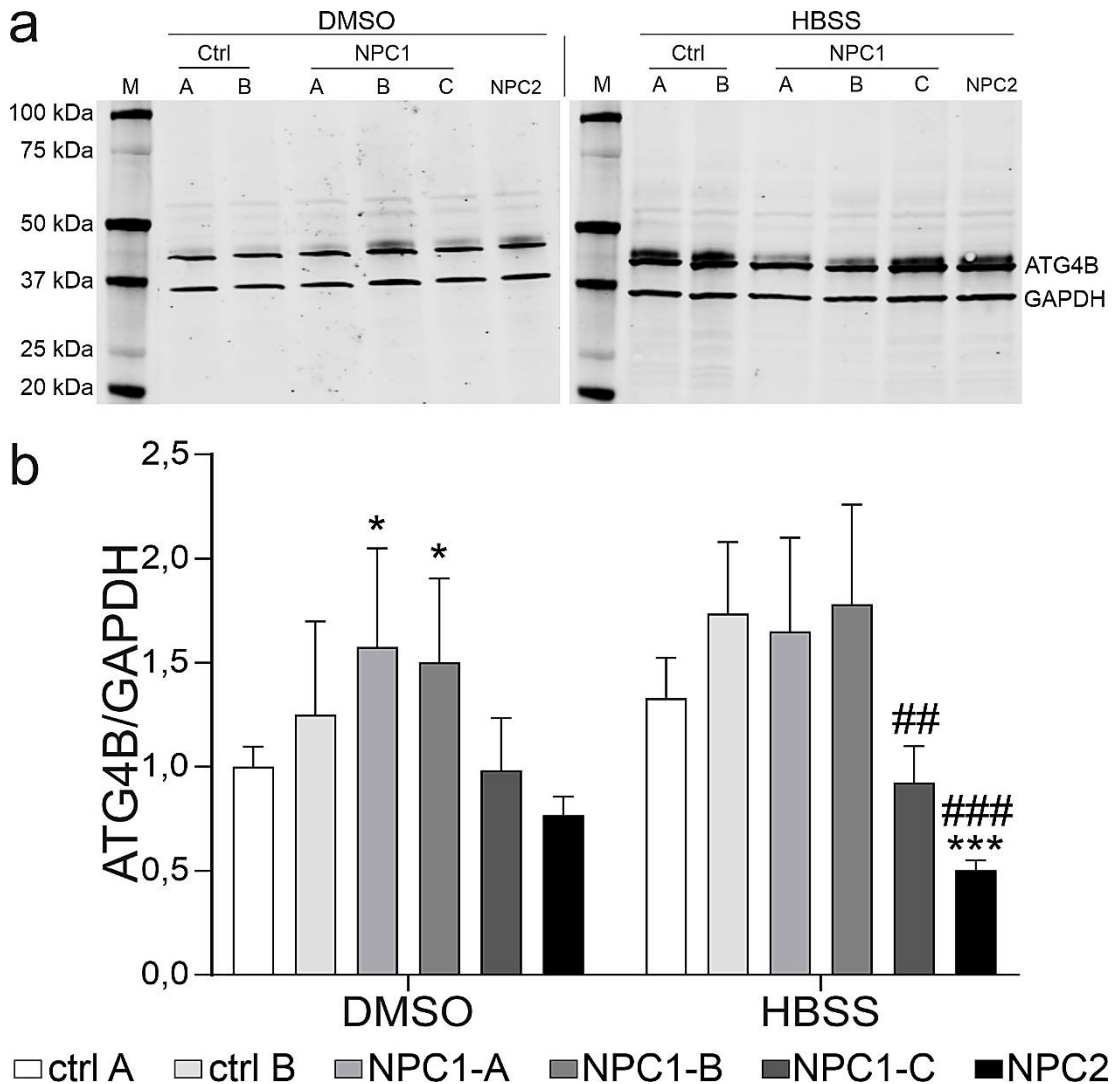


Abbildung 22 Analyse der ATG4B Expression

a Repräsentativer Western Blot der Expression von ATG4B unter basalen Bedingungen und nach Kultivierung in nährstoffarmem Medium (HBSS). GAPDH fungierte als interne Kontrolle. **b** Die Expression von ATG4B war unter basalen Bedingungen in zwei NPC1-defizienten Zelllinien erhöht. Die Induktion der Autophagie durch Nährstoffmangel (HBSS) führte zu einem Anstieg der ATG4B-Expression in beiden Kontrollzelllinien, auch wenn dieser nicht signifikant war. Die NPC-defizienten Zelllinien zeigten keine Veränderungen. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Die Expression der Peptidase ATG4B, welche für die Umwandlung von pro-LC3B in LC3BI und die De-Lipidierung von LC3BII vor der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen verantwortlich ist, war in den Zelllinien

4 Ergebnisse

NPC1-A und NPC1-B unter basalen Bedingungen (Abb. 22, DMSO) geringfügig, jedoch nur im Vergleich zu Ctrl A signifikant, erhöht. Nährstoffmangel (HBSS) führte zu einem geringfügigen, allerdings nicht signifikanten Anstieg, in den beiden Kontrollzelllinien, wohingegen die NPC-defizienten Zelllinien keine Veränderung des ATG4B Levels zeigten.

4.6 Analyse des Transports von Lysosomen und Autophagosomen

Die in Abschnitt 4.3 beschriebenen Probleme des Transports von Mitochondrien lassen weiterhin auf generelle Probleme bei Transportprozessen von Organellen schließen. Da während der Autophagie und Mitophagie sowohl der Transport von Autophagosomen zurück zum Soma als auch die präzise Positionierung von Lysosomen essentiell für deren Fusion und die Degradation des aufgenommenen Materials ist, wurde zusätzlich die Kinetik des Transports dieser beiden Organellen untersucht. Dazu wurden analog zu den Mitochondrien 11 verschiedene Parameter evaluiert.

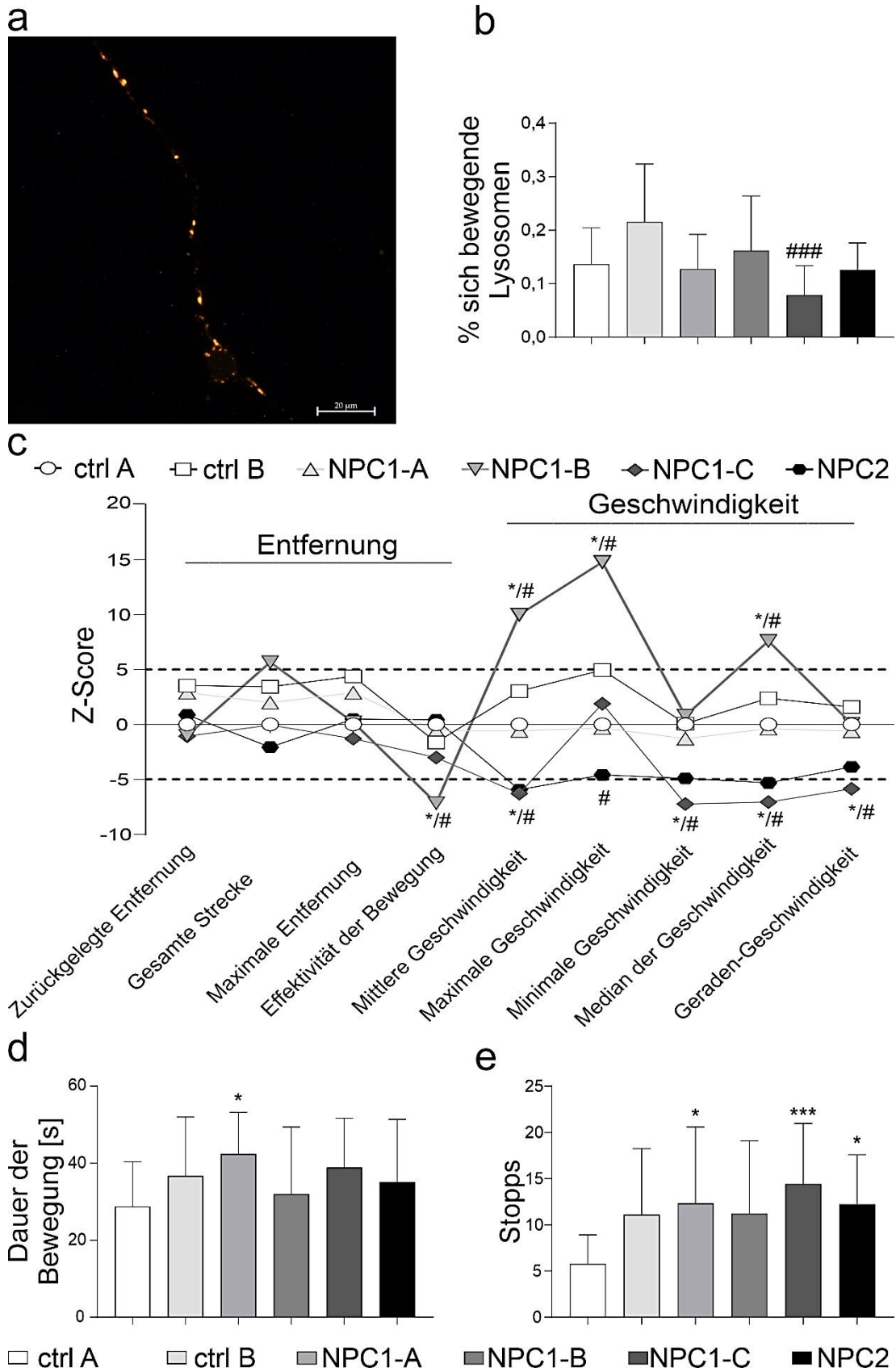


Abbildung 23 Analyse des Transports der Lysosomen

a) Repräsentatives Bild einer mit BacMam 2.0 für Lysosomen transduzierten Zelle. **b)** Der Anteil, der sich bewegenden Lysosomen war lediglich in der Zelllinie NPC1-C im Vergleich zu Ctrl B signifikant reduziert. **c)** Der Z-Score für 9 verschiedene kinetische Parameter wurde anhand von Formel 5 berechnet. Für die Zelllinie NPC1-B war eine

4 Ergebnisse

erhöhte Geschwindigkeit (mittlere Geschwindigkeit, maximale Geschwindigkeit und Median der Geschwindigkeiten), jedoch auch eine reduzierte Effektivität der Bewegung, zu erkennen. Die Zelllinien NPC1-C und NPC2 zeigten im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien eine Reduktion der mittleren und minimalen Geschwindigkeit, sowie des Medians der Geschwindigkeit und der Geraden-Geschwindigkeit. Die Maximale Geschwindigkeit war nur in der Zelllinie NPC2 signifikant im Vergleich zu Ctrl A reduziert. **d)** Die Dauer der Bewegung war lediglich in der Zelllinie NPC1-A signifikant im Vergleich zu Ctrl A erhöht. **e)** Die Berechnung der Stopps erfolgte wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben. Die Anzahl der Stopps war in allen NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Ctrl A erhöht. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Der Anteil, der sich bewegenden Lysosomen war in der Zelllinie NPC1-C signifikant im Vergleich zu Ctrl B reduziert (Abb. 19b). Die Analyse der Kinetik zeigte in der Zelllinie NPC1-B eine signifikant reduzierte Effektivität der Bewegung (Confinement Ratio) der Lysosomen im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien (Abb. 19c). Die Geschwindigkeitsparameter hingegen zeigten ein sehr heterogenes Ergebnis. So wies die Zelllinie NPC1-A keine Unterschiede auf, wohingegen NPC1-B eine deutlich erhöhte Durchschnittsgeschwindigkeit und Median der Geschwindigkeit, sowie Maximale Geschwindigkeit zeigte. Die Zelllinien NPC1-C und NPC2 hingegen wiesen in vier der analysierten Geschwindigkeitsparameter eine signifikante Reduktion auf. Die Dauer der Bewegung (Abb. 19d) war lediglich in Zelllinie NPC1-A im Vergleich zu Ctrl A erhöht. Die Anzahl der Stopps (Abb. 19e) war in allen NPC-defizienten Zelllinien im Vergleich zu Ctrl A erhöht, wobei auch hier die beiden Kontrollzelllinien signifikant verschieden waren.

Autophagosomen müssen, nach der Aufnahme von zu degradierendem Material, retrograd transportiert werden, um in der Nähe des Zellkerns mit Lysosomen zu fusionieren. Um dies zu untersuchen, wurde die Kinetik der Autophagosomen analog zu den Mitochondrien und Lysosomen analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 20 dargestellt.

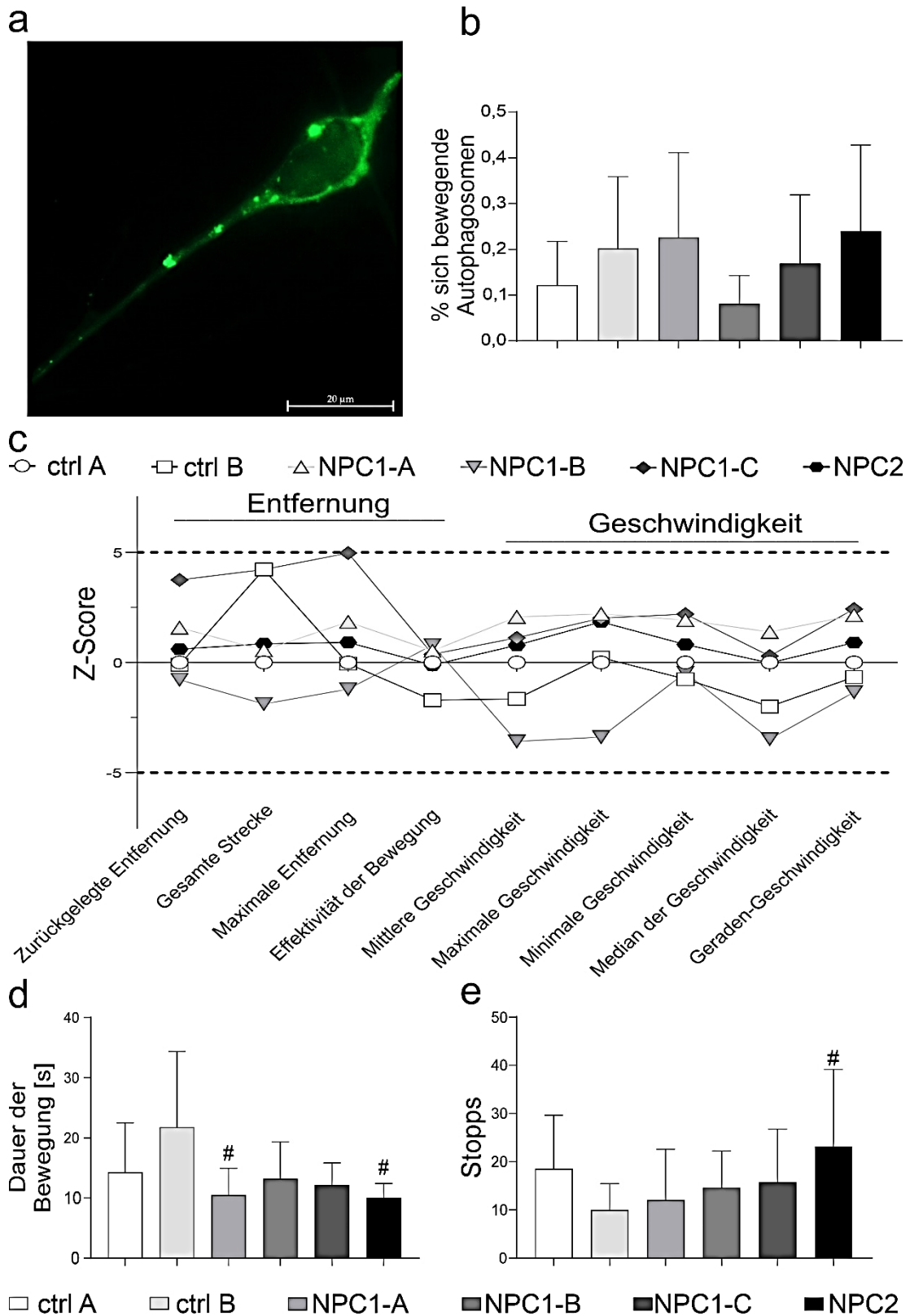


Abbildung 24 Analyse des Transports von Autophagosomen

a) Repräsentatives Bild einer mit BacMam 2.0 für Autophagosomen transduzierten Zelle. **b)** Der Anteil, der sich bewegenden Autophagosomen war im Vergleich zu Ctrl A in allen anderen Zelllinien, so auch der Ctrl B erhöht. Im Vergleich mit Ctrl B zeigte die Zelllinie NPC1-B einen reduzierten Anteil der sich bewegenden Autophagosomen. **c)** Der Z-Score für 9 verschiedene kinetische Parameter wurde anhand von Formel 5 berechnet und zeigte keine Unterschiede zwischen den NPC-defizienten Zelllinien und den beiden Kontrollzelllinien. **d)** Die Dauer der Bewegung war in den Zelllinien

4 Ergebnisse

NPC1-A und der NPC2-defizienten Zelllinie im Vergleich zu Ctrl B reduziert. e) Die Berechnung der Stopps erfolgte wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben. Die Anzahl der Stopps war in der NPC2-defizienten Zelllinie im Vergleich zu Ctrl B signifikant erhöht. Ctrl A= Kontrolle A und Ctrl B = Kontrolle B.

Der Anteil, der sich bewegenden Autophagosomen zeigte große Unterschiede zwischen den beiden Kontrollzelllinien, sowie zu den NPC-defizienten Zelllinien, sodass kein genereller Trend erkennbar war. Die Analyse der Transportkinetik zeigte darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede der NPC-defizienten Zelllinien zu den beiden Kontrollzelllinien, was darauf schließen lässt, dass hier keine Störungen vorliegen.

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den hier untersuchten neural differenzierten iPSCs die Mitochondrien zwar generell kleiner waren, ihre Funktion jedoch nicht beeinflusst war. Dennoch zeigten sie eine deutlich reduzierte Transportgeschwindigkeit. Die Analyse der Mitophagie nach Schädigung der Mitochondrien mit CCCP zeigte, dass die NPC-defizienten Zelllinien deutlich schlechter auf diese Induktion von Stress reagieren können. Sowohl die Expression als auch Translokation von Parkin und p62 zu den Mitochondrien und schlussendlich deren Aufnahme in die Autophagosomen war gestört.

Die Analyse der Autophagie bestätigt diese Ergebnisse, da generell das Markieren von abzubauenem Material durch p62 inhibiert zu sein scheint. Darüber hinaus ist die Anzahl an Autophagosomen in den NPC-defizienten Zellen bereits unter basalen Bedingungen so hoch, dass keine neuen Vesikel als Reaktion auf Stress, wie z.B. mitochondriale Schäden, gebildet werden können. Zusätzlich ist der generelle Abbau von in Autophagosomen aufgenommenen Materials gestört, was durch die reduzierte Fusion mit Lysosomen zu erklären sein könnte. Vermutlich wird dies durch das Verhältnis von LC3BII zu LC3BI reguliert, was wiederum durch ATG4B beeinflusst wird. Die Expression von ATG4B ist in zwei der NPC1-defizienten Zelllinien leicht erhöht.

Zwei der NPC1-defizienten Zelllinien zeigen, analog zu den Mitochondrien, eine reduzierte Geschwindigkeit der Lysosomen, wohingegen eine dritte

Zelllinie eine reduzierte Effektivität der Bewegung bei erhöhter Geschwindigkeit der Lysosomen aufweist. Die Autophagosomen hingegen scheinen, trotz Unterschieden im sich bewegenden Anteil, normal transportiert zu werden.

5 Diskussion

5.1 Morphologie und Funktion von Mitochondrien

Teilung und Fusion von Mitochondrien bei NP-C

Die Morphologie von Zellorganellen, speziell ihre Sphärizität und Größe, liefert häufig einen ersten Hinweis auf deren Viabilität und Funktion. Eine Verkleinerung der Fläche und eine rundere Form von Mitochondrien gehen dabei häufig mit einer schlechteren Viabilität und reduzierter Funktion einher und führen zur Induktion der Apoptose in der Zelle (Picard et al., 2013). Die Analyse der Morphologie der Mitochondrien in NPC1- und NPC2-defizienten Zelllinien und den beiden Kontrollzelllinien zeigt, dass im Vergleich zu Ctrl A die Mitochondrien kleiner, wenn auch von der Form her unverändert sind. Im Vergleich zu Ctrl B sind die Unterschiede deutlich geringer (Abb. 7). Kleinere Mitochondrien weisen dabei generell auf ein Ungleichgewicht zwischen Fusion und Fragmentierung (engl. fusion and fission) hin, wobei die Teilung überwiegt. Diese wird durch das Dynamin-ähnliche Protein 1 (Drp1), eine GTPase, und dessen post-translationale Modifikation reguliert (Elgass et al., 2013). Für den Morbus Alzheimer (AD) ist eine durch β -Amyloid induzierte S-Nitrosylierung (S-NO) von Drp1 beschrieben welche zu dessen Hyperaktivität und einer erhöhten Teilung der Mitochondrien führt (Nakamura et al., 2010). In unterschiedlichen Modellen für NP-C1 ist sowohl ein erhöhter Anteil an β -Amyloid (Malnar et al., 2012) als auch Stickstoffmonoxid (NO) (Kim et al., 2008) und eine erhöhte Nitrosylierung bestimmter Proteine (Jürs et al., 2020) beschrieben, welche zu einer Hyperaktivität von Drp1 und generell kleineren Mitochondrien führen kann. Die Aktivität von Drp1 wird weiterhin durch den Ca^{2+} -Level in der Zelle beeinflusst. Dabei wird Drp1 durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase 1 (CamK1) phosphoryliert, was die Interaktion mit dem mitochondrialen Teilungsprotein 1 (engl. mitochondrial fission protein1; FIS1) und die Fragmentierung von Mitochondrien erhöht (Sheng & Cai, 2012). Eine andere Möglichkeit der Regulation ist der proteasomale Abbau von Drp1. Zuvor wird Drp1 dabei durch Parkin ubiquitiniert. Für den Morbus Parkinson (PD) ist eine erhöhte Fragmentierung von Mitochondrien auf Grund der reduzierten Aktivität von Parkin und einem daraus resultierenden reduziertem Abbau von Drp1 bekannt (Wang et al., 2011), was wiederum die Verbindung zum Prozess der Mitophagie und die

Qualitätskontrolle von Mitochondrien bildet. Ähnliches ist bereits für Mitochondrien in einem NPC1-Modell von iPSZs bekannt, bei dem die erhöhte Fragmentierung durch eine defekte Mitophagie auf Grund lysosomaler Dysfunktion erklärt wird (Davis et al., 2021). Darüber hinaus beeinflusst eine durch Caspase-3 geschnittene Form von Tau die Expression von Opa1 (engl. Dynamin-like 120 kDa protein), eines anderen für die Regulation der Fusion von Mitochondrien wichtigen Proteins, was zu einer erhöhten Fragmentierung der Mitochondrien bei AD führt (Pérez et al., 2018). Da auch NP-C1 zu den Tauopathien gehört (Pacheco et al., 2009), könnte also der Einfluss von Tau auf Opa1 die reduzierte Größe der Mitochondrien erklären.

Einfluss von Cholesterol auf die Morphologie und Funktion von Mitochondrien

Ein anderer Erklärungsansatz für eine veränderte Morphologie der Mitochondrien involviert die gestörte Cholesterolhomöostase bei NP-C und das metastatische Lymphknoten Protein 64 (engl. metastatic lymph node 64 protein, MLN64), welches unabhängig von NPC1 speziell für den Cholesteroltransport von den LE/LY zu den Mitochondrien verantwortlich ist (Charman et al., 2010). In der Studie von Balboa et al., aus dem Jahr 2017, wurde in Überexpressionssystemen von MLN64 in Hepatozyten und CHO-Zellen und in NPC1-defizienten Fibroblasten von Mäusen eine erhöhte Fragmentierung und Sphärizität der Mitochondrien auf Grund eines erhöhten Cholesterolgehalts in den Mitochondrien nachgewiesen. Dies wirkte sich weiterhin auf die Funktion der Mitochondrien aus, was sich durch einen reduzierten Glutathion-Level, eine verminderte ATPase-Aktivität und eine Verringerung des Membranpotentials, sowie einem erhöhten Anteil an mitochondrialen Superoxiden zeigte (Balboa et al., 2017). Im Gegensatz dazu wurde in Fibroblasten von NPC1-Patienten zwar ebenfalls ein erhöhter Cholesterolgehalt in den Mitochondrien und eine reduzierte ATP-Produktion beschrieben, jedoch war das MMP unverändert und die NPC1-defizienten Zellen zeigte sogar eine Reduktion des ROS-Levels. Die Analyse der Morphologie in diesem Zellsystem zeigte darüber hinaus eine erhöhte Clusterbildung von Mitochondrien in distalen Bereichen der Zellen, was eher auf eine erhöhte Biogenese und Fusion von Mitochondrien hindeutet (Woś et al., 2016). Für AD (Hauptmann et al., 2009) und PD (Amo et al., 2011) ist

hingegen ein reduziertes MMP, einhergehend mit einer reduzierten ATP-Produktion, beschrieben.

Funktion von Mitochondrien in NPC-defizienten Zellen

Die hier präsentierten Ergebnisse der Analyse der mitochondrialen Funktion unterscheiden sich hinsichtlich einiger Parameter mit denen der oben beschriebenen Studien. So ist das MMP nicht verändert (Abb. 9a und 9b) und die ATP-Produktion sogar in zwei NPC1-defizienten Zelllinien erhöht (Abb. 9c). Auch die Expression von Miro1 und Miro2 (Abb. 10), sowie Hsp60 (Abb. 8c) deuten nicht auf schwerwiegende funktionale Defekte der Mitochondrien in den neural differenzierten iPSZs hin. Vergleichbar mit den Ergebnisse in Fibroblasten in der Studie von Woś et al., (Woś et al., 2016), ist jedoch in zwei der NPC1-defizienten Zelllinien die Anzahl der Mitochondrien, bzw. die mitochondriale Masse erhöht. Der Grund dafür könnte an einem reduzierten Abbau defekter Mitochondrien liegen, was mit der reduzierten Größe durch eine erhöhte Fragmentierung korreliert. Dagegen spricht, dass das unveränderte MMP nicht auf einen erhöhten Anteil defekter Organellen hinweist. Andererseits ist auch eine Induktion der Biogenese von Mitochondrien als Reaktion der Zelle auf Stress oder reduzierte Funktion der Mitochondrien denkbar.

Dagegen spricht, dass die Expression des mitochondrialen Hitzeschockproteins 60 (Hsp60) nicht verändert ist, was jedoch nur eine geringe Aussage über die Funktionalität des Proteins erlaubt. Hsp60 fungiert als Chaperon während der Faltung von Proteinen vor allem in den Mitochondrien (Magen et al., 2008). Aufgrund dessen könnte eine veränderte Expression ein erstes Indiz für mitochondrialen Stress und Funktionsdefizite liefern. Mutationen im *Hspd1*-Gen, welches Hsp60 codiert, korrelieren z.B. mit morphologischen Veränderungen von Mitochondrien, Problemen bei der ATP-Synthese, sowie einer reduzierte Expression und Funktion des Komplex 3 der Atmungskette (Magnoni et al., 2013). Für NP-C1 ist neben der veränderten Morphologie auch eine erhöhte Expression von Komplex 3 beschrieben (Woś et al., 2016), was auf Defekte in der Funktion von Hsp60 hindeuten könnte. Die erhöhte Expression von Komplex 3 könnte weiterhin auf eine mögliche Aktivitätssteigerung der Atmungskette hindeuten und so die erhöhte ATP-

Produktion erklären (Abb. 9c). Berücksichtigt werden muss bei dem Vergleich der Ergebnisse jedoch der generell deutlich höhere Energiebedarf von neuronalen Zellen im Vergleich zu den von Wos et al. verwendeten Fibroblasten. Im Falle von Defekten im Energiestoffwechsel hätte dies bei neuronalen Zellen deutlich schwerwiegendere Konsequenzen. Hsp60 ist darüber hinaus in die mitochondriale Qualitätskontrolle involviert. Dabei sind neben Proteinen der Mitophagie wie PINK1 und Parkin auch DJ-1/PARK7 (engl. Protein Deglycase DJ-1), einem redox-sensitiven Chaperon, welches neuronale Zellen vor durch oxidativen Stress induziertem Zelltod schützt, als Interaktionspartner von Hsp60 beschrieben (Jin et al., 2007). Eine weitere Verbindung von Hsp60 zu Pathophysiologie von NP-C ist die Myelinisierung von Neuronen. So wird im Falle der hereditären/familiären spastischen Spinalparalyse (engl. hereditary spastic paraplegia) ein Hsp60-Defekt mit einer reduzierten Myelinisierung der Neurone in Verbindung gebracht (Molecular Chaperone Disorders: Defective Hsp60 in Neurodegeneration). Da auch für NPC1 eine reduzierte Myelinisierung von Neuronen beschrieben ist (Yu & Lieberman, 2013), könnte Hsp60 also neben den mitochondrialen Defekten auch als Erklärungsansatz die für diesen Phänotyp fungieren. Dabei muss berücksichtigt werden, dass hier lediglich die Expression von Hsp60 untersucht wurde und so potentielle Defekte in der Funktion lediglich anhand anderer pathophysiologischer Merkmale, in die Hsp60 involviert ist, bewertet werden können.

Einfluss von Miro1 und Miro2 auf Morphologie und Funktion von Mitochondrien

Die Expression von Miro1 und Miro2 ist in einzelnen Zelllinien geringfügig verändert, sodass ein Effekt auf Downstream-Prozesse nicht auszuschließen ist. Beide Proteine sind in eine Vielzahl von Prozessen involviert. Die Zelllinie NPC1-B zeigt dabei eine leicht reduzierte Expression von Miro1, wohingegen die Expression von Miro2 signifikant erhöht ist. Es ist beschrieben, dass Miro1 und Miro2 einen Einfluss auf die Aggregation aber auch auf die Fragmentierung der Mitochondrien hat (Weihofen et al., 2009), was die kleineren Mitochondrien in den NPC-defizienten Zellen erklären würde. Die Arbeitsgruppe um Saotome et al. vermutet dabei einen kompetitiven Effekt von Miro1 und dem Dynamin-1-ähnlichen Protein (engl. dynamin-related protein 1, Drp1). Dies hätte im Falle einer reduzierten Miro1 Expression eine erhöhte

5 Diskussion

Fragmentierung zur Folge (Saotome et al., 2008). Miro2 hingegen induziert die Fusion von Mitochondrien durch Interaktion mit Mitofusin 2 (Mfn2) (Misko et al., 2010). Eine erhöhte Expression könnte hier also auf einen kompensatorischen Mechanismus auf Grund der erhöhten Fragmentierung der Mitochondrien hindeuten. In einem Knockdown-Modell von Miro2 ist darüber hinaus eine extreme Fragmentierung, ein reduziertes MMP und ein erhöhtes Vorkommen von ROS beschrieben, was den Einfluss von Miro2 auf die Morphologie und die Funktion unterstützt (Woo et al., 2021).

Die Aktivität von Miro1 und Miro2 wird dabei unter anderem durch die Bindung von Ca^{2+} reguliert. Dies führt zu einer Änderung der Konformation und weiterhin der Aktivität und beeinflusst die Interaktion mit anderen Proteinen (Nemani et al., 2018). Für NP-C1 ist in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression der GluA2-Untereinheit von AMPA-Rezeptoren in den hier verwendeten neural differenzierten iPSCs beschrieben, welche zur Reduktion der Ca^{2+} -Permeabilität der Rezeptoren führt und einen reduzierten Ca^{2+} -Einstrom zur Folge hat (Rabenstein et al., 2017). Die gestörte Ca^{2+} -Homöostase könnte also über Miro1 und Miro2 einen Einfluss auf die Morphologie und Funktion von Mitochondrien haben.

5.2 Transport von Mitochondrien

Miro1 und Miro2 als Regulatoren des mitochondrialen Transports

Neben dem Effekt auf die Morphologie und die Funktion von Mitochondrien sind Miro1 und Miro2 auch in den Transport der Mitochondrien involviert und sind diesbezüglich Inhalt einer Vielzahl von Studien (López-Doménech et al., 2016; Panchal & Tiwari, 2021). Eine reduzierte Aktivität von Miro1 führt z.B. zu einer Aggregation von Mitochondrien in der Nähe des Zellkerns, was auf eine Funktion von Miro1 im Transport und der Lokalisation von Mitochondrien hindeutet (Fransson et al., 2003). Was die Kinetik des Transports von Organellen bei NP-C angeht ist wenig bekannt, weshalb die durchgeführte Untersuchung des Transports der Mitochondrien neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie von NP-C liefern. Die evaluierten Parameter in Bezug auf die Transportgeschwindigkeit der Mitochondrien waren in nahezu allen NPC-defizienten Zelllinien reduziert, auch wenn die einzelnen Zelllinien geringfügig Unterschiede in der Ausprägung der Defekte aufwiesen (Abb. 11c). Die

zurückgelegte Strecke zeigte hingegen keine Veränderung, was zu einer erhöhten Dauer der Bewegung führte (Abb. 11d). Die Anzahl der Stopps war darüber hinaus in den drei NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien erhöht. Generell ist für viele neurodegenerative Erkrankungen ein defekter Transport von Organellen beschrieben, dabei variiert jedoch die Ausprägung des Phänotyps. So ist für AD ein reduzierter Anteil sich anterograd bewegendender Mitochondrien beschrieben, wohingegen die Geschwindigkeit nicht beeinflusst ist (Calkins & Reddy, 2011). Bei ALS hingegen ist für Mitochondrien und Lysosomen eine reduzierte Geschwindigkeit und zurückgelegte Strecke in distalen Bereichen von Axonen beschrieben (Naumann et al., 2018).

Neben der oben bereits beschriebenen Funktion von Miro1 und Miro2 sind dabei weitere Proteine und Signalwege involviert. Miro bindet über die beiden Adapterproteine TRAK 1 und 2 (engl. Trafficking kinesin-binding protein 1) an die Motorproteine Dynein und Kinesin und bilden einen sogenannten Motor-Adapter-Komplex, welcher den retrograden und anterograden Transport der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli reguliert (Glater et al., 2006). Auch diese Prozesse werden durch die Bindung von Ca^{2+} an Miro beeinflusst. In Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentrationen bindet der Motor-Adapter-Komplex an die Mitochondrien durch Konformationsänderung von Miro und reguliert so den Transport (Lee & Lu, 2014). Der reduzierte Ca^{2+} -Einstrom in NPC1-defizienten Zellen (Rabenstein et al., 2017) hätte dementsprechend über Miro1 einen direkten regulatorischen Effekt auf den Transport der Mitochondrien. Darüber hinaus wird der Transport der Mitochondrien über ihre Funktion reguliert. So akkumulieren Mitochondrien z.B. in Bereichen in denen ihre Funktion als Ca^{2+} -Puffer/Regulatoren, wie den Synapsen, notwendig ist (Cai & Sheng, 2009; Lee et al., 2016).

Einfluss des Zytoskeletts und Tau auf den mitochondrialen Transport

Besonders in den Synapsen erfolgt der Transport neben den Mikrotubuli entlang von Aktinfilamenten mit Hilfe von Myosin. Dabei führt die Bindung der Mitochondrien an Aktin über Myosin, sowohl in den Synapsen, als auch in Axonen, zu einer Reduktion der Transporteffektivität, was als Ankermechanismus für Mitochondrien in bestimmten Bereichen diskutiert wird

5 Diskussion

(Chada & Hollenbeck, 2004; Morris & Hollenbeck, 1995). Für AD und PD ist eine erhöhte Stabilität des Aktin-Zytoskeletts beschrieben, was zu einer Erhöhung der physischen Blockaden während des Transports von Organellen führt (Venkatesh et al., 2020). Einen ähnlichen Effekt beschreiben Perrot und Julien für die leichte Kette der Neurofilamente (NF-L). Sie vermuten, dass NF-L ebenfalls als physischer Kontrollmechanismus für den Transport von Organellen fungiert (Perrot & Julien, 2009). Dies ist ebenfalls für den Morbus Charcot-Marie-Tooth bekannt, bei dem Mutationen im Gen für NF-L zu erhöhten Transportraten und kürzeren Mitochondrien führt, was auf Defekten in der Fusion dieser beruht (Gentil et al., 2012). Ähnliche Effekte sind für Vimentin, einem weiteren Intermediärfilament, beschrieben. Hierbei führt Knockout von Vimentin zu einem deutlich gesteigerten Transport von Mitochondrien (Nekrasova et al., 2011). Analog zu NF-L wird eine direkte Bindung der Mitochondrien an Vimentin postuliert, wodurch der Transport von Mitochondrien zusätzlich kontrolliert werden könnte. Die beschriebenen Defekte in der Organisation des Vimentin-Zytoskeletts bei NP-C1 (Peter et al., 2017) könnten also den reduzierten Transport der Mitochondrien erklären.

Einen weiteren regulatorischen Faktor auf die Fusion und Teilung von Mitochondrien stellt Tau dar (Pacheco et al., 2009). Tau beeinflusst die Lokalisation der Mitochondrien und führt zu einer reduzierten Anzahl sich bewegendender Mitochondrien und einer Akkumulation im Soma, hat jedoch keinen Einfluss auf ihre Geschwindigkeit. Dies geht mit einer reduzierten ATP-Produktion, reduziertem MMP und oxidativen Stress einher. Der Grund dafür scheint eine erhöhte Bindung von TRAK2 an die Mitochondrien zu sein, wohingegen Miro1 und 2, sowie Dynein und Kinesin keine Veränderungen zeigten (Quintanilla et al., 2020). Bestätigt wird dies durch Studien in NB2a/d1 Zellen bei denen durch die Überexpression von Tau selektiv der anterograde Transport inhibiert wurde und Mitochondrien im Soma akkumulierten, was zur Degeneration der Zellen führte (Dubey et al., 2008). Ähnliches ist für Defekte in der Funktion von Miro1 beschrieben, was speziell in den Dendriten zu einer fehlerhaften Verteilung der Mitochondrien und zur Neurodegeneration führt (López-Doménech et al., 2016).

Defekte im retrograden Transport hingegen haben einen Einfluss auf das Recycling geschädigter Mitochondrien, was die Gefahr der Bildung von ROS erhöht und auf Grund der nur geringen *de novo* Synthese von Mitochondrien auch den Energiehaushalt beeinflusst.

5.3 Defekte in Mitophagie und Autophagie

Einfluss von Parkin auf die Defekte der Mitophagie bei NP-C

Neben der Morphologie, der Funktion und dem Transport der Mitochondrien ist ihr Abbau und Recycling essentiell für das Überleben der Zellen. Eine Akkumulation von beschädigten Mitochondrien führt zu einer vermehrten Bildung von ROS und einer reduzierten ATP-Versorgung was sich auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse auswirkt und schlussendlich Apoptose induziert (Cowan et al., 2019). Der Prozess der Mitophagie, welcher neben dem proteasomalen Abbau der zentrale Weg für das Recycling von Mitochondrien ist, wurde bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie PD, AD und ALS, in Verbindung gebracht, da viele der krankheits-assoziierten Proteine Teil der Degradationskaskade der Mitophagie sind (Wang, Y. et al., 2019). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Mitophagie in NP-C zeigen, dass besonders während der Initiation des Abbauprozesses von Mitochondrien nach deren Schädigung, Defekte auftreten. Die Behandlung mit CCCP führt zur Depolarisierung der Mitochondrien und induziert die Mitophagie-Kaskade. Zunächst wird PINK1 an der OMM stabilisiert, phosphoryliert dort Ubiquitin, was wiederum zur Aktivierung von Parkin führt, was seinerseits Proteine in der OMM, wie den spannungsabhängigen anionenselektiven Kanal 1 (engl. voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) ubiquitiniert. Dies führt zur Rekrutierung von SQSTM1/p62, welches sowohl an LC3B, in der sich bildenden Phagophore, als auch an das geschädigte Mitochondrium bindet (Kane et al., 2014). In den Abbildungen 12 und 13 ist zu erkennen, dass lediglich die beiden Kontrollzelllinien in der Lage sind die Parkin-Expression und Translokation zu den Mitochondrien, als Antwort auf die durch CCCP induzierten mitochondrialen Schäden, hochzuregulieren. Ähnliche Ergebnisse sind für PD bekannt, bei der die Translokation auf Grund von Mutationen im *Parkin*-Gen gestört sind und auch der Folgeschritt, die Ubiquitinierung von VDAC1, reduziert ist (Geisler et al., 2010). Für NP-C1 ist im Gegensatz zu den

5 Diskussion

in Abbildung 12 dargestellten Ergebnissen, in einem Knockout-Modell, basierend auf HEK 293T Zellen, keine Veränderung der Parkin-Expression nach der Behandlung mit CCCP beschrieben. Auch die Ubiquitinierung von Zielproteinen von Parkin war nicht verändert, was bei den Autoren zu der Vermutung führte, dass die Induktion der Mitophagie unabhängig von der Expression und Funktion von NPC1 ist. Die gleiche Studie zeigte darüber hinaus, dass bei NP-C1 hingegen die nachfolgenden Schritte, wie die Erkennung der ubiquitinierten Mitochondrien durch Proteine der Autophagie und die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen gestört ist (Davis et al., 2021). Andererseits ist auch eine Parkin-unabhängige Induktion der Mitophagie beschrieben, bei der PINK1 selbst die Rekrutierung von Proteinen der Autophagie einleitet (Kane et al., 2014; Lazarou et al., 2015). Dabei phosphoryliert PINK1 bereits existierende Ubiquitinmoleküle auf den Mitochondrien, was als zusätzliches Signal für die Parkin-Translokation und dessen teilweise Aktivierung fungiert (Shiba-Fukushima et al., 2014). PINK1 phosphoryliert dann Parkin, um dies vollständig zu aktivieren und die Bildung von Ubiquitinketten zu induzieren, welche dann auf die mitochondrialen Proteine übertragen werden. Der Schritt der Phosphorylierung von Ubiquitin erhöht weiterhin dessen Resistenz gegenüber de-ubiquitinierenden Proteinen und stabilisiert so die nachfolgenden Prozesse (Okatsu et al., 2015). Dieser alternative Signalweg wird jedoch vor allem durch ROS inhibiert, da vor allem die Kinaseaktivität von PINK1 bei erhöhtem ROS-Vorkommen reduziert ist (Gan et al., 2022). Dies hätte einen negativen Feedbackloop zur Folge, bei dem ein erhöhtes ROS-Vorkommen, bedingt durch beschädigte Mitochondrien, deren Abbau durch Inhibition von PINK1 hemmt. Dies würde wiederum zur erhöhten Bildung von ROS führen. Da für NP-C1 ein erhöhter ROS-Level beschrieben ist (Jürs et al., 2020), liegt die Vermutung nahe, dass auch der alternative Signalweg zur Induktion der Autophagie inhibiert ist.

Rolle von p62 bei der Autophagie und Mitophagie in NPC-defizienten Zellen

Nach der Markierung beschädigter Mitochondrien durch PINK1, Parkin und Ubiquitinierung erfolgt die Rekrutierung von p62, welches die Aufnahme der Mitochondrien in sich bildenden Autophagosomen und den Abbau dieser initiiert. Die reduzierte Expression und Translokation von Parkin zu den

Mitochondrien lassen vermuten, dass auch nachfolgende Prozesse der Kaskade Defekte aufweisen könnten. Bestätigt wird diese Vermutung durch die reduzierte Expression und Translokation von p62 als Reaktion auf die CCCP-Behandlung (Abb. 14 und 15). Auch dies könnte mit dem erhöhten ROS-Level bei NP-C1 in Verbindung stehen, da bekannt ist, dass Nrf2 (engl. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), welcher vor allem die Expression von antioxidativen Proteinen als Reaktion auf ROS reguliert, auch einen Einfluss auf die Expression von p62 hat. Es wird ein sich selbst regulierender Feedbackloop postuliert, bei dem Nrf2 die p62 Expression induziert, was seinerseits die Aktivität von Keap1 (engl. Kelch-like ECH-associated protein 1) reduziert, was wiederum zu einer Steigerung der Nrf2-Aktivität führt (Gureev et al., 2020). In einem auf iPSZs basierenden Modell für NP-C1 ist eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von Keap1 beschrieben worden, was zu einer Steigerung der Nrf2- und p62-Expression führen müsste. Allerdings ist in der gleichen Studie der p62-Level in NPC1-defizienten Zellen reduziert und die Nrf2 Expression unverändert (Saito et al., 2021). Die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse zur Expression von p62 unterstützen somit die Hypothese, dass durch Defekte in der Nrf2-Aktivität neben einer reduzierten Aktivität des antioxidativen Systems bei NP-C1, was sich z.B. durch eine deutlich Reduktion der Expression der Katalase zeigt (Jürs et al., 2020), auch die Mitophagie betroffen ist. In einer anderen Studie ist wiederum ein erhöhter mRNA-Level von Nrf2 in NPC1- und NPC2-defizienten Zellen beschrieben, welcher vermutlich als kompensatorischer Mechanismus zum erhöhten ROS-Level und der reduzierten Expression der Katalase fungiert (Kennedy et al., 2014). Der Einfluss von p62 auf die Pathophysiologie von NP-C wird weiterhin durch ein Mausmodell für AD bestätigt, bei dem ein reduzierter p62-Level als Ursache für das Auftreten von hyperphosphoryliertem Tau und der Bildung von neurofibrillary tangles, (NFTs) beschrieben ist (Ramesh Babu et al., 2008), was in vergleichbarer Weise auch für NP-C1 bekannt ist (Yan et al., 2014).

Zusätzlich ist die Rekrutierung von p62 zu den Mitochondrien als Reaktion auf die mitochondriale Schädigung reduziert (Abb. 15), was in einem ähnlichen Modell für NP-C1 in der Studie von Davis et al. bestätigt wurde (Davis et al., 2021). Dies könnte durch die reduzierte Translokation von Parkin und die

5 Diskussion

vermutlich daraus resultierende verminderte Ubiquitinierung zu erklären sein, was weiterhin die Erkennung durch das autolysosomale System und die Bildung neuer Autophagosomen um die geschädigten Mitochondrien verhindert (Geisler et al., 2010). Dabei bindet p62 direkt an LC3BII in der sich bildenden Phagophore, was zur Aufnahme des markierten Materials führt (Gureev et al., 2020). Das auch dieser Schritt bei NP-C weniger effektiv zu sein scheint, zeigt die reduzierte Kollokalisierung von Autophagosomen und Mitochondrien in den NPC-defizienten Zelllinien nach CCCP-Behandlung (Abb. 17). Weiterhin zeigen die Daten, dass auch unabhängig von mitochondrialen Schäden die Regulation von p62 gestört zu sein scheint. In Abbildung 19 ist zu erkennen, dass der p62-Level in den NPC-defizienten Zelllinien nach Blockade des Abbaus der Autophagosomen mit BafA1 die Expression von p62 nicht erhöht war. Andererseits erfolgt der Abbau von p62, induziert durch Nährstoffknappheit, nur in den beiden Kontrollzelllinien, was sowohl auf Problem bei der Induktion der Autophagie als auch beim Abbau von Autophagosomen in NPC-defizienten Zellen hindeutet. Der generell reduzierte Abbau von markiertem Material mittels Autophagie könnte also zu einem negativen Feedback-Loop führen, welcher durch das reduzierte Recycling von p62 wiederum die Möglichkeit der Markierung weiteren Materials verhindert. Ähnliches ist für PD beschrieben, wo in Fibroblasten die Induktion der Expression von p62 nach BafA1-Behandlung ebenfalls nicht auftritt (Berenguer-Escuder et al., 2020). Im Gegensatz dazu ist in NPC1-defizienten Fibroblasten unter basalen Bedingungen ein erhöhter p62-Level beschrieben, welcher allerdings durch Induktion der Autophagie mittels Nährstoffmangel reduziert werden konnte (Sarkar et al., 2013). In wieweit dabei die Regulation auf transkriptioneller Ebene, über den oben beschriebenen Einfluss von ROS auf Nrf2, eine Rolle spielt ist weiterhin nicht vollends geklärt, da in einer anderen Studie die Reduktion auf Proteinebene durch Nährstoffreduktion sogar zu einer Erhöhung des mRNA-Levels von p62 führte (Sahani et al., 2014). Dies deutet daraufhin das neben der Neusynthese auch das Recycling von p62 nach dem Abbau in den Autolysosomen eine wichtige Rolle spielt, um die Markierung von zu degradierendem Material zu gewährleisten. Interessanterweise ist jedoch auch eine p62-unabhängige Induktion der Autophagosomenbildung als Reaktion auf oxidativen Stress

beschrieben, welcher als alternativer Weg im Falle einer p62-Defizienz teilweise zur Aufrechterhaltung des Recyclings verwendet werden kann (Nomura et al., 2021).

Defekte bei Neubildung und Recycling von Autophagosomen

Neben der reduzierten Markierung des abzubauenen Materials, bzw. der Erkennung von geschädigten Mitochondrien durch das autolysosomale System ist auch die Neubildung von Autophagosomen in den NPC-defizienten Zellen reduziert. Weder durch die CCCP-Behandlung (Abb. 16) noch durch Blockade des Abbaus von Autophagosomen mit BafA1 oder Simulation von Nährstoffarmut durch Kultivierung in HBSS (Abb. 20) konnte das LC3BII/LC3BI-Verhältnis in den NPC-defizienten Zelllinien gesteigert werden. Dies ist vermutlich durch das bereits unter basalen Bedingungen deutlich erhöhte LC3BII/LC3BI-Verhältnis zu erklären, was darauf hindeutet, dass die Zellen bereits das Maximum an Autophagosomen erreicht haben. Dieser Phänotyp ist neben NP-C für viele vergleichbare neurodegenerative Erkrankungen wie AD und PD bekannt und wird primär auf einen defekten Abbau der gebildeten Autophagosomen zurückgeführt (Li et al., 2017; Lu et al., 2020; Sarkar et al., 2013). Dagegen spricht jedoch, dass die Nährstoffreduktion in den NPC-defizienten Zelllinien zu einer Reduktion des LC3BII/LC3BI-Verhältnisses führt (Abb. 20), was auf einen Abbau von Autophagosomen schließen lässt.

Dies steht wiederum im Gegensatz zu den Ergebnissen in einem NPC1-Knockdown-Modell, in dem ein deutlicher Anstieg von LC3BII in NPC1-defizienten Neuronen durch Nährstoffmangel gezeigt wurde (Ordonez et al., 2012). Der Unterschied liegt vermutlich im Anteil an funktionellem NPC1-Protein und der Menge an akkumuliertem Cholesterol, welche scheinbar einen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung des Defekts der Autophagie haben. In dem von Ordonez et al. verwendeten Modell führte der Knockdown von NPC1 zu einer 70%igen Reduktion des NPC1-Proteingehaltes und einem 4-fach erhöhten Cholesterolgehalt in den Zellen (Ordonez et al., 2012). In dem hier verwendeten Zellmodell hingegen sind trotz ähnlichem Restproteingehalt, lediglich 35% des vorhandenen Proteins richtig gefaltet und an ihrem Bestimmungsort in den Lysosomen transportiert worden, was zu einem 8 bis

5 Diskussion

16-fach erhöhten Cholesterolgehalt führt (Völkner et al., 2022) und einen deutlich schwerwiegenderen Phänotyp auf zellulärer Ebene darstellt. Eine weniger stark ausgeprägte Cholesterolakkumulation hätte nach dem postulierten Mechanismus von Davis et al. dementsprechend einen weniger starken negativen Effekt auf die Aktivität von mTORC1 und der damit einhergehenden Schädigung der lysosomalen Aktivität (Davis et al., 2021). Die Restaktivität der Lysosomen könnte so die unterschiedlichen Ausprägungen des Phänotyps erklären.

Neben der lysosomalen Aktivität reguliert mTORC1 auch die Induktion der Autophagie und die Bildung von Autophagosomen (Abb.1). Davis et al., beschrieben in ihrem NPC1-Modell eine Hyperaktivität dieses Komplexes ebenfalls bedingt durch die charakteristische Cholesterol-Akkumulation (Davis et al., 2021). Dies führt im weiteren Verlauf zur Inhibierung der Phosphorylierung des ATG13-ULK-FIP200-Komplexes, was die Rekrutierung weiterer ATG-Proteine zur Ausbildung der Phagophore verhindert (Saha et al., 2018). Für AD ist darüber hinaus eine Induktion des mTOR-Signalwegs durch oxidativen Stress beschrieben, was zur Inhibierung der Autophagie führt und die Amyloid- β Akkumulation erklären könnte (Ito et al., 2007). Die unter Nährstoffreduktion beobachtete Reduktion des LC3BII/LC3BI-Verhältnisses in den NPC-defizienten Zelllinien (Abb. 20) könnte also auch durch Probleme bei der Neubildung von Autophagosomen, bedingt durch eine erhöhte mTORC1 Aktivität, zu erklären sein, welche wiederum auf den erhöhten ROS-Level bei NP-C zurückzuführen sein könnte.

Beclin-1 ist neben mTORC1 eines der zentralen Proteine während der Induktion der Autophagie. Es ist Teil des sogenannten PI3K-Komplexes und wird durch ULK1 aus dem ATG13-ULK-FIP200-Komplex phosphoryliert. Dies führt zur Lösung von dessen Inhibitor Bcl-2 und induziert die Bildung der für die Ausbildung der Phagophore notwendigen Precursor-Vesikel (Menziez et al., 2015). Für AD ist eine reduzierte (Pickford et al., 2008), für NP-C1 hingegen eine erhöhte Expression von Beclin-1 beschrieben (van Echten-Deckert & Alam, 2018), was in diesem Falle als kompensatorischer Mechanismus gedeutet werden kann, um die Bildung neuer Autophagosomen in den NPC-defizienten Zelllinien zu steigern.

Ein anderer Erklärungsansatz bezieht sich auf die ATG5-ATG7-unabhängige Autophagie. ATG5 und ATG7 sind für die Generierung von LC3BII (Abb. 1) aus LC3BI notwendig und somit essentiell für die Bildung von Autophagosomen. Jedoch wurde auch in Fibroblasten, welche einen ATG5-, bzw. ATG7-Knockout trugen, die Bildung von Autophagosomen, deren Fusion mit Lysosomen und die Degradation des aufgenommenen Materials beobachtet (Nishida et al., 2009). Dieser, als „alternative Autophagie“ bezeichnete Signalweg ist zwar abhängig von ULK1, Beclin-1, FIP200 und VSP34, verwendet jedoch eine Rab9-regulierte Bildung von Autophagosomen, wohingegen LC3B nicht involviert zu sein scheint. Dabei konnten auch Mitochondrien über diesen alternativen Signalweg abgebaut werden (Nishida et al., 2009), was als Erklärung für die trotz der Defekte bei LC3B und p62 nachgewiesene Restaktivität der Mitophagie und Autophagie fungieren könnte.

Fusion von Autophagosomen und Lysosomen als zentrales Problem der Autophagie bei NP-C

Unabhängig von der Regulation der Bildung und Prozessierung der Autophagosomen ist ihre Fusion mit Lysosomen essentiell für ihren Abbau und die Degradation des aufgenommenen Materials. In Abbildung 21 ist das Verhältnis von Autolysosomen und Autophagosomen dargestellt. Die NPC-defizienten Zelllinien zeigen eine deutlich reduzierte Bildung von Autolysosomen, was auf Defekte während der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen hindeutet. Dieser zentrale Schritt wird durch die SNARE-Proteine VAMP7 (engl. vesicle associated membrane protein 7), Vti1b (engl. Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B) und Syntaxin 7 (Syn7) reguliert (Furuta & Amano, 2010). Für die LSDs Multipler Sulfatase Mangel (engl. multiple sulphatase deficiency, MSD) und die Mukopolysaccharidose Typ 3A (engl. mucopolysaccharidosis type IIIA, MPS-III A) ist zwar ein erhöhtes Vorkommen dieser SNARE-Proteine in Membranregionen mit erhöhtem Cholesterolgehalt beschrieben, dennoch ist die Fusion von Autophagosomen, Endosomen und Lysosomen reduziert. Die Normalisierung des Cholesterolgehalt mit methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) verbesserte die Verteilung der SNARE-Proteine und weiterhin die Fusion der Organellen (Fraldi et al., 2010). Dies könnte den Einfluss von Cholesterol und

5 Diskussion

die Verbesserung des Phänotyps durch die Behandlung mit Cyclodextrin erklären, welche bereits in unterschiedlichen Modellen für NP-C nachgewiesen wurde (Singhal et al., 2020; Vance & Karten, 2014).

Darüber hinaus hat die Menge an LC3BII in der Membran der Autophagosomen einen Einfluss auf die Fusion mit Lysosomen (Yu et al., 2012). Die Bildung von LC3BI aus pro-LC3B, sowie das Recycling von LC3BII wird dabei durch ATG4B katalysiert (Abb. 1 und 2) (Panda et al., 2015). Abbildung 22 zeigt, dass die Expression von ATG4B unter basalen Bedingungen in zwei der NPC1-defizienten Zelllinien leicht erhöht ist. Dies könnte zum einen auf eine erhöhte Notwendigkeit der Prozessierung von LC3B und/oder einen kompensatorischen Mechanismus zum Ausgleich einer reduzierten Aktivität des Enzyms hinweisen. Die Aktivität von ATG4B wird durch das Vorhandensein von ROS reguliert. Erhöhte ROS-Level führen zu einer Inaktivierung von ATG4B, was sowohl die Prozessierung von Pro-LC3B zur Bildung von LC3BI als auch das Recycling von LC3BII zu LC3BI durch De-Lipidierung inhibieren kann. Andersrum wird durch H₂O₂ selektiv lediglich die Bildung von LC3BII induziert und dessen Entfernung aus der Membran von Autophagosomen, sowie die De-Lipidierung inhibiert (Scherz-Shouval et al., 2007). Da Autophagosomen und Lysosomen, neben Mitochondrien ebenfalls ROS produzieren können wird ein lokaler Effekt von ROS postuliert, welcher LC3BII vor der De-Lipidierung schützt, wohingegen die Bildung neuer Vesikel von anderen Membranen zur Neubildung von Autophagosomen weiter funktioniert (Kubota et al., 2010). Dies würde zu einer Akkumulation von Autophagosomen mit einer erhöhten Menge an membranständigem LC3BII führen. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass nach nährstoffarmer Kultivierung, was nachweislich sowohl zur Reduktion des pH-Wertes in den Zelle und zur Bildung von ROS führt (Fernández & López-Otín, 2015), die Expression von ATG4B in den beiden Kontrollzelllinien geringfügig ansteigt (Abb. 22). In den NPC-defizienten Zelllinien hingegen ist keine Veränderung zu beobachten. Eine Erhöhung der Expression von ATG4B könnte als eine Reaktion der Zelle auf eine notwendige Erhöhung des Nährstoffrecyclings gedeutet werden. Der Anstieg von LC3BII in den Kontrollzelllinien als Reaktion auf die Nährstoffreduktion in Abbildung 19 könnte bedeuten, dass hier über ATG4B selektiv die De-Lipidierung von LC3BII verhindert wird, um das

Nährstoffrecycling durch die Autophagie zu verbessern. Die zusätzliche Induktion von ROS führt in den NPC-defizienten Zelllinien hingegen vermutlich zu einer Inhibierung von ATG4B (Kuang et al., 2012) und zu einer Verschlechterung des Phänotyps. Da jedoch durch die nährstoffarme Kultivierung der LC3BII-Level in den NPC-defizienten Zelllinien sinkt (Abb. 20), ist eine selektiven Inhibierung der ATG4B-Aktivität während der Bildung von LC3BII wahrscheinlich, wohingegen der Schritt der De-Lipidierung von LC3BII nicht beeinflusst wird (Scherz-Shouval et al., 2007).

5.4 Organellentransport bei der Mitophagie und Autophagie

Für die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen ist ein funktioneller Transport der beiden Organellen notwendig. Dabei ist die Positionierung der Lysosomen in der Nähe des Zellkerns (Korolchuk et al., 2011) und der Transport der Autophagosomen in diese Bereiche der erste Schritt um eine Fusion der beiden Organellen zu induzieren (Maday et al., 2012). Da bei NP-C als LSD speziell die Lysosomen beeinträchtigt zu sein scheinen, liegt die Vermutung nahe, dass Defekte in ihrem Transport die Prozesse der Autophagie und Mitophagie negativ beeinflussen.

Einfluss eines reduzierten Transports von Lysosomen auf die Autophagie und Mitophagie bei NP-C

Analog zur Analyse des Transports der Mitochondrien ist die Kinetik des Transports der Lysosomen in Abbildung 23 dargestellt. Vergleichbar mit den Mitochondrien ist primär die Geschwindigkeit der Lysosomen in den Zelllinien NPC1-C und NPC2 leicht reduziert (Abb. 23c). Die zurückgelegte Strecke scheint nicht beeinträchtigt zu sein. Interessanterweise ist die Dauer der Bewegung nicht verändert, jedoch ist die Anzahl der Stopps, wenn auch nur im Vergleich zu Ctrl A, signifikant erhöht (Abb. 23d und 23e). Dies unterscheidet sich geringfügig von den Ergebnissen aus einem ebenfalls auf iPSZs basierenden neuronalen Zellmodell für NP-C1, bei dem der Anteil der sich anterograde bewegenden Lysosomen, sowie ihre Geschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke reduziert waren (Prabhu et al., 2021). In dem von Prabhu et al. verwendeten Zellmodell erreichten die Lysosomen dabei allerdings in den Kontrollzelllinien eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 1,9 $\mu\text{m/s}$, wohingegen die Lysosomen in den hier verwendeten Kontrollzelllinien

5 Diskussion

im Durchschnitt lediglich mit einer Geschwindigkeit von 0,3 $\mu\text{m/s}$ transportiert wurden, was auf deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zellmodellen hindeutet. Auch für ALS ist, neben den Mitochondrien, auch für Lysosomen sowohl eine reduzierte Geschwindigkeit, als auch eine reduzierte Strecke speziell in distalen Bereichen der Axone beschrieben (Naumann et al., 2018).

Der Transport der Lysosomen wird vor allem durch ihre Funktion während der Reaktion der Zelle auf äußere Einflüsse reguliert (Lie & Nixon, 2019). Unter physiologischen Bedingungen binden die Lysosomen an mTORC1, was zu ihrem Transport in Richtung der Zellperipherie führt und die Aktivität von mTORC1 erhöht und die Autophagie reduziert (Korolchuk et al., 2011). Im Falle von Nährstoffmangel lösen sich die Lysosomen von mTORC1 und werden in die Nähe des Zellkerns transportiert. Dies führt zur Inaktivierung von mTORC1 und zur Induktion der Autophagie (Korolchuk et al., 2011).

Ein defekter Transport der Lysosomen wird dabei mit einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase in Verbindung gebracht. Mutationen im lysosomalen Ca^{2+} -Kanal TRPML1 (transienter Rezeptor-Potential-Kation-Kanal, Mucolipin-Unterfamilie, Mitglied 1) führen zu Mucopolidose Typ IV, einer LSD, welche mit Defekten in der Autophagie assoziiert ist. Der reduzierte Ca^{2+} -Ausstrom aus den Lysosomen reduziert dabei ihren, durch Dynein regulierten, Transport in Richtung des Nukleus und weiterhin die Fusion mit Autophagosomen (Li et al., 2016). Die gestörte Ca^{2+} -Homöostase bei NP-C1 könnte somit über die fehlerhafte Lokalisation der Lysosomen die Defekte in der Autophagie erklären. Lysosomen kommen primär im Zellsoma vor, wohingegen in distalen Bereichen von Neuronen eher LAMP-positive LEs zu finden sind. Daher werden vor allem LEs retrograde transportiert und reifen entlang ihres Weges zurück zum Soma. Neben Dynein und Dynaktin wird dieser Transport durch JIP3 (engl. C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3) (Drerup & Nechiporuk, 2013), sowie RILP (engl. Rab-interacting lysosomal protein, RILP) und ORP1L (engl. oxysterol-binding protein-related protein 1 L, ORP1L) reguliert (Johansson et al., 2007). Dabei erkennt ORP1L den Cholesterolgehalt in den LEs und Lysosomen und verhindert im Falle von zu wenig Cholesterol die Rekrutierung von Dynaktin und so den retrograden Transport durch Bindung der Organellen an das ER über das ER-ständige

Protein VAMP-Associated Protein A (VAP-A) (Wijdeven et al., 2016). Dadurch wird die Bindung von Kinesin und der Transport in Richtung der Zellperipherie ermöglicht (Neefjes & van der Kant, 2014). Weiterhin wird die Translokation von HOPS (engl. homotypic fusion and protein sorting) inhibiert, was die Fusion mit Lysosomen beeinflusst (Neefjes & van der Kant, 2014). Ein zu hoher Cholesterolgehalt in den Lysosomen, wie bei NP-C1 (Vance & Karten, 2014), würde vermutlich zu einem deutlich erhöhten retrograden Transport durch eine gesteigerte Translokation von Dynein zu den Lysosomen führen, allerdings auch die Fusion der Organellen verhindern.

Auch das Zytoskelett beeinflusst den Transport der Lysosomen. Dabei wurde festgestellt, dass, analog zu den Mitochondrien, die Transportgeschwindigkeit der Lysosomen bei einem Knockout von NF-L ansteigt (Perrot & Julien, 2009). Ein verändertes Zytoskelett in Form von aggregiertem Vimentin, wie es auch für NP-C beschrieben ist (Peter et al., 2017), führt hingegen zu einer Clusterbildung von Lysosomen in der Nähe des Zellkerns (Biskou et al., 2019), was auf einen gestörten Transport hinweist. Interessanterweise inhibiert Vimentin darüber hinaus sowohl die Aktivität von mTORC1, was zu einer gesteigerten Induktion der Autophagie führen sollte, als auch die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen (Biskou et al., 2019). So könnte das veränderte Vimentin-Zytoskelett sowohl den erhöhten Anteil an Autophagosomen als auch die weiteren Defekte der Autophagie und Mitophagie bei NP-C erklären.

Neben Ca^{2+} hat so auch der gestörte Cholesterollowerstand und das Zytoskelett in Form von NF-L und Vimentin bei NP-C einen direkten Einfluss auf den Transport von Lysosomen und die Autophagie. Die Gemeinsamkeit zu anderen Erkrankungen, wie AD (Lee et al., 2011), HD (Wong & Holzbaier, 2014) und ALS (Xie et al., 2015) könnte also im defekten Transport von Lysosomen, bedingt durch ein verändertes Zytoskelett liegen, was zur Akkumulation von mit der jeweiligen Krankheit assoziiertem Material durch eine inhibierte Autophagie führt.

Transport von Autophagosomen bei NP-C

Dass die Lysosomen den größten Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps der Autophagie bei NP-C haben, unterstreicht die Tatsache, dass der

5 Diskussion

Transport der Autophagosomen (Abb. 20) im Vergleich zu den Kontrollzelllinien nicht verändert ist.

Im Gegensatz dazu ist für AD neben Problemen im Transport von Mitochondrien und Lysosomen auch ein Effekt der A β -Akkumulation auf den Transport von Autophagosomen bzw. Amphisomen beschrieben (Tammineni et al., 2017). Ähnliches ist auch für PD durch α -Synuclein (Volpicelli-Daley et al., 2014) und HD durch Huntingtin (Wong & Holzbaur, 2014) beschrieben, wohingegen bei ALS der Transport der Autophagosomen nicht beeinträchtigt zu sein scheint (Maday et al., 2012). Maday et al. beschreiben dabei, dass Autophagosomen zunächst in distalen Bereichen der Zelle mit LEs fusionieren müssen, um dann retrograd transportiert werden zu können. Wie auch die Fusion mit Lysosomen wird die Fusion von Autophagosomen mit LEs durch Syntaxin-17 reguliert (Cheng et al., 2015), was im Falle von generellen Fusionsdefekten auch den Transport der Autophagosomen hemmen würde.

Ein alternativer Transportweg für Autophagosomen involviert Klp98A, ein Mitglied der Kinesin-3-Familie. In einem Drosophila-Modell führte eine Überexpression von Klp98A zu einer Akkumulation von Autophagosomen in der Zellperipherie, was die Fusion mit Lysosomen hemmt. Andererseits führt ein Knockout von Klp98A zur Clusterbildung von Autophagosomen in der Nähe des Zellkerns. Es bindet direkt an LC3 und Rab14 und vermittelt die Fusion von Autophagosomen mit LEs und Lysosomen. Dies könnte neben einem alternativen Transportweg auch die Bildung von Amphisomen und Autolysosomen unabhängig von SNARE-Proteinen gewährleisten und die nicht vollständige Inhibierung der Autophagie bei NP-C1 erklären (Mauvezin et al., 2016).

Darüber hinaus ist beschrieben, dass auch für Autophagosomen der Transport über den Cholesterolgehalt in der Membran und die Rekrutierung von Dynein reguliert wird. Ein erhöhter Cholesterolgehalt würde den retrograden Transport durch eine erhöhte Menge an rekrutiertem Dynein beschleunigen (Rai et al., 2016), was wiederum darauf hindeutet, dass der Cholesterolgehalt in den Autophagosomen bei NP-C nicht verändert ist und die Autophagie primär durch Defekte der Funktion und des Transports von Lysosomen negativ beeinflusst wird.

Zusammenfassung der postulierten Defekte in der Autophagie und Mitophagie bei NP-C

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse neben Problemen bei der Induktion der Autophagie und Mitophagie auf einen lysosomalen Defekt hin, welcher deren Transport, Positionierung und die Fusion mit Autophagosomen negativ beeinflusst. Eine gewisse Restaktivität, sowohl des Transports als auch der Fusion weisen darüber hinaus auf alternative Signalwege hin, welche eine geringe Autophagieaktivität in den NPC-defizienten Zellen unter physiologischen Bedingungen gewährleisten. Nach Induktion von Stress durch mitochondriale Schäden oder Nährstoffmangel hingegen zeigen die NPC-defizienten Zellen eine deutlich reduzierte Reaktion.

Abbildung 25 fasst die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und Hypothesen bezüglich der Autophagie und Mitophagie in NPC-defizienten neuronalen Zellen zusammen.

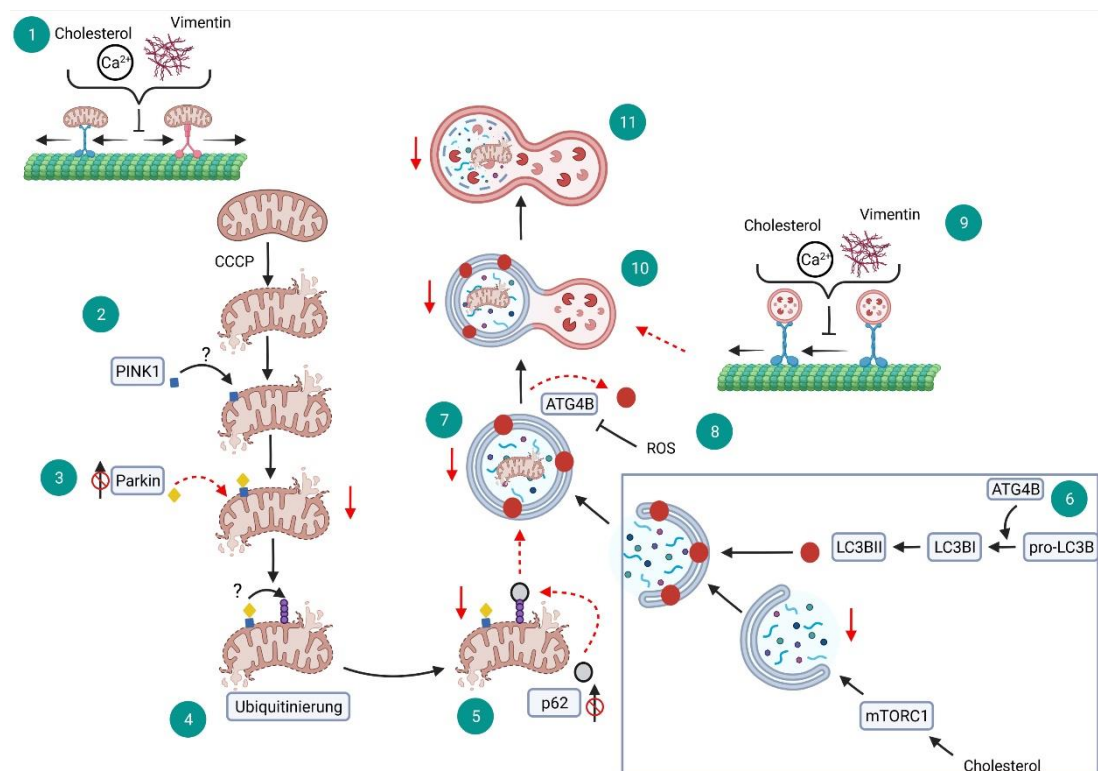


Abbildung 25 Postulierte Defekte der Autophagie und Mitophagie in neuronalen NPC-defizienten Zellen

Das Schaubild zeigt den Prozess der Mitophagie von der Induktion bis hin zur Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen. **1** Der Transport von Mitochondrien ist reduziert. **2** Die Behandlung mit CCCP induziert die Translokation von PINK1. **3** PINK1 induziert die Expression und Translokation von Parkin welche bei NP-C reduziert sind. **4** Parkin ubiquitiniert Proteine in der OMM. **5** Die p62 Translokation zu den Mitochondrien ist in den NPC-defizienten Zelllinien reduziert. **6** Eine gesteigerte

5 Diskussion

mTORC1-Aktivität, durch den gesteigerten Cholesterolgehalt bei NP-C verursacht, inhibiert die Ausbildung neuer Autophagosomen. **7** Dies verhindert die Aufnahme geschädigter Mitochondrien in Autophagosomen. **8** Der erhöhte ROS-Level reduziert das Recycling von LC3BII aus der Membran der Autophagosomen durch ATG4B. **9** Der Transport der Lysosomen ist reduziert. **10** Der erhöhte LC3BII-Level und der gestörte Transport der Lysosomen reduzieren die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen. **11** Das Recycling von Mitochondrien in NPC-defizienten Zellen ist reduziert. (Abbildung erstellt mit BioRender.com)

Die Mitochondrien zeigten, trotz einer geringeren Größe, keine funktionellen Defekte. Der erhöhte Cholesterolgehalt, sowie die gestörte Ca^{2+} -Homöostase und das veränderte Vimentin-Zytoskelett behindern den Transport der Mitochondrien in NPC-defizienten Zellen (Abb. 25, 1). Die Translokation von PINK1 nach Schädigung der Mitochondrien mit CCCP (Abb. 25, 2) wurde nicht untersucht, scheint aber aufgrund von Defekten in weiteren nachfolgenden Prozessen reduziert zu sein. Die durch PINK1 induzierte Expression und Translokation von Parkin war in den NPC-defizienten Zellen als Reaktion auf die CCCP-Behandlung reduziert (Abb. 25, 3), was vermutlich die Ubiquitinierung von Proteinen auf der OMM reduziert (Abb. 25, 4). Dies führt zu einer reduzierten Induktion der Expression und Translokation von p62 zu den Mitochondrien (Abb. 25, 5). Parallel dazu steigert der erhöhte Cholesterolgehalt in den NPC-defizienten Zellen die Aktivität von mTORC1, was zur Inhibierung der Ausbildung neuer Autophagosomen führt (Abb. 25, 6) und die Aufnahme von geschädigten Mitochondrien in die Autophagosomen verhindert (Abb. 25, 7). Der erhöhte ROS-Level bei NP-C inhibiert ATG4B und weiterhin das Recycling von LC3BII aus der Membran der Autophagosomen (Abb. 25, 8). Analog zum Transport der Mitochondrien wird der Transport der Lysosomen durch Cholesterol, Ca^{2+} und Vimentin inhibiert (Abb. 25, 9), was zusammen mit dem erhöhten LC3BII-Level in der Membran der Autophagosomen ihre Fusion mit Lysosomen verhindert (Abb. 25, 10). Dies führt zu einem reduzierten Recycling von geschädigten Mitochondrien in NPC-defizienten Zellen als Reaktion auf mitochondriale Schäden (Abb. 25, 11).

6 Zusammenfassung

Der Morbus Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine neuroviszerale Erkrankung welche zur Klasse der lysosomalen Speichererkrankungen (lysosomal storage diseases, LSDs) gehört. Von allen Patienten liegt bei 95 % eine Mutation im *NPC1*-Gen und bei 5 % im *NPC2*-Gen vor. Die Folge einer Mutation im *NPC1*- oder *NPC2*- Gen, auf zellulärer Ebene, ist eine Akkumulation von Cholesterol in den Lysosomen und eine daraus resultierende gestörte Cholesterol-Homöostase in der Zelle. Dies wirkt sich wiederum vor allem auf die Funktion von Zellorganellen wie den Lysosomen, Mitochondrien, aber auch Autophagosomen aus. Bei NP-C ist neben der Funktion gerade in Bezug auf den Transport dieser Organellen wenig bekannt. Auch der Abbau von geschädigten Mitochondrien mittels Mitophagie, sowie die Autophagie als zentraler degradierender Signalweg, sind in krankheitsassoziierten Zellmodellen lediglich oberflächlich beschrieben.

Um diese Lücken zu füllen, wurde in einem Zellmodell aus neural differenzierten patienten-spezifischen iPSCs zunächst die Morphologie der Mitochondrien anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht. Ihre Funktion wurde sowohl durch Analyse der Expression der Markerproteine Tom20, Miro1, Miro2 und Hsp60, sowie des Membranpotentials und der ATP-Produktion bewertet. Der Transport von Mitochondrien, Lysosomen und Autophagosomen wurde mittels Live-Cell-Imaging evaluiert. Die Mitophagie und Autophagie wurden sowohl durch Analyse der Expression der Schlüsselproteine Parkin, p62 und LC3B, als auch ihrer Translokation zum Wirkungsort, sowohl unter physiologischen Kulturbedingungen als auch nach Induktion von mitochondrialen Schäden mit CCCP, sowie Simulation von Nährstoffmangel oder Blockade des Abbaus von Autophagosomen mit Bafilomycin A1 (BafA1), analysiert.

Interessanterweise waren die Mitochondrien in den NPC-defizienten Zelllinien kleiner, wohingegen ihre Funktion unbeeinflusst war. Die Mitochondrien wiesen eine reduzierte Transportgeschwindigkeit und erhöhte Transportdauer, bedingt durch eine erhöhte Anzahl an Stopps, auf. Die Analyse der Mitophagie zeigte, dass nach Induktion von Schäden an den Mitochondrien in den NPC-defizienten Zellen sowohl die Expression als auch die Translokation von

6 Zusammenfassung

Parkin und p62 zur Induktion der Mitophagie deutlich weniger effektiv war. Dies führte zu einer reduzierten Aufnahme der Mitochondrien in die Autophagosomen. Auch nach Blockade des Abbaus der Autophagosomen mit BafA1 zeigten die NPC-defizienten Zellen keinen Anstieg des p62-Levels. Das LC3BII/LC3BI-Verhältnis war in den NPC-defizienten Zellen hingegen bereits unter basalen Bedingungen deutlich erhöht und konnte als Reaktion auf die Induktion von Stress jeglicher Art nicht weiter gesteigert werden. Zusätzlich war der Abbau der Autophagosomen, aufgrund einer deutlich reduzierten Fusion dieser mit Lysosomen, inhibiert. Die Analyse des Einflusses des Transports von Lysosomen und Autophagosomen auf die Prozesse der Autophagie und Mitophagie zeigte, dass die Autophagosomen nicht beeinträchtigt sind. Die Transportgeschwindigkeit der Lysosomen hingegen war geringfügig reduziert.

Die Ergebnisse zeigen, im Gegensatz zu vorherigen Studien in Mäusen und humanen Fibroblasten, dass die Funktion der Mitochondrien in NPC-defizienten neuronalen Zellen scheinbar nicht betroffen ist. Ähnlich wie bei vergleichbaren Erkrankungen liegen jedoch Defekte in ihrem Transport vor, was vermutlich durch ein verändertes Zytoskelett, eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase und erhöhten Cholesterolgehalt beeinflusst wird. Im Gegensatz zur Vermutung, dass die Mitophagie und Autophagie lediglich durch einen reduzierten Abbau von Autophagosomen zu erklären ist, zeigen die Ergebnisse, dass zusätzlich eine fehlerhafte Induktion der Signalwege vorliegt. Dabei scheint vor allem die Markierung von abzubauenem Material, speziell beschädigter Mitochondrien, als Reaktion auf zellulären Stress deutlich reduziert zu sein. Zusätzlich beeinflusst vermutlich der erhöhte Cholesterolgehalt bei NP-C über mTORC1 sowohl die Bildung neuer Autophagosomen als auch die Positionierung der Lysosomen, was die Fusion mit Autophagosomen verhindert. Dies könnte zur progressiven Neurodegeneration bei NP-C beitragen, da gerade durch die Alterung der Zellen der Stresslevel ansteigt. Eine verbesserte Erkennung von zu degradierendem Material, zusammen mit einer Senkung des Cholesterolgehaltes zur Verbesserung des Abbaus bieten also vielversprechende Interventionsmöglichkeiten, um die Pathophysiologie von NP-C positiv zu beeinflussen.

7 Literaturverzeichnis

- Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S. & Stork, B. (2012) „Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks“, *Molecular and cellular biology*, Vol. 32, No. 1, S. 2–11.
- Amiri, M. & Hollenbeck, P. J. (2008) „Mitochondrial biogenesis in the axons of vertebrate peripheral neurons“, *Developmental neurobiology*, Vol. 68, No. 11, S. 1348–1361.
- Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, A. M., Toyomizu, M., Gautier, C. A., Shen, J., Ohta, S. & Hattori, N. (2011) „Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects“, *Neurobiology of disease*, Vol. 41, No. 1, S. 111–118.
- Balboa, E., Castro, J., Pinochet, M.-J., Cancino, G. I., Matías, N., Sáez, P. J., Martínez, A., Álvarez, A. R., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C. & Zanlungo, S. (2017) „MLN64 induces mitochondrial dysfunction associated with increased mitochondrial cholesterol content“, *Redox biology*, Vol. 12, S. 274–284.
- Baloh, R. H., Schmidt, R. E., Pestronk, A. & Milbrandt, J. (2007) „Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 27, No. 2, S. 422–430.
- Becker, D., Richter, J., Tocilescu, M. A., Przedborski, S. & Voos, W. (2012) „Pink1 kinase and its membrane potential ($\Delta\psi$)-dependent cleavage product both localize to outer mitochondrial membrane by unique targeting mode“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 287, No. 27, S. 22969–22987.
- Berenguer-Escuder, C., Grossmann, D., Antony, P., Arena, G., Wasner, K., Massart, F., Jarazo, J., Walter, J., Schwamborn, J. C., Grünewald, A. & Krüger, R. (2020) „Impaired mitochondrial-endoplasmic reticulum interaction and mitophagy in Miro1-mutant neurons in Parkinson's disease“, *Human molecular genetics*, Vol. 29, No. 8, S. 1353–1364.
- Biskou, O., Casanova, V., Hooper, K. M., Kemp, S., Wright, G. P., Satsangi, J., Barlow, P. G. & Stevens, C. (2019) „The type III intermediate filament

7 Literaturverzeichnis

- vimentin regulates organelle distribution and modulates autophagy“, *PLoS one*, Vol. 14, No. 1, e0209665.
- Boecker, C. A., Goldsmith, J., Dou, D., Cajka, G. G. & Holzbaur, E. L. F. (2021) „Increased LRRK2 kinase activity alters neuronal autophagy by disrupting the axonal transport of autophagosomes“, *Current biology : CB*, Vol. 31, No. 10, 2140-2154.e6.
- Bolte, S. & Cordelières, F. P. (2006) „A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy“, *Journal of microscopy*, Vol. 224, Pt 3, S. 213–232.
- Brownlees, J., Ackerley, S., Grierson, A. J., Jacobsen, N. J. O., Shea, K., Anderton, B. H., Leigh, P. N., Shaw, C. E. & Miller, C. C. J. (2002) „Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport“, *Human molecular genetics*, Vol. 11, No. 23, S. 2837–2844.
- Cabukusta, B. & Neefjes, J. (2018) „Mechanisms of lysosomal positioning and movement“, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, Vol. 19, No. 10, S. 761–769.
- Cai, Q., Lu, L., Tian, J.-H., Zhu, Y.-B., Qiao, H. & Sheng, Z.-H. (2010) „Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons“, *Neuron*, Vol. 68, No. 1, S. 73–86.
- Cai, Q. & Sheng, Z.-H. (2009) „Moving or stopping mitochondria: Miro as a traffic cop by sensing calcium“, *Neuron*, Vol. 61, No. 4, S. 493–496.
- Cai, Q., Zakaria, H. M., Simone, A. & Sheng, Z.-H. (2012) „Spatial parkin translocation and degradation of damaged mitochondria via mitophagy in live cortical neurons“, *Current biology : CB*, Vol. 22, No. 6, S. 545–552.
- Calì, T., Ottolini, D. & Brini, M. (2012) „Mitochondrial Ca(2+) and neurodegeneration“, *Cell calcium*, Vol. 52, No. 1, S. 73–85.
- Calkins, M. J. & Reddy, P. H. (2011) „Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1812, No. 4, S. 507–513.
- Chada, S. R. & Hollenbeck, P. J. (2004) „Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria“, *Current biology : CB*, Vol. 14, No. 14, S. 1272–1276.

- Charman, M., Kennedy, B. E., Osborne, N. & Karten, B. (2010) „MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein“, *Journal of lipid research*, Vol. 51, No. 5, S. 1023–1034.
- Cheng, X.-T., Zhou, B., Lin, M.-Y., Cai, Q. & Sheng, Z.-H. (2015) „Axonal autophagosomes use the ride-on service for retrograde transport toward the soma“, *Autophagy*, Vol. 11, No. 8, S. 1434–1436.
- Cho, D.-H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z. & Lipton, S. A. (2009) „S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury“, *Science (New York, N. Y.)*, Vol. 324, No. 5923, S. 102–105.
- Coppotelli, G. & Ross, J. M. (2016) „Mitochondria in Ageing and Diseases: The Super Trouper of the Cell“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 17, No. 5.
- Corti, O., Lesage, S. & Brice, A. (2011) „What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease“, *Physiological reviews*, Vol. 91, No. 4, S. 1161–1218.
- Cowan, K., Anichtchik, O. & Luo, S. (2019) „Mitochondrial integrity in neurodegeneration“, *CNS neuroscience & therapeutics*, Vol. 25, No. 7, S. 825–836.
- Davies, J. P. & Ioannou, Y. A. (2000) „Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 275, No. 32, S. 24367–24374.
- Davis, O. B., Shin, H. R., Lim, C.-Y., Wu, E. Y., Kukurugya, M., Maher, C. F., Perera, R. M., Ordonez, M. P. & Zoncu, R. (2021) „NPC1-mTORC1 Signaling Couples Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C“, *Developmental cell*, Vol. 56, No. 3, 260-276.e7.
- Drerup, C. M. & Nechiporuk, A. V. (2013) „JNK-interacting protein 3 mediates the retrograde transport of activated c-Jun N-terminal kinase and lysosomes“, *PLoS genetics*, Vol. 9, No. 2, e1003303.

7 Literaturverzeichnis

- Dubey, M., Chaudhury, P., Kabiru, H. & Shea, T. B. (2008) „Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability“, *Cell motility and the cytoskeleton*, Vol. 65, No. 2, S. 89–99.
- Duchen, M. R. (2004) „Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology“, *Molecular aspects of medicine*, Vol. 25, No. 4, S. 365–451.
- Elgass, K., Pakay, J., Ryan, M. T. & Palmer, C. S. (2013) „Recent advances into the understanding of mitochondrial fission“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1833, No. 1, S. 150–161.
- Ershov, D., Phan, M.-S., Pylvänäinen, J. W., Rigaud, S. U., Le Blanc, L., Charles-Orszag, A., Conway, J. R. W., Laine, R. F., Roy, N. H., Bonazzi, D., Duménil, G., Jacquemet, G. & Tinevez, J.-Y. (2021) *Bringing TrackMate into the era of machine-learning and deep-learning*.
- Esteves, A. R. & Cardoso, S. M. (2017) „LRRK2 at the Crossroad Between Autophagy and Microtubule Trafficking: Insights into Parkinson's Disease“, *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, Vol. 23, No. 1, S. 16–26.
- Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B. & Colombo, M. I. (2009) „TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1793, No. 12, S. 1901–1916.
- Fernández, Á. F. & López-Otín, C. (2015) „The functional and pathologic relevance of autophagy proteases“, *The Journal of clinical investigation*, Vol. 125, No. 1, S. 33–41.
- Fraldi, A., Annunziata, F., Lombardi, A., Kaiser, H.-J., Medina, D. L., Spampinato, C., Fedele, A. O., Polishchuk, R., Sorrentino, N. C., Simons, K. & Ballabio, A. (2010) „Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders“, *The EMBO journal*, Vol. 29, No. 21, S. 3607–3620.
- Fransson, A., Ruusala, A. & Aspenström, P. (2003) „Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 278, No. 8, S. 6495–6502.

- Frazier, A. E., Kiu, C., Stojanovski, D., Hoogenraad, N. J. & Ryan, M. T. (2006) „Mitochondrial morphology and distribution in mammalian cells“, *Biological chemistry*, Vol. 387, No. 12, S. 1551–1558.
- Freischmidt, A., Wieland, T., Richter, B., Ruf, W., Schaeffer, V., Müller, K., Marroquin, N., Nordin, F., Hübers, A., Weydt, P., Pinto, S., Press, R., Millecamps, S., Molko, N., Bernard, E., Desnuelle, C., Soriani, M.-H., Dorst, J., Graf, E., Nordström, U., Feiler, M. S., Putz, S., Boeckers, T. M., Meyer, T., Winkler, A. S., Winkelmann, J., Carvalho, M. de, Thal, D. R., Otto, M., Brännström, T., Volk, A. E., Kursula, P., Danzer, K. M., Lichtner, P., Dikic, I., Meitinger, T., Ludolph, A. C., Strom, T. M., Andersen, P. M. & Weishaupt, J. H. (2015) „Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and fronto-temporal dementia“, *Nature neuroscience*, Vol. 18, No. 5, S. 631–636.
- Furuta, N. & Amano, A. (2010) „Cellular machinery to fuse antimicrobial autophagosome with lysosome“, *Communicative & integrative biology*, Vol. 3, No. 4, S. 385–387.
- Gal, J., Ström, A.-L., Kwinter, D. M., Kilty, R., Zhang, J., Shi, P., Fu, W., Wooten, M. W. & Zhu, H. (2009) „Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism“, *Journal of neurochemistry*, Vol. 111, No. 4, S. 1062–1073.
- Gan, Z. Y., Callegari, S., Cobbold, S. A., Cotton, T. R., Mlodzianoski, M. J., Schubert, A. F., Geoghegan, N. D., Rogers, K. L., Leis, A., Dewson, G., Glukhova, A. & Komander, D. (2022) „Activation mechanism of PINK1“, *Nature*, Vol. 602, No. 7896, S. 328–335.
- Garver, W. S., Francis, G. A., Jelinek, D., Shepherd, G., Flynn, J., Castro, G., Walsh Vockley, C., Coppock, D. L., Pettit, K. M., Heidenreich, R. A. & Meaney, F. J. (2007) „The National Niemann-Pick C1 disease database: report of clinical features and health problems“, *American journal of medical genetics. Part A*, 143A, No. 11, S. 1204–1211.
- Geberhiwot, T., Moro, A., Dardis, A., Ramaswami, U., Sirrs, S., Marfa, M. P., Vanier, M. T., Walterfang, M., Bolton, S., Dawson, C., Héron, B., Stampfer, M., Imrie, J., Hendriksz, C., Gissen, P., Crushell, E., Coll, M. J., Nadjar, Y., Klünemann, H., Mengel, E., Hrebicek, M., Jones, S. A., Ory, D., Bembi, B. & Patterson, M. (2018) „Consensus clinical management

7 Literaturverzeichnis

- guidelines for Niemann-Pick disease type C“, *Orphanet journal of rare diseases*, Vol. 13, No. 1, S. 50.
- Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J. & Springer, W. (2010) „PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1“, *Nature Cell Biology*, Vol. 12, No. 2, S. 119–131.
- Gentil, B. J., Minotti, S., Beange, M., Baloh, R. H., Julien, J.-P. & Durham, H. D. (2012) „Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease“, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol. 26, No. 3, S. 1194–1203.
- Glater, E. E., Megeath, L. J., Stowers, R. S. & Schwarz, T. L. (2006) „Axonal transport of mitochondria requires mlt1 to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent“, *The Journal of cell biology*, Vol. 173, No. 4, S. 545–557.
- Gomes, L. C. & Scorrano, L. (2013) „Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1833, No. 1, S. 205–212.
- Gureev, A. P., Sadovnikova, I. S., Starkov, N. N., Starkov, A. A. & Popov, V. N. (2020) „p62-Nrf2-p62 Mitophagy Regulatory Loop as a Target for Preventive Therapy of Neurodegenerative Diseases“, *Brain sciences*, Vol. 10, No. 11.
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. & Lippincott-Schwartz, J. (2010) „Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation“, *Cell*, Vol. 141, No. 4, S. 656–667.
- Hauptmann, S., Scherping, I., Dröse, S., Brandt, U., Schulz, K. L., Jendrach, M., Leuner, K., Eckert, A. & Müller, W. E. (2009) „Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice“, *Neurobiology of aging*, Vol. 30, No. 10, S. 1574–1586.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. & Yamamoto, A. (2009) „A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a

- cradle for autophagosome formation“, *Nature Cell Biology*, Vol. 11, No. 12, S. 1433–1437 [Online]. DOI: 10.1038/ncb1991.
- Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J. & Harper, J. W. (2015) „The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy“, *Molecular cell*, Vol. 60, No. 1, S. 7–20.
- Herst, P. M., Rowe, M. R., Carson, G. M. & Berridge, M. V. (2017) „Functional Mitochondria in Health and Disease“, *Frontiers in endocrinology*, Vol. 8, S. 296.
- Hirokawa, N. (1982) „Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method“, *The Journal of cell biology*, Vol. 94, No. 1, S. 129–142.
- Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. (2010) „Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease“, *Neuron*, Vol. 68, No. 4, S. 610–638.
- Hiruma, H., Katakura, T., Takahashi, S., Ichikawa, T. & Kawakami, T. (2003) „Glutamate and Amyloid β -Protein Rapidly Inhibit Fast Axonal Transport in Cultured Rat Hippocampal Neurons by Different Mechanisms“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 23, No. 26, S. 8967–8977.
- Holzerová, E. & Prokisch, H. (2015) „Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?“, *The international journal of biochemistry & cell biology*, Vol. 63, S. 16–20.
- Hoppins, S., Collins, S. R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R. M., Lackner, L. L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J. S. & Nunnari, J. (2011) „A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria“, *The Journal of cell biology*, Vol. 195, No. 2, S. 323–340.
- Imrie, J. & Wraith, J. E. (2001) „Isolated splenomegaly as the presenting feature of Niemann-Pick disease type C“, *Archives of disease in childhood*, Vol. 84, No. 5, S. 427–429.
- Ito, S., Kimura, K., Haneda, M., Ishida, Y., Sawada, M. & Isobe, K. (2007) „Induction of matrix metalloproteinases (MMP3, MMP12 and MMP13)

7 Literaturverzeichnis

- expression in the microglia by amyloid-beta stimulation via the PI3K/Akt pathway“, *Experimental gerontology*, Vol. 42, No. 6, S. 532–537.
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M. & Sesaki, H. (2013) „Mitochondrial dynamics in neurodegeneration“, *Trends in cell biology*, Vol. 23, No. 2, S. 64–71.
- Jin, J., Li, G. J., Davis, J., Zhu, D., Wang, Y., Pan, C. & Zhang, J. (2007) „Identification of novel proteins associated with both alpha-synuclein and DJ-1“, *Molecular & cellular proteomics : MCP*, Vol. 6, No. 5, S. 845–859.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M. & Neefjes, J. (2007) „Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin“, *The Journal of cell biology*, Vol. 176, No. 4, S. 459–471.
- Jürs, A. V., Völkner, C., Liedtke, M., Huth, K., Lukas, J., Hermann, A. & Frech, M. J. (2020) „Oxidative Stress and Alterations in the Antioxidative Defense System in Neuronal Cells Derived from NPC1 Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21, No. 20.
- 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“, *The EMBO journal*, Vol. 19, No. 21, S. 5720–5728.
- Kane, L. A., Lazarou, M., Fogel, A. I., Li, Y., Yamano, K., Sarraf, S. A., Banerjee, S. & Youle, R. J. (2014) „PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity“, *The Journal of cell biology*, Vol. 205, No. 2, S. 143–153.
- Kang, J.-S., Tian, J.-H., Pan, P.-Y., Zald, P., Li, C., Deng, C. & Sheng, Z.-H. (2008) „Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation“, *Cell*, Vol. 132, No. 1, S. 137–148.
- Karki, S. & Holzbaur, E. L. F. (1999) „Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport“, *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 11, No. 1, S. 45–53.

- Kelly, D. A., Portmann, B., Mowat, A. P., Sherlock, S. & Lake, B. D. (1993) „Niemann-Pick disease type C: Diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease“, *The Journal of Pediatrics*, Vol. 123, No. 2, S. 242–247.
- Kennedy, B. E., Charman, M. & Karten, B. (2012) „Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria without interacting with NPC1“, *Journal of lipid research*, Vol. 53, No. 12, S. 2632–2642.
- Kennedy, B. E., Madreiter, C. T., Vishnu, N., Malli, R., Graier, W. F. & Karten, B. (2014) „Adaptations of energy metabolism associated with increased levels of mitochondrial cholesterol in Niemann-Pick type C1-deficient cells“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 289, No. 23, S. 16278–16289.
- Khobreakar, N. V., Quintremil, S., Dantas, T. J. & Vallee, R. B. (2020) „The Dynein Adaptor RILP Controls Neuronal Autophagosome Biogenesis, Transport, and Clearance“, *Developmental cell*, Vol. 53, No. 2, 141-153.e4.
- Kim, I. & Lemasters, J. J. (2011) „Mitophagy selectively degrades individual damaged mitochondria after photoirradiation“, *Antioxidants & redox signaling*, Vol. 14, No. 10, S. 1919–1928.
- Kim, S.-J., Lim, M.-S., Kang, S.-K., Lee, Y.-S. & Kang, K.-S. (2008) „Impaired functions of neural stem cells by abnormal nitric oxide-mediated signaling in an in vitro model of Niemann-Pick type C disease“, *Cell research*, Vol. 18, No. 6, S. 686–694.
- King, S. J. & Schroer, T. A. (2000) „Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor“, *Nature cell biology*, Vol. 2, No. 1, S. 20–24.
- Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. & Seglen, P. O. (2007) „Methods for monitoring autophagy from yeast to human“, *Autophagy*, Vol. 3, No. 3, S. 181–206.
- Kocaturk, N. M. & Gozuacik, D. (2018) „Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System“, *Frontiers in cell and developmental biology*, Vol. 6, S. 128.
- Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F. M., O’Kane, C. J., Deretic, V. & Rubinsztein, D. C. (2011) „Lysosomal positioning

7 Literaturverzeichnis

- coordinates cellular nutrient responses“, *Nature Cell Biology*, Vol. 13, No. 4, S. 453–460.
- Kuang, E., Okumura, C. Y. M., Sheffy-Levin, S., Varsano, T., Shu, V. C.-W., Qi, J., Niesman, I. R., Yang, H.-J., López-Otín, C., Yang, W. Y., Reed, J. C., Broday, L., Nizet, V. & Ronai, Z. A. (2012) „Regulation of ATG4B stability by RNF5 limits basal levels of autophagy and influences susceptibility to bacterial infection“, *PLoS genetics*, Vol. 8, No. 10, e1003007.
- Kubota, C., Torii, S., Hou, N., Saito, N., Yoshimoto, Y., Imai, H. & Takeuchi, T. (2010) „Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 285, No. 1, S. 667–674.
- Kühlbrandt, W. (2015) „Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes“, *BMC biology*, Vol. 13, S. 89.
- Lamri, A., Pigeyre, M., Garver, W. S. & Meyre, D. (2018) „The Extending Spectrum of NPC1-Related Human Disorders: From Niemann-Pick C1 Disease to Obesity“, *Endocrine reviews*, Vol. 39, No. 2, S. 192–220.
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I. & Youle, R. J. (2015) „The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy“, *Nature*, Vol. 524, No. 7565, S. 309–314.
- Lee, K.-S. & Lu, B. (2014) „The myriad roles of Miro in the nervous system: axonal transport of mitochondria and beyond“, *Frontiers in cellular neuroscience*, Vol. 8, S. 330.
- Lee, S., Lee, K.-S., Huh, S., Liu, S., Lee, D.-Y., Hong, S. H., Yu, K. & Lu, B. (2016) „Polo Kinase Phosphorylates Miro to Control ER-Mitochondria Contact Sites and Mitochondrial Ca(2+) Homeostasis in Neural Stem Cell Development“, *Developmental cell*, Vol. 37, No. 2, S. 174–189.
- Lee, S., Sato, Y. & Nixon, R. A. (2011) „Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 31, No. 21, S. 7817–7830.
- Li, Q., Liu, Y. & Sun, M. (2017) „Autophagy and Alzheimer's Disease“, *Cellular and molecular neurobiology*, Vol. 37, No. 3, S. 377–388.

- Li, X., Rydzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., Gao, Q., Cheng, X. & Xu, H. (2016) „A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation“, *Nature Cell Biology*, Vol. 18, No. 4, S. 404–417.
- Lie, P. P. Y. & Nixon, R. A. (2019) „Lysosome trafficking and signaling in health and neurodegenerative diseases“, *Neurobiology of disease*, Vol. 122, S. 94–105.
- Long, Y., Xu, M., Li, R., Dai, S., Beers, J., Chen, G., Soheilian, F., Baxa, U., Wang, M., Marugan, J. J., Muro, S., Li, Z., Brady, R. & Zheng, W. (2016) „Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Evaluation of Therapeutics for Niemann-Pick Disease Type A“, *Stem cells translational medicine*, Vol. 5, No. 12, S. 1644–1655.
- López-Doménech, G., Higgs, N. F., Vaccaro, V., Roš, H., Arancibia-Cárcamo, I. L., MacAskill, A. F. & Kittler, J. T. (2016) „Loss of Dendritic Complexity Precedes Neurodegeneration in a Mouse Model with Disrupted Mitochondrial Distribution in Mature Dendrites“, *Cell reports*, Vol. 17, No. 2, S. 317–327.
- Lu, J., Wu, M. & Yue, Z. (2020) „Autophagy and Parkinson's Disease“, *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 1207, S. 21–51.
- MacAskill, A. F., Brickley, K., Stephenson, F. A. & Kittler, J. T. (2009) „GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons“, *Molecular and cellular neurosciences*, Vol. 40, No. 3, S. 301–312.
- Maday, S., Wallace, K. E. & Holzbaur, E. L. F. (2012) „Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons“, *The Journal of cell biology*, Vol. 196, No. 4, S. 407–417.
- Maetzel, D., Sarkar, S., Wang, H., Abi-Mosleh, L., Xu, P., Cheng, A. W., Gao, Q., Mitalipova, M. & Jaenisch, R. (2014) „Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPS cells“, *Stem cell reports*, Vol. 2, No. 6, S. 866–880.
- Magen, D., Georgopoulos, C., Bross, P., Ang, D., Segev, Y., Goldsher, D., Nemirovski, A., Shahar, E., Ravid, S., Luder, A., Heno, B., Gershoni-

7 Literaturverzeichnis

- Baruch, R., Skorecki, K. & Mandel, H. (2008) „Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy“, *American journal of human genetics*, Vol. 83, No. 1, S. 30–42.
- Magnoni, R., Palmfeldt, J., Christensen, J. H., Sand, M., Maltecca, F., Corydon, T. J., West, M., Casari, G. & Bross, P. (2013) „Late onset motoneuron disorder caused by mitochondrial Hsp60 chaperone deficiency in mice“, *Neurobiology of disease*, Vol. 54, S. 12–23.
- Malnar, M., Kosicek, M., Lisica, A., Posavec, M., Krolo, A., Njavro, J., Omerbasic, D., Tahirovic, S. & Hecimovic, S. (2012) „Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1822, No. 8, S. 1270–1283.
- Maruyama, T. & Noda, N. N. (2017) „Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition“, *The Journal of antibiotics*.
- Mattson, M. P., Gleichmann, M. & Cheng, A. (2008) „Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders“, *Neuron*, Vol. 60, No. 5, S. 748–766.
- Mauvezin, C., Neisch, A. L., Ayala, C. I., Kim, J., Beltrame, A., Braden, C. R., Gardner, M. K., Hays, T. S. & Neufeld, T. P. (2016) „Coordination of autophagosome-lysosome fusion and transport by a Klp98A-Rab14 complex in *Drosophila*“, *Journal of cell science*, Vol. 129, No. 5, S. 971–982.
- Menzies, F. M., Fleming, A. & Rubinsztein, D. C. (2015) „Compromised autophagy and neurodegenerative diseases“, *Nature reviews. Neuroscience*, Vol. 16, No. 6, S. 345–357.
- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J. & Baloh, R. H. (2010) „Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 30, No. 12, S. 4232–4240.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. (2008) „Autophagy fights disease through cellular self-digestion“, *Nature*, Vol. 451, No. 7182, S. 1069–1075.
- Molecular Chaperone Disorders: Defective Hsp60 in Neurodegeneration*
[Online], Bentham Science Publishers. Verfügbar unter <https://>

- www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2012/00000012/00000022/art00005.
- Moreau, K., Fleming, A., Imarisio, S., Lopez Ramirez, A., Mercer, J. L., Jimenez-Sanchez, M., Bento, C. F., Puri, C., Zavodszky, E., Siddiqi, F., Lavau, C. P., Betton, M., O'Kane, C. J., Wechsler, D. S. & Rubinsztein, D. C. (2014) „PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation“, *Nature communications*, Vol. 5, S. 4998.
- Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. (2011) „Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion“, *Cell*, Vol. 146, No. 2, S. 303–317.
- Moreau, K., Renna, M. & Rubinsztein, D. C. (2013) „Connections between SNAREs and autophagy“, *Trends in biochemical sciences*, Vol. 38, No. 2, S. 57–63.
- Moreno, R., Lardennois, C., Drouin-Garraud, V., Verspyck, E., Marret, S. & Laquerrière, A. (2008) „Prenatal revelation of Niemann-Pick disease type C in siblings“, *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, Vol. 97, No. 8, S. 1136–1139.
- Morris, R. L. & Hollenbeck, P. J. (1995) „Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons“, *The Journal of cell biology*, Vol. 131, No. 5, S. 1315–1326.
- Nakamura, T., Cieplak, P., Cho, D.-H., Godzik, A. & Lipton, S. A. (2010) „S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration“, *Mitochondrion*, Vol. 10, No. 5, S. 573–578.
- Narendra, D., Kane, L. A., Hauser, D. N., Fearnley, I. M. & Youle, R. J. (2010) „p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both“, *Autophagy*, Vol. 6, No. 8, S. 1090–1106.
- Naumann, M., Pal, A., Goswami, A., Lojewski, X., Japtok, J., Vehlow, A., Naujock, M., Günther, R., Jin, M., Stanslowsky, N., Reinhardt, P., Sternecker, J., Frickenhaus, M., Pan-Montojo, F., Storkebaum, E., Poser, I., Freischmidt, A., Weishaupt, J. H., Holzmann, K., Troost, D., Ludolph, A. C., Boeckers, T. M., Liebau, S., Petri, S., Cordes, N., Hyman, A. A., Wegner, F., Grill, S. W., Weis, J., Storch, A. & Hermann, A. (2018) „Impaired DNA damage response signaling by FUS-NLS mutations leads

7 Literaturverzeichnis

- to neurodegeneration and FUS aggregate formation“, *Nature communications*, Vol. 9, No. 1, S. 335.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M. & Lobel, P. (2000) „Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease“, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 290, No. 5500, S. 2298–2301.
- Neefjes, J. & van der Kant, R. (2014) „Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system“, *Trends in neurosciences*, Vol. 37, No. 2, S. 66–76.
- Nekrasova, O. E., Mendez, M. G., Chernouvanenko, I. S., Tyurin-Kuzmin, P. A., Kuczmarski, E. R., Gelfand, V. I., Goldman, R. D. & Minin, A. A. (2011) „Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria“, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 22, No. 13, S. 2282–2289.
- Nemani, N., Carvalho, E., Tomar, D., Dong, Z., Ketschek, A., Breves, S. L., Jaña, F., Worth, A. M., Heffler, J., Palaniappan, P., Tripathi, A., Subbiah, R., Riitano, M. F., Seelam, A., Manfred, T., Itoh, K., Meng, S., Sesaki, H., Craigen, W. J., Rajan, S., Shanmughapriya, S., Caplan, J., Prosser, B. L., Gill, D. L., Stathopoulos, P. B., Gallo, G., Chan, D. C., Mishra, P. & Madesh, M. (2018) „MIRO-1 Determines Mitochondrial Shape Transition upon GPCR Activation and Ca²⁺ Stress“, *Cell reports*, Vol. 23, No. 4, S. 1005–1019.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. (2009) „Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy“, *Nature*, Vol. 461, No. 7264, S. 654–658.
- Nomura, N., Ito, C., Ooshio, T., Tadokoro, Y., Kohno, S., Ueno, M., Kobayashi, M., Kasahara, A., Takase, Y., Kurayoshi, K., Si, S., Takahashi, C., Komatsu, M., Yanagawa, T. & Hirao, A. (2021) „Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner“, *Scientific reports*, Vol. 11, No. 1, S. 1666.
- Oakes, J. A., Davies, M. C. & Collins, M. O. (2017) „TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation“, *Molecular brain*, Vol. 10, No. 1, S. 5.

- Oka, M., Fujisaki, N., Maruko-Otake, A., Ohtake, Y., Shimizu, S., Saito, T., Hisanaga, S.-I., Iijima, K. M. & Ando, K. (2017) „Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II promotes neurodegeneration caused by tau phosphorylated at Ser262/356 in a transgenic *Drosophila* model of tauopathy“, *Journal of biochemistry*, Vol. 162, No. 5, S. 335–342.
- Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K. & Matsuda, N. (2015) „Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor“, *The Journal of cell biology*, Vol. 209, No. 1, S. 111–128.
- Ordenez, M. P., Roberts, E. A., Kidwell, C. U., Yuan, S. H., Plaisted, W. C. & Goldstein, L. S. B. (2012) „Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann Pick type C1“, *Human molecular genetics*, Vol. 21, No. 12, S. 2651–2662.
- Pacheco, C. D., Elrick, M. J. & Lieberman, A. P. (2009) „Tau normal function influences Niemann-Pick type C disease pathogenesis in mice and modulates autophagy in NPC1-deficient cells“, *Autophagy*, Vol. 5, No. 4, S. 548–550.
- Panchal, K. & Tiwari, A. K. (2021) „Miro (Mitochondrial Rho GTPase), a key player of mitochondrial axonal transport and mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases“, *Mitochondrion*, Vol. 56, S. 118–135.
- Panda, P. K., Mukhopadhyay, S., Das, D. N., Sinha, N., Naik, P. P. & Bhutia, S. K. (2015) „Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics“, *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 39, S. 43–55.
- Pankiv, S., Clausen, T. H., 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“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 282, No. 33, S. 24131–24145.
- Panov, A. V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. & Greenamyre, J. T. (2002) „Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines“, *Nature neuroscience*, Vol. 5, No. 8, S. 731–736.

7 Literaturverzeichnis

- Parenti, G. (2009) „Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics“, *EMBO molecular medicine*, Vol. 1, No. 5, S. 268–279.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K. & Daley, G. Q. (2008) „Disease-specific induced pluripotent stem cells“, *Cell*, Vol. 134, No. 5, S. 877–886.
- Pathak, D., Sepp, K. J. & Hollenbeck, P. J. (2010) „Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 30, No. 26, S. 8984–8992.
- Patterson, M. C. (2001) „Niemann-Pick disease type C : a lipid trafficking disorder“, *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, S. 3611–3634 [Online]. Verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10026997718/>.
- Patterson, M. C., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T. & Wijburg, F. (2012) „Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update“, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 106, No. 3, S. 330–344.
- Patterson, M. C. & Platt, F. (2004) „Therapy of Niemann-Pick disease, type C“, *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1685, 1-3, S. 77–82.
- Pérez, M. J., Vergara-Pulgar, K., Jara, C., Cabezas-Opazo, F. & Quintanilla, R. A. (2018) „Caspase-Cleaved Tau Impairs Mitochondrial Dynamics in Alzheimer's Disease“, *Molecular neurobiology*, Vol. 55, No. 2, S. 1004–1018.
- Perrot, R. & Julien, J.-P. (2009) „Real-time imaging reveals defects of fast axonal transport induced by disorganization of intermediate filaments“, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol. 23, No. 9, S. 3213–3225.
- Peter, F., Rost, S., Rolfs, A. & Frech, M. J. (2017) „Activation of PKC triggers rescue of NPC1 patient specific iPSC derived glial cells from gliosis“, *Orphanet journal of rare diseases*, Vol. 12, No. 1, S. 145.
- Pfeffer, S. R. (2019) „NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 294, No. 5, S. 1706–1709.

- Picard, M., Shirihai, O. S., Gentil, B. J. & Burelle, Y. (2013) „Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?“, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, Vol. 304, No. 6, R393-406.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B. & Wyss-Coray, T. (2008) „The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice“, *The Journal of clinical investigation*, Vol. 118, No. 6, S. 2190–2199.
- Polese-Bonatto, M., Bock, H., Farias, A. C. S., Mergener, R., Matte, M. C., Gil, M. S., Nepomuceno, F., Souza, F. T. S., Gus, R., Giugliani, R. & Saraiva-Pereira, M. L. (2019) „Niemann-Pick Disease Type C: Mutation Spectrum and Novel Sequence Variations in the Human NPC1 Gene“, *Molecular neurobiology*, Vol. 56, No. 9, S. 6426–6435.
- Prabhu, A. V., Kang, I., Pace, R. de, Wassif, C. A., Fujiwara, H., Kell, P., Jiang, X., Ory, D. S., Bonifacino, J. S., Ward, M. E. & Porter, F. D. (2021) „A human iPSC-derived inducible neuronal model of Niemann-Pick disease, type C1“, *BMC biology*, Vol. 19, No. 1, S. 218.
- Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. (2013) „Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes“, *Cell*, Vol. 154, No. 6, S. 1285–1299.
- Quintanilla, R. A., Tapia-Monsalves, C., Vergara, E. H., Pérez, M. J. & Aranguiz, A. (2020) „Truncated Tau Induces Mitochondrial Transport Failure Through the Impairment of TRAK2 Protein and Bioenergetics Decline in Neuronal Cells“, *Frontiers in cellular neuroscience*, Vol. 14, S. 175.
- Rabenstein, M., Peter, F., Joost, S., Trilck, M., Rolfs, A. & Frech, M. J. (2017) „Decreased calcium flux in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC-derived neurons due to higher amount of calcium-impermeable AMPA receptors“, *Molecular and cellular neurosciences*, Vol. 83, S. 27–36.
- Rai, A., Pathak, D., Thakur, S., Singh, S., Dubey, A. K. & Mallik, R. (2016) „Dynein Clusters into Lipid Microdomains on Phagosomes to Drive Rapid Transport toward Lysosomes“, *Cell*, Vol. 164, No. 4, S. 722–734.

7 Literaturverzeichnis

- Ramesh Babu, J., Lamar Seibenhener, M., Peng, J., Strom, A.-L., Kemppainen, R., Cox, N., Zhu, H., Wooten, M. C., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J. & Wooten, M. W. (2008) „Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration“, *Journal of neurochemistry*, Vol. 106, No. 1, S. 107–120.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O’Kane, C. J., Brown, S. D. M. & Rubinsztein, D. C. (2005) „Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins“, *Nature genetics*, Vol. 37, No. 7, S. 771–776.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. (2010) „Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures“, *Nature cell biology*, Vol. 12, No. 8, S. 747–757.
- Reilly, M. M., Murphy, S. M. & Laurá, M. (2011) „Charcot-Marie-Tooth disease“, *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, Vol. 16, No. 1, S. 1–14.
- Roca-Agujetas, V., Barbero-Camps, E., Dios, C. de, Podlesniy, P., Abadin, X., Morales, A., Marí, M., Trullàs, R. & Colell, A. (2021) „Cholesterol alters mitophagy by impairing optineurin recruitment and lysosomal clearance in Alzheimer’s disease“, *Molecular neurodegeneration*, Vol. 16, No. 1, S. 15.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J. & Capaldi, R. A. (2004) „Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells“, *Cancer research*, Vol. 64, No. 3, S. 985–993.
- Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A. & Guan, K.-L. (2013) „ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase“, *Nature Cell Biology*, Vol. 15, No. 7, S. 741–750.
- Safiulina, D., Kuum, M., Choubey, V., Gogichaishvili, N., Liiv, J., Hickey, M. A., Cagalinec, M., Mandel, M., Zeb, A., Liiv, M. & Kaasik, A. (2019) „Miro proteins prime mitochondria for Parkin translocation and mitophagy“, *The EMBO journal*, Vol. 38, No. 2.
- Safiulina, D., Kuum, M., Choubey, V., Hickey, M. A. & Kaasik, A. (2019) „Mitochondrial transport proteins RHOT1 and RHOT2 serve as docking

- sites for PRKN-mediated mitophagy“, *Autophagy*, Vol. 15, No. 5, S. 930–931.
- Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S. & Bhutia, S. K. (2018) „Autophagy in health and disease: A comprehensive review“, *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, Vol. 104, S. 485–495.
- Sahani, M. H., Itakura, E. & Mizushima, N. (2014) „Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids“, *Autophagy*, Vol. 10, No. 3, S. 431–441.
- Saito, R., Miyajima, T., Iwamoto, T., Wu, C., Suzuki, K., Hossain, M. A., Munakata, M., Era, T. & Eto, Y. (2021) „A neuropathological cell model derived from Niemann-Pick disease type C patient-specific iPSCs shows disruption of the p62/SQSTM1-KEAP1-NRF2 Axis and impaired formation of neuronal networks“, *Molecular genetics and metabolism reports*, Vol. 28, S. 100784.
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R. & Hajnóczky, G. (2008) „Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105, No. 52, S. 20728–20733.
- Sarkar, S., Carroll, B., Buginim, Y., Maetzel, D., Ng, A. H. M., Cassady, J. P., Cohen, M. A., Chakraborty, S., Wang, H., Spooner, E., Ploegh, H., Gsponer, J., Korolchuk, V. I. & Jaenisch, R. (2013) „Impaired autophagy in the lipid-storage disorder Niemann-Pick type C1 disease“, *Cell reports*, Vol. 5, No. 5, S. 1302–1315.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. & Elazar, Z. (2007) „Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4“, *The EMBO journal*, Vol. 26, No. 7, S. 1749–1760.
- Shen, W.-C., Li, H.-Y., Chen, G.-C., Chern, Y. & Tu, P.-H. (2015) „Mutations in the ubiquitin-binding domain of OPTN/optineurin interfere with autophagy-mediated degradation of misfolded proteins by a dominant-negative mechanism“, *Autophagy*, Vol. 11, No. 4, S. 685–700.

7 Literaturverzeichnis

- Sheng, Z.-H. & Cai, Q. (2012) „Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration“, *Nature reviews Neuroscience*, Vol. 13, No. 2, S. 77–93.
- Shiba-Fukushima, K., Arano, T., Matsumoto, G., Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., Ryu, K.-Y., Nukina, N., Hattori, N. & Imai, Y. (2014) „Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering“, *PLoS genetics*, Vol. 10, No. 12, e1004861.
- Singhal, A., Krystofiak, E. S., Jerome, W. G. & Song, B. (2020) „2-Hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin overcomes NPC1 deficiency by enhancing lysosome-ER association and autophagy“, *Scientific reports*, Vol. 10, No. 1, S. 8663.
- Song, S., Jang, S., Park, J., Bang, S., Choi, S., Kwon, K.-Y., Zhuang, X., Kim, E. & Chung, J. (2013) „Characterization of PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) mutations associated with Parkinson disease in mammalian cells and Drosophila“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 288, No. 8, S. 5660–5672.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. & Mandelkow, E.-M. (2002) „Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress“, *The Journal of cell biology*, Vol. 156, No. 6, S. 1051–1063.
- Stowers, R., Megeath, L. J., Górska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I. A. & Schwarz, T. L. (2002) „Axonal Transport of Mitochondria to Synapses Depends on Milton, a Novel Drosophila Protein“, *Neuron*, Vol. 36, No. 6, S. 1063–1077.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors“, *Cell*, Vol. 126, No. 4, S. 663–676.
- Tammineni, P., Ye, X., Feng, T., Aikal, D. & Cai, Q. (2017) „Impaired retrograde transport of axonal autophagosomes contributes to autophagic stress in Alzheimer's disease neurons“, *eLife*, Vol. 6.
- Tang, Y. & Zucker, R. S. (1997) „Mitochondrial Involvement in Post-Tetanic Potentiation of Synaptic Transmission“, *Neuron*, Vol. 18, No. 3, S. 483–491.

- Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L. & Eliceiri, K. W. (2017) „TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking“, *Methods (San Diego, Calif.)*, Vol. 115, S. 80–90.
- Trilck, M., Hübner, R., Seibler, P., Klein, C., Rolfs, A. & Frech, M. J. (2013) „Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks“, *Orphanet journal of rare diseases*, Vol. 8, S. 144.
- Trilck, M., Peter, F., Zheng, C., Frank, M., Dobrenis, K., Mascher, H., Rolfs, A. & Frech, M. J. (2017) „Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons“, *Brain research*, Vol. 1657, S. 52–61.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E. & Shirihai, O. S. (2008) „Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy“, *The EMBO journal*, Vol. 27, No. 2, S. 433–446.
- van der Vaart, A., Griffith, J. & Reggiori, F. (2010) „Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*“, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 21, No. 13, S. 2270–2284.
- van Echten-Deckert, G. & Alam, S. (2018) „Sphingolipid metabolism - an ambiguous regulator of autophagy in the brain“, *Biological chemistry*, Vol. 399, No. 8, S. 837–850.
- Vance, J. E. & Karten, B. (2014) „Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin“, *Journal of lipid research*, Vol. 55, No. 8, S. 1609–1621.
- Vanier, M. T. (2010) „Niemann-Pick disease type C“, *Orphanet journal of rare diseases*, Vol. 5, S. 16.
- Vanier, M. T. & Latour, P. (2015) „Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: the filipin staining test“, *Methods in cell biology*, Vol. 126, S. 357–375.

7 Literaturverzeichnis

- Venkatesh, K., Mathew, A. & Koushika, S. P. (2020) „Role of actin in organelle trafficking in neurons“, *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, Vol. 77, 3-4, S. 97–109.
- Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J. T., Koh, T.-W., Zhou, Y. & Bellen, H. J. (2005) „Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions“, *Neuron*, Vol. 47, No. 3, S. 365–378.
- Völkner, C., Liedtke, M., Hermann, A. & Frech, M. J. (2021) „Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Drug Discovery in Niemann-Pick Type C1“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22, No. 2.
- Völkner, C., Liedtke, M., Untucht, R., Hermann, A. & Frech, M. J. (2021) „Patient-Specific iPSC-Derived Neural Differentiated and Hepatocyte-like Cells, Carrying the Compound Heterozygous Mutation p.V1023Sfs*15/p.G992R, Present the "Variant" Biochemical Phenotype of Niemann-Pick Type C1 Disease“, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22, No. 22.
- Völkner, C., Pantoom, S., Liedtke, M., Lukas, J., Hermann, A. & Frech, M. J. (2022) „Assessment of FDA-Approved Drugs as a Therapeutic Approach for Niemann-Pick Disease Type C1 Using Patient-Specific iPSC-Based Model Systems“, *Cells*, Vol. 11, No. 3, S. 319.
- Volpicelli-Daley, L. A., Gamble, K. L., Schultheiss, C. E., Riddle, D. M., West, A. B. & Lee, V. M.-Y. (2014) „Formation of α -synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes“, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 25, No. 25, S. 4010–4023.
- Vos, K. J. de, Chapman, A. L., Tennant, M. E., Manser, C., Tudor, E. L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P. J., McLoughlin, D. M., Shaw, C. E., Leigh, P. N., Miller, C. C. J. & Grierson, A. J. (2007) „Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content“, *Human molecular genetics*, Vol. 16, No. 22, S. 2720–2728.
- Wagner, O. I., Lifshitz, J., Janmey, P. A., Linden, M., McIntosh, T. K. & Leterrier, J.-F. (2003) „Mechanisms of Mitochondria-Neurofilament Interactions“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 23, No. 27, S. 9046–9058.

- Wallace, D. C., Fan, W. & Procaccio, V. (2010) „Mitochondrial energetics and therapeutics“, *Annual review of pathology*, Vol. 5, S. 297–348.
- Walterfang, M., Abel, L. A., Desmond, P., Fahey, M. C., Bowman, E. A. & Velakoulis, D. (2013) „Cerebellar volume correlates with saccadic gain and ataxia in adult Niemann-Pick type C“, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 108, No. 1, S. 85–89.
- Wang, B., Abraham, N., Gao, G. & Yang, Q. (2016) „Dysregulation of autophagy and mitochondrial function in Parkinson's disease“, *Translational neurodegeneration*, Vol. 5, S. 19.
- Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., Li, D., Wang, B., Zhu, Y., Cao, C., Zhou, J. & Chen, Q. (2011) „Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 286, No. 13, S. 11649–11658.
- Wang, W., Wang, X., Fujioka, H., Hoppel, C., Whone, A. L., Caldwell, M. A., Cullen, P. J., Liu, J. & Zhu, X. (2016) „Parkinson's disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes“, *Nature medicine*, Vol. 22, No. 1, S. 54–63.
- Wang, X., Williams, D., Müller, I., Lemieux, M., Dukart, R., Maia, I. B. L., Wang, H., Woerman, A. L. & Schmitt-Ulms, G. (2019) „Tau interactome analyses in CRISPR-Cas9 engineered neuronal cells reveal ATPase-dependent binding of wild-type but not P301L Tau to non-muscle myosins“, *Scientific reports*, Vol. 9, No. 1, S. 16238.
- Wang, Y., Liu, N. & Lu, B. (2019) „Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases“, *CNS neuroscience & therapeutics*, Vol. 25, No. 7, S. 859–875.
- Weihofen, A., Thomas, K. J., Ostaszewski, B. L., Cookson, M. R. & Selkoe, D. J. (2009) „Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking“, *Biochemistry*, Vol. 48, No. 9, S. 2045–2052.
- Wijdeven, R. H., Janssen, H., Nahidiazar, L., Janssen, L., Jalink, K., Berlin, I. & Neefjes, J. (2016) „Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway“, *Nature communications*, Vol. 7, S. 11808.

7 Literaturverzeichnis

- Wild, P., Farhan, H., McEwan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., Dötsch, V., Bumann, D. & Dikic, I. (2011) „Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth“, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 333, No. 6039, S. 228–233.
- Wong, Y. C. & Holzbaur, E. L. F. (2014) „The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation“, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 34, No. 4, S. 1293–1305.
- Woo, H.-N., Park, S., Kim, H. L., Jung, M.-K., Pack, C.-G., Park, J., Cho, Y., Jo, D.-G., Kim, D. K., Mook-Jung, I., Kim, S. W. & Lee, H. (2021) „miR-351-5p/Miro2 axis contributes to hippocampal neural progenitor cell death via unbalanced mitochondrial fission“, *Molecular therapy. Nucleic acids*, Vol. 23, S. 643–656.
- Woś, M., Szczepanowska, J., Pikuła, S., Tylki-Szymańska, A., Zabłocki, K. & Bandorowicz-Pikuła, J. (2016) „Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease“, *Archives of biochemistry and biophysics*, Vol. 593, S. 50–59.
- Wraith, J. E., Baumgartner, M. R., Bembi, B., Covanis, A., Levade, T., Mengel, E., Pineda, M., Sedel, F., Topçu, M., Vanier, M. T., Widner, H., Wijburg, F. A. & Patterson, M. C. (2009) „Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C“, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 98, 1-2, S. 152–165.
- Wraith, J. E., Guffon, N., Rohrbach, M., Hwu, W. L., Korenke, G. C., Bembi, B., Luzy, C., Giorgino, R. & Sedel, F. (2009) „Natural history of Niemann-Pick disease type C in a multicentre observational retrospective cohort study“, *Molecular genetics and metabolism*, Vol. 98, No. 3, S. 250–254.
- Xie, Y., Zhou, B., Lin, M.-Y., Wang, S., Foust, K. D. & Sheng, Z.-H. (2015) „Endolysosomal Deficits Augment Mitochondria Pathology in Spinal Motor Neurons of Asymptomatic fALS Mice“, *Neuron*, Vol. 87, No. 2, S. 355–370.
- Yan, X., Yang, F., Lukas, J., Witt, M., Wree, A., Rolfs, A. & Luo, J. (2014) „Hyperactive glial cells contribute to axonal pathologies in the spinal cord of Npc1 mutant mice“, *Glia*, Vol. 62, No. 7, S. 1024–1040.

- Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. (2012) „Mitochondrial fission, fusion, and stress“, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 337, No. 6098, S. 1062–1065.
- Yu, T. & Lieberman, A. P. (2013) „Npc1 acting in neurons and glia is essential for the formation and maintenance of CNS myelin“, *PLoS genetics*, Vol. 9, No. 4, e1003462.
- Yu, W., Gong, J.-S., Ko, M., Garver, W. S., Yanagisawa, K. & Michikawa, M. (2005) „Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function“, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 280, No. 12, S. 11731–11739.
- Yu, Z.-Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H.-Y., Jiang, F.-J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X.-L., Klionsky, D. J., Liang, Y. & Xie, Z. (2012) „Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy“, *Autophagy*, Vol. 8, No. 6, S. 883–892.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Autophagie	- 13 -
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen.....	- 15 -
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Mitophagie.....	- 18 -
Abbildung 4 Schematische Darstellung der analysierten Entfernungparameter.....	- 28 -
Abbildung 5 Schematische Darstellung der Grenzwertbestimmung.....	- 29 -
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Auswertung der mitochondrialen Morphologie	- 31 -
Abbildung 7 Analyse der mitochondrialen Morphologie	- 37 -
Abbildung 8 Analyse der Expression von Tom20 und Hsp60	- 39 -
Abbildung 9 Analyse der Funktionalität der Mitochondrien	- 41 -
Abbildung 10 Analyse der Expression von Miro1 und Miro2.....	- 43 -
Abbildung 11 Analyse des Transports der Mitochondrien.....	- 45 -
Abbildung 12 Analyse der Expression von Parkin nach Induktion der Mitophagie	- 48 -
Abbildung 13 Analyse der Kolokalisation von Parkin und Miro1 nach Induktion der Mitophagie	- 49 -
Abbildung 14 Analyse der Expression von p62 nach Induktion der Mitophagie ..	- 50 -
Abbildung 15 Analyse der Kolokalisation von p62 und Miro1 nach Induktion der Mitophagie	- 51 -
Abbildung 16 Analyse der Expression von LC3B während der Mitophagie.....	- 53 -
Abbildung 17 Analyse der Aufnahme von Mitochondrien in Autophagosomen ...	- 54 -
Abbildung 18 Analyse des Abbaus von Mitochondrien	- 56 -
Abbildung 19 Analyse der Expression von p62 während der Autophagie	- 57 -
Abbildung 20 Analyse der Expression von LC3B während der Autophagie	- 58 -
Abbildung 21 Analyse des Anteils gebildeter Autolysosomen.....	- 60 -

Abbildung 22 Analyse der ATG4B Expression..... - 61 -
Abbildung 23 Analyse des Transports der Lysosomen - 63 -
Abbildung 24 Analyse des Transports von Autophagosomen..... - 65 -
Abbildung 25 Postulierte Defekte der Autophagie und Mitophagie in neuronalen
NPC-defizienten Zellen - 87 -

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien - 22 -
Tabelle 2 Verwendete Einstellungen der Transportanalyse mit TrackMate
(ImageJ)..... - 26 -

10 Abkürzungsverzeichnis

AD	engl. Alzheimers disease
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
AMPK	engl. adenosine monophosphate-activated protein kinase
Arl8B	engl. ADP Ribosylation Factor Like GTPase 8B
ATG	Proteine die an der Autophagie beteiligt sind (engl. autophagy-related proteins)
ATP	Adenosintriphosphat
BafA1	Bafilomycin A1
BCA	Bicinchoninsäure
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
CamK1	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase 1
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CE	Cholesterolester
DHC	Dynein schwere Kette (engl. dynein heavy chain)
DIC	Dynein mittlere Kette (engl. dynein intermediate chain)
DJ-1/PARK7	engl. Protein Deglycase DJ-1
DLC	Dynein leichte Kette (engl. dynein light chain)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drp1	Dynamamin-ähnliche Protein 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Fettsäuren (engl. fatty acids)
FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGF2	engl. fibroblast growth factor 2
FIP200	engl. focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa
FIS1	mitochondrialen Teilungsprotein 1 (engl. mitochondrial fission protein1)
GFAP	engl. glial fibrillary acidic protein
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GluA2	ionotrope Glutamat Rezeptor AMPA 2
GSK-3 β	engl. Glycogen synthase kinase 3 beta
HBSS	engl. Hanks balanced salt solution
HD	engl. Huntingtons disease
HO-1	Hämoxygenase 1
HOPS	engl. homotypic fusion and vacuole protein sorting, HOPS
IgG	Immunglobulin Typ G
IMM	innere Mitochondrien Membran (engl. inner mitochondrial membrane)
iPSZ	induzierte pluripotente Stammzellen
JIP3	engl. C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3
Keap1	engl. Kelch-like ECH-associated protein 1
KHC	Kinesin schwere Kette (engl. kinesin heavy chain)

KIF	Kinesin Superfamilie
KIF2	engl. kinesin superfamily protein 2
KLC	Kinesin leichte Kette (engl. kinesin light chain)
KLF4	Kruppel-ähnlicher Faktor 4
LAL	lysosomale saure Lipase (engl. lysosomal acid lipase)
LAMP2	Lysosome-assoziiertes Membranprotein 2
LC3B	engl. microtubuli-associated protein 1 light chain 3B, MAP1LC3B, kurz LC3B
LDL	Lipoproteine geringer Dichte (engl. low density lipoprotein)
LE/LY	späte Endosomen/Lysosomen (engl. late endosomes/lysosomes)
LSD	Lysosomale Speichererkrankungen (engl. lysosomal storage diseases)
LTD	engl. long-term depression
Mfn1/2	Mitofusion 1 und 2
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
mGluR	metabotrophen Glutamat-Rezeptoren
MIRO 1/2	mitochondriale Rho GTPase 1/2
MLN64	metastatische Lymphknoten Protein 64
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MPP	engl. matrix processing peptidase
MPS-III A	Mukopolysaccharidose Typ 3A
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
MS	Multiple Sklerose
MSD	engl. multiple sulphatase deficiency
mTORC1	engl. mammalian target of rapamycin complex 1
M β CD	methyl- β -Cyclodextrin
NADH	Desoxyribonukleinsäure
NBR1	engl. neighbor of BRCA1 gene 1
NDP52	engl. nuclear dot protein 52 kDa
NDZs	Neural differenzierte Zellen
NF	Neurofilament
NF-L	Neurofilament leichte Kette
NFTs	engl. neurofibrillary tangles
NGS	engl. normal goat serum
NO	Stickstoffmonoxid
NPC	Niemann-Pick Typ C (Protein)
<i>NPC</i>	Niemann-Pick Typ C (Gen)
NP-C	Niemann-Pick Typ C (Erkrankung)
NPZ	Neurale Progenitorzellen
Nrf2	engl. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OCT4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
OMM	äußere Mitochondrien Membran (engl. outer mitochondrial membrane)
OPA1	engl. Dynamin-like 120 kDa protein
OPTN	Optineurin
ORP1L	engl. oxysterol-binding protein-related protein 1 L
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
p62	Sequestome 1(SQSTM1)/p62
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD	engl. Parkinsons disease

10 Abkürzungsverzeichnis

PE	Phosphatidylethanolamin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PINK1	PTEN-induzierte Kinase 1
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLO	Poly-L-Ornithine
PPC	Partikel pro Zelle
PSA-NCAM	engl. Polysialic acid Neural Cell Adhesion Molecule (Neurales Zelladhäsionsmolekül)
Rab	Ras-verwandtes Protein
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RILP	engl. Rab-interacting lysosomal protein
RIPA	Radio-Immunpräzipitationsassay
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
SDS	engl. Sodium dodecyl sulfate
SNARE	engl. soluble NSF attachment protein receptors
S-NO	S-Nitrosylierung
SOD2	Superoxid Dismutase 2
SOX2	engl. sex determining region Y (SRY)- box 2 (geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2)
Syn7	Syntaxin 7
TAX1BP1	engl. Tax1-binding protein 1
TBK1	TANK-bindende Kinase 1
TBS(T)	Tris-gepufferte Salzlösung (Tween)
TIM	engl. translocase of the inner membrane
TOM	engl. translocase of the outer membrane
TRAK 1/ 2	engl. Trafficking kinesin-binding protein 1
TRAK 1/2	engl. trafficking-protein-Kinesin-binding-1/2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPML1	transienter Rezeptor-Potential-Kation-Kanal, Mucolipin-Unterfamilie, Mitglied 1
UC	unverestertes Cholesterol (engl. unesterified cholesterol)
ULK 1/2	engl. Unc-51 like autophagy activating kinase
VAMP7	engl. vesicle associated membrane protein 7
VAP-A	engl. VAMP-Associated Protein A
VDAC1	engl. voltage-dependent anion channel 1
VSGP	vertical supranuclear gaze palsy
VSP34	engl. vacuolar protein sorting 34
Vti1b	engl. Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B

11 Anhang

11.1 Verwendete Materialien

11.1.1 Verbrauchsmaterialien

- Zellkulturplatten (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
- Reaktionsgefäße (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland):
 - 1,5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL
- Pippettenspitzen (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland):
 - 0,1 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL
- Serologische Pipetten (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland):
 - 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL
- Objektträger: Superfrost Microscope Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast Gels (4-15%) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) Trans-Bolt® Turbo™ Transfer Packs (Midi Format, 0.2µm Nitrozellulose, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

11.1.2 Geräte

- Zentrifuge: Hermle Z 383 K (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland)
- Laser Scanning Microscope 900 ausgestattet mit einem motorisierten Scan-Tisch 130x100 STEP, einem Laser-Module URGB mit 405 nm, 488 nm und 561 nm einem Diodenlaser, einem Plan-APOCHROMAT 63x/1.4 Oil Objektiv, und einem GaAsP-PMT Detektor (Zeiss, Hamburg, Deutschland)
- Plattenlesegerät (TECAN, Männedorf, Schweiz)
- Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Casy® Cell Counter Modell TT (Innovatis)

11 Anhang

- Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)

11.1.3 Chemikalien und Reagenzien

- Matrigel (Corning, NY, USA)
- Poly-L-Ornithin (PLO, 15 µg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und
- Laminin (10 µg/ml; Trevigen, Gaithersburg, USA)
- Accutase® Solution (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Bafilomycin A1 from streptomyces griseaus (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- CCCP (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- PFA (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- NaCl (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- MgCl₂ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- CaCl₂ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- NaH₂PO₄ (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- HEPES (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- KCl (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- Glucose (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- TRIS (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Natrium Deoxycholat (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA)
- EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- SDS (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycerol (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Triton X-100 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- NGS (DAKO AG Chemische Spezialprodukte, Wiesentheid, Deutschland)
- DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Fluoromount-G® (SouthernBiotech, Birmingham, UK)
- cOmplete™ Mini Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- EDTA-freiem Protease Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

- Precision plus Protein Dual Xtra Standard (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
- Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- BSA (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Bromphenolblau Natrium-Salz (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

11.1.4 Puffer und Lösungen

- **PBS** (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- **Hank's Balanced Salt Solution** (HBSS, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- **TBS:**
 - 200 mM TRIS
 - 1,37 M NaCl
 - pH 7,5
- **EXS-HEPES Puffer:**
 - 151 mM NaCl,
 - 1.25 mM NaH₂PO₄,
 - 10 mM HEPES,
 - 2.5 mM KCl,
 - mM CaCl₂,
 - 1 mM MgCl₂,
 - 10mM Glucose,
 - pH 7.4
- **RIPA-Puffer:**
 - TRIS 20 μ M,
 - NaCl 137 μ M,
 - Natrium Deoxychololat 12 μ M,
 - EDTA 2 μ M,
 - 0,1 % SDS,

11 Anhang

- 1 % Triton® X-100,
- 10 % Glycerol

- **Laemmli-Puffer:**
 - 125 mM TRIS
 - 20 % Glycerol
 - 2 % SDS
 - 5 % β -Mercaptoethanol
 - 0,1% Bromphenolblau

- **Elektrophorese Puffer:**
 - 250 mM TRIS,
 - M Glyzin und
 - 0,1 % SDS

- **TRIS-Puffer:**
 - TBS
 - 20 mM TRIS
 - 137 mM NaCl
 - pH 7.5

11.1.5 Medien

- **Proliferationsmedium**
 - 40 % Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
 - 60 % DMEM/F-12 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
 - 1X B27 (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
 - 0,5% Penicillin/Streptomycin (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
 - 20 ng/ml Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. basic fibroblast growth factor, FGF₂, Amsbio, Abingdon, UK)
 - 20 ng/ml Epidermalem Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF), Peprotech, Deutschland

- **Differenzierungsmedium**
 - 40 % Dulbecco´s modified Eagle medium (DMEM)
 - 60 % DMEM/F-12
 - 1X B27
 - 0,5 % Penicillin/Streptomycin

- **Nährstoffarmes Medium**
 - HBSS
 - 5 mg/ml Magnesium (MgCl₂)
 - 6,6 mg/ml Kalzium (CaCl₂)

11.1.6 Kits

- CellLight™ BacMam 2.0 Technologie (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA):
 - Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFP-GFP-LC3B Kit
 - Premo™ Autophagy Sensor LC3B-GFP (BacMam 2.0)
 - CellLight™ Mitochondria-GFP, BacMam 2.0
 - CellLight™ Mitochondria-RFP, BacMam 2.0
 - CellLight™ Lysosomes-RFP, BacMam 2.0
- JC-10 (Firma AAT Bioquest®, Inc., Sunnyvale, CA, USA)
- ATPLite Assay Kit (PerkinElmer®, Inc., Waltham, MA, USA)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

11.1.7 Antikörper

- **Primäre Antikörper:**
 - Tom20 (Maus, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA)
 - Hsp60 (Kaninchen, Abcam, Cambridge, UK)
 - Parkin (Maus, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA)
 - LC3BII/I (Kaninchen, Cell Signaling Technology, Cambridge, UK)
 - Miro1 (Maus, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 - Miro2 (Kaninchen, Abcam, Cambridge, UK)
 - p62 (Kaninchen, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

11 Anhang

- ATG4B (Kaninchen, Cell Signaling Technology, Cambridge, UK)
- GAPDH (Maus, Abcam, Cambridge, UK)

- **Fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper:**

- anti-Maus IgG konjugiert mit Alexa488 (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- anti-Kaninchen IgG konjugiert mit Alexa568 (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- anti-Maus 800 (DyLight™, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- anti-Kaninchen 680 (DyLight™, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

11.1.8 Software

- ZEN Software Blue 2 (Zeiss, Hamburg, Deutschland)
- Image Studio Lite Version 5.2 (Li-cor Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
- Fiji ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)
 - Plugins:
 - JaCoP PlugIn (Version 2.1.1) (Bolte & Cordelières, 2006)
 - TrackMate (Tinevez et al., 2017)
 - Shape Descriptor (Gary Chinga (gary.chinga@pfi.no)

11.2 Publikationen

Liedtke, M.; Völkner, C.; Hermann, A.; Frech, M.J. Impact of Organelle Transport Deficits on Mitophagy and Autophagy in Niemann–Pick Disease Type C. *Cells* **2022**, *11*, 507. <https://doi.org/10.3390/cells11030507>

Liedtke, M.; Völkner, C.; Jürs, A.V.; Peter, F.; Rabenstein, M.; Hermann, A.; Frech, M.J. Pathophysiological In Vitro Profile of Neuronal Differentiated Cells Derived from Niemann-Pick Disease Type C2 Patient-Specific iPSCs Carrying the NPC2 Mutations c.58G>T/c.140G>T. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4009. <https://doi.org/10.3390/ijms22084009>

Völkner, C.; **Liedtke, M.**; Hermann, A.; Frech, M.J. (2021) Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Drug Discovery in Niemann-Pick Type C1. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, no. 2: 710 <https://doi.org/10.3390/ijms2202071>

Völkner, C.; **Liedtke, M.**; Petters, J.; Huth, K.; Knuebel, G.; Murua Escobar, H.; Bullerdiel, J.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M.J. (2020): Generation of an iPSC line (AKOSi006-A) from fibroblasts of an NPC1 patient, carrying the homozygous mutation p.I1061T (c.3182 T C) and a control iPSC line (AKOSi007-A) using a non-integrating Sendai virus system. In: *Stem cell research* **49**, S. 102056. DOI: 10.1016/j.scr.2020.102056

Jürs, A. V.; Völkner, C.; **Liedtke, M.**; Huth, K.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M. J. (2020): Oxidative Stress and Alterations in the Antioxidative Defense System in Neuronal Cells Derived from NPC1 Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. In: *International journal of molecular sciences* **21** (20). DOI: 10.3390/ijms21207667.

Völkner, C.; Peter, F.; **Liedtke, M.**; Krohn, S.; Lindner, I.; Murua Escobar, H.; Cimmaruta, C.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M.J. (2019): Generation of the Niemann-Pick type C2 patient-derived iPSC line AKOSi001-A. In: *Stem cell research* **41**, S. 101606. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101606

11.3 Tagungsbeiträge

Liedtke, M., Völkner, C., Jürs, A., Hermann, A., Frech, M.J. (2021): Pathophysiological in vitro profile of neuronal differentiated cells derived from Niemann-Pick disease Type C2 patient-specific iPSCs carrying the NPC2 mutations c.58G>T/c.140G>T; 14. Meeting der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen, Deutschland

Liedtke, M., Völkner, C., Arndt, L., Hermann, A., Frech, M.J. (2020): The impact of an altered neurofilament expression on organelle transport in a neuronal cell model derived from NPC1 patient-specific induced pluripotent stem cells; FENS Forum (Föderation der Europäischen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Glasgow, Schottland

Liedtke, M., Peter, F., Völkner, C., Rabenstein, M., Frech, M.J. (2019): Impaired organelle transport in a neuronal cell model derived from Niemann-Pick type C1 patient specific induced pluripotent stem cells; 13. Meeting der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen, Deutschland

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich sowohl bei der Anfertigung meiner Dissertation als auch außerhalb des wissenschaftlichen Arbeitens während der letzten 5 Jahre unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Moritz Frech für die Betreuung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit, sowie für die guten Gespräche und Ratschläge während dieser Zeit.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Andreas Hermann und allen Kollegen und Mitarbeitern der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“ bedanken, welche mich mit Rat und Tat bei der Durchführung der Arbeit unterstützt haben. Trotz hin und wieder auftretender Probleme war es immer eine Freude mit euch zu arbeiten.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner gesamten Familie danke ich für ihre Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während des Studiums, der Zeit der Doktorarbeit und allen weiteren Lebenslagen. Ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Paula bedanken, welche während der letzten 5 Jahre meine Launen und Eigenheiten ertragen musste und mich trotzdem immer unterstützt hat. Besonders in schwierigen und deprimierenden Situationen warst du immer da und hast mir Halt gegeben und einen positiven Gegenpol gebildet.

13 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geboren am 17.04.1993 in Gelsenkirchen

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Akademischer Werdegang

Oktober 2017 – heute – **PhD Student** in der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“ der Universitätsmedizin Rostock in der AG für Neurophysiologie, Thema der Promotionsarbeit: „Untersuchungen über den Einfluss eines gestörten Organellentransports auf die Autophagie und Mitophagie im Morbus Niemann Pick Typ C, unter Verwendung eines humanen Zellmodells aus Patienten-spezifischen neural differenzierten induzierten pluripotenten Stammzellen“

Oktober 2015 – September 2017 – Masterstudium der **Medizinischen Biotechnologie** an der Universität Rostock mit dem Abschluss Master of Science (Note: 1,3); Thema der Abschlussarbeit: „Untersuchungen zur Autophagie in neuronalen Abkömmlingen von NPC1-Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen“

Oktober 2012 – September 2015 – Bachelorstudium der **Molekularen Biotechnologie** an der Universität Bielefeld mit dem Abschluss Bachelor of Science (Note: 2,5), Thema der Abschlussarbeit: „Rekombinante Expression einer α -Amylase aus *Bacillus licheniformis* und des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*“

Praktische und berufliche Erfahrung

August 2021 – Praktikum am Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock im Arbeitsbereich Forensische Genetik und Forensische Toxikologie

2019 - heute – Laborleiter in der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“ der Universitätsmedizin Rostock

Oktober 2018 – Erwerb des Felasa-B-Scheines für Versuchstierkunde

14 Lebenslauf

- Oktober 2017 - heute* - Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“ der Universitätsmedizin Rostock
- August 2016 - Juli 2017* – Studentische Hilfskraft am Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration der Universität Rostock
- 2016* Erwerb der Eingeschränkten Sachkunde nach § 5 der Chemikalien-Verbotsverordnung
- April 2014 – Juli 2014 und April 2015 – Juli 2015* Studentische Hilfskraft in der AG Fermentationstechnik an der Universität Bielefeld
- 11. Juni - 22. Juni 2012* Praktikum an der Medizinischen Fakultät der Ruhr Universität Bochum im Bereich der Zellbiochemie

Stipendien und Förderungen

- Juli 2019 – Juni 2022* Stipendiat der Landesgraduiertenförderung des Landes Mecklenburg Vorpommern
- 2019* Reisestipendium der Gesellschaft für Neurowissenschaften (NWG) für das 13. Meeting der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft in Göttingen

Veröffentlichungen

- 2022* **Liedtke, M.**; Völkner, C.; Hermann, A.; Frech, M.J. Impact of Organelle Transport Deficits on Mitophagy and Autophagy in Niemann–Pick Disease Type C. *Cells* **2022**, *11*, 507. <https://doi.org/10.3390/cells11030507>
- 2022* Völkner, C., Pantoom, S., **Liedtke, M.**, Lukas, J., Hermann, A., Frech, M.J., 2022. Assessment of FDA-Approved Drugs as a Therapeutic Approach for Niemann-Pick Disease Type C1 Using Patient-Specific iPSC-Based Model Systems. *Cells* *11*, 319. <https://doi.org/10.3390/cells11030319>.
- 2021* **Liedtke, M.**; Völkner, C.; Jürs, A.V.; Peter, F.; Rabenstein, M.; Hermann, A.; Frech, M.J. Pathophysiological In Vitro Profile of Neuronal Differentiated Cells Derived from Niemann-Pick Disease Type C2 Patient-Specific iPSCs Carrying the NPC2 Mutations c.58G>T/c.140G>T. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4009. <https://doi.org/10.3390/ijms22084009>
- 2021* Völkner, C.; **Liedtke, M.**; Hermann, A.; Frech, M.J. (2021) Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Drug Discovery in Niemann-Pick Type C1. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, no. 2: 710. <https://doi.org/10.3390/ijms2202071>

- 2021 Völkner, C., **Liedtke, M.**, Untucht, R., Hermann, A., Frech, M.J., 2021. Patient-Specific iPSC-Derived Neural Differentiated and Hepatocyte-like Cells, Carrying the Compound Heterozygous Mutation p.V1023Sfs*15/p.G992R, Present the "Variant" Biochemical Phenotype of Niemann-Pick Type C1 Disease. *International journal of molecular sciences* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222212184>.
- 2020 Völkner, C.; **Liedtke, M.**; Petters, J.; Huth, K.; Knuebel, G.; Murua Escobar, H.; Bullerdiek, J.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M.J. (2020) Generation of an iPSC line (AKOSi006-A) from fibroblasts of an NPC1 patient, carrying the homozygous mutation p.I1061T (c.3182 T C) and a control iPSC line (AKOSi007-A) using a non-integrating Sendai virus system. In: *Stem cell research* 49, S. 102056. DOI: 10.1016/j.scr.2020.102056
- 2020 Völkner, C., **Liedtke, M.**, Petters, J., Lukas, J., Escobar, H.M., Knuebel, G., Bullerdiek, J., Holzmann, C., Hermann, A., Frech, M.J., 2020. Generation of an iPSC line (AKOSi004-A) from fibroblasts of a female adult NPC1 patient, carrying the compound heterozygous mutation p.Val1023Serfs*15/p.Gly992Arg and of an iPSC line (AKOSi005-A) from a female adult control individual. *Stem Cell Research*, 102127. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102127> .
- 2020 Jürs, A. V.; Völkner, C.; **Liedtke, M.**; Huth, K.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M. J. (2020): Oxidative Stress and Alterations in the Antioxidative Defense System in Neuronal Cells Derived from NPC1 Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. In: *International journal of molecular sciences* 21 (20). DOI: 10.3390/ijms21207667.
- 2019 Völkner, C.; Peter, F.; **Liedtke, M.**; Krohn, S.; Lindner, I.; Murua Escobar, H.; Cimmaruta, C.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M.J. (2019): Generation of the Niemann-Pick type C2 patient-derived iPSC line AKOSi001-A. In: *Stem cell research* 41, S. 101606. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101606

Tagungsbeiträge

- 2021 **Virtuelles 14. Meeting der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen 2021**
Maik Liedtke, Christin Völkner, Alexandra Jürs, Andreas Hermann, Moritz J. Frech
Abstract: Pathophysiological in vitro profile of neuronal differentiated cells derived from Niemann-Pick disease Type C2 patient-specific iPSCs carrying the NPC2 mutations c.58G>T/c.140G>T
- 2020 **Virtuelles FENS Forum (Föderation der Europäischen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft), Glasgow, Schottland 2020**
Maik Liedtke, Christin Völkner, Luise Arndt, Andreas Hermann, Moritz J. Frech

14 Lebenslauf

Abstract: The impact of an altered neurofilament expression on organelle transport in a neuronal cell model derived from NPC1-patient-specific induced pluripotent stem cells

2019

13. Meeting der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft, Göttingen 2019

Maik Liedtke, Franziska Peter, Christin Völkner, Michael Rabenstein, Moritz J. Frech

Posterpräsentation: Impaired organelle transport in a neuronal cell model derived from Niemann-Pick type C1 patient specific induced pluripotent stem cells

Mitgliedschaften

seit 2018

Mitglied der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.

2019 - 2022

Mitglied der Graduiertenakademie der Universität Rostock

Rostock, im Juni 2022