

Aus dem Lehrstuhl  
für Medizinische Zellbiologie  
Prof. Dr. Richard Warth  
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

Die Rolle von CLN7 bei immunologischen Vorgängen mit Perspektive auf  
SARS-CoV-2 und den Cholesterinstoffwechsel

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Malin Steinfurth

2024



Aus dem Lehrstuhl  
für Medizinische Zellbiologie  
Prof. Dr. Richard Warth  
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

Die Rolle von CLN7 bei immunologischen Vorgängen mit Perspektive auf  
SARS-CoV-2 und den Cholesterinstoffwechsel

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Malin Steinfurth

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig  
1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Markus Reichold  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Zacharias Kohl  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2025

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1 (Patho-)physiologie von Lysosomen und lysosomalen Speichererkrankungen .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen - Die CLN7-Erkrankung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Zusammenhang zwischen CLN7 und der SARS-CoV-2-Infektion.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Die Schlüsselrolle des Cholesterins .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Die Rolle von CLN7 bei immunologischen Vorgängen und das THP-1-Zellmodell.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1 Geräte.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.3 Chemikalien, Substanzen und Lösungen .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.4 Enzyme und Kits .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.5 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.6 Zelllinien .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.7 Plasmide und DNA-Vektoren .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.8 RNA-Vektoren.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.9 Sequenzierungsprimer.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.10 Software .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 Versuche an HEK293T-Zellen .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1.1 Kultur und Passage .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1.2 ACE2-Antikörper-Färbung .....</b>	<b>21</b>

2.2.1.2.1 ACE2-Antikörper-Färbung zur Fluoreszenzmikroskopie .....	21
2.2.1.2.2 ACE2-Antikörper-Färbung zur Durchflusszytometrie.....	22
2.2.1.3 <i>Filipin-Färbung</i> .....	23
2.2.1.3.1 Filipin-Färbung zur Fluoreszenzmikroskopie .....	23
2.2.1.3.2 Filipin-Färbung zur Durchflusszytometrie.....	24
2.2.1.4 <i>Durchflusszytometrie</i> .....	24
2.2.1.4.1 Quantifizierung von ACE2-Rezeptoren.....	25
2.2.1.4.2 Quantifizierung von freiem Cholesterin .....	25
2.2.2 Versuche an THP-1-Zellen.....	25
2.2.2.1 <i>Kultur und Passage</i> .....	26
2.2.2.2 <i>Transfektion von CLN7</i> .....	26
2.2.2.2.1 Lipofektion.....	27
2.2.2.2.2 Elektroporation.....	29
2.2.2.3 <i>CLN7-Knockdown durch RNA-Interferenz an THP-1-Zellen</i> .....	31
2.2.2.4 <i>Quantifizierung der CLN7-Expression mittels qRT-PCR</i> .....	33
2.2.2.4.1 mRNA-Isolation.....	33
2.2.2.4.2 Gelelektrophorese des mRNA-Isolats.....	34
2.2.2.4.3 cDNA-Synthese .....	35
2.2.2.4.4 Quantitative PCR .....	36
2.2.2.4.5 Kontrolle der reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	37
2.2.2.4.6 Auswertung - relative Quantifizierung .....	38
2.2.2.4.7 Gelelektrophorese der cDNA .....	38
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie .....	39
2.2.3.1 <i>Darstellung der Zellkerne durch bisBenzimide Hoechst 33258</i> .....	39
2.2.4 Auswertung.....	39
2.2.4.1 <i>Statistische Auswertung</i> .....	39
2.2.4.2 <i>Auswertung Durchflusszytometrie-Messungen</i> .....	40

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuche an HEK293T-Zellen .....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Untersuchung der Assoziation von CLN7 und ACE2 .....	42
3.1.1.1	<i>Visualisierung der ACE2-Rezeptoren durch Immunfluoreszenz.....</i>	42
3.1.1.2	<i>Durchflusszytometrische Quantifizierung der ACE2-Rezeptoren....</i>	43
3.1.2	Untersuchung des Cholesterin-Stoffwechsels im HEK293T-Zellmodell.	45
3.1.2.1	<i>Lokalisation von Cholesterin in HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen .....</i>	45
3.1.2.2	<i>Quantifizierung von Cholesterin in CLN7-defizienten HEK293T-Zellen mittels Durchflusszytometrie .....</i>	46
<b>3.2</b>	<b>Versuche an THP-1-Zellen .....</b>	<b>48</b>
3.2.1	Transfektion von THP-1-Zellen und M0-Makrophagen mit verschiedenen Plasmiden .....	48
3.2.1.1	<i>Vorversuche mit GFP-Plasmid .....</i>	48
3.2.1.1.1	<i>Transfektion von acGFP-CLN7- und EGFP-CLN7-Plasmiden in THP-1-Zellen und M0-Makrophagen .....</i>	50
3.2.2	Quantifizierung der CLN7-mRNA in THP-1-Zellen nach siRNA-Behandlung .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Assoziation zwischen CLN7- und ACE2-Expression.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Auswirkungen der CLN7-Expression auf den Cholesterin-Stoffwechsel</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Generierung einer CLN7-defizienten THP-1-Zelllinie .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss von CLN7 auf das Monozyten-Makrophagen-System .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5</b>	<b>Abschließende Betrachtung .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 (Patho-)physiologie von Lysosomen und lysosomalen Speichererkrankungen

Lysosomen sind ubiquitär vorkommende, von einer Membran umgebene Zellorganellen. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Abbau von Makromolekülen sowie bei der Ausscheidung von Abfallprodukten und toxischen Substanzen aus der Zelle (1). Für diese Aufgabe enthalten sie eine Vielzahl von hydrolysierenden Enzymen, deren Funktion vom pH-Wert abhängig ist. Der intralysosomale pH-Wert von 4-5 wird von der Membran der Lysosomen und membranständigen ATPasen aufrecht erhalten (2). Die abzubauenden Makromoleküle werden den Lysosomen über verschiedene Mechanismen zugeführt: Endozytose, bei der Material aus dem Extrazellulärtraum in die Zelle aufgenommen wird, und Autophagie, bei der zelleigene Bestandteile degradiert werden (3).

Im Rahmen der Endozytose erfolgt zunächst die Aufnahme der Partikel, die durch verschiedene Mechanismen erfolgen kann. Welcher dieser Mechanismen zum Einsatz kommt, hängt unter anderem von der Ausstattung der Zelle sowie der Größe und Art der aufzunehmenden Partikel ab. Die verschiedenen Wege können in drei Gruppen eingeteilt werden: Phagozytose, Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose. Durch Phagozytose werden größere, durch Pinozytose kleinere Partikel sowie Flüssigkeiten aufgenommen. Die rezeptorvermittelte Endozytose ist ein spezifischer Mechanismus. Hier bildet sich nach der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor eine Einstülpung der Zellmembran, die schließlich in Form eines Vesikels nach innen abgeschnürt wird (4, 5).

Im Anschluss an die Aufnahme der Partikel erfolgt der Abbau von Makromolekülen durch das endosomal-lysosomale System. Endosomen sind membranumschlossene Zellorganellen, die eine zentrale Rolle im Transport und in der Sortierung von aufgenommenen Substanzen spielen. Sie werden in frühe und späte Endosomen unterteilt. Frühe Endosomen verschmelzen mit Vesikeln, die mit durch Endozytose aufgenommenem Material gefüllt sind. Im Zuge der Endosomenreifung bewegen sich frühe Endosomen entlang der Mikrotubuli, wobei der pH-Wert durch die Integration von ATPasen in die Membran sinkt. Dabei findet ein reger Austausch mit dem trans-

Golgi-Netzwerk statt. Lysosomale Proteine werden durch das trans-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen transportiert und einige der Strukturen aus dem Endosom, vor allem aufgenommene Rezeptoren, werden wiederum zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert und erneut verwendet. Späte Endosomen fusionieren mit Lysosomen und bilden so das Endolysosom. In diesem Komplex werden die enthaltenen Moleküle abgebaut (6).

Über die katabolen Funktionen hinaus spielen Lysosomen eine wichtige Rolle in zahlreichen weiteren zellulären Prozessen wie Signaltransduktion und Zellteilung sowie -polarität und -migration (3-7). Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen haben Störungen des lysosomalen Stoffwechsels schwerwiegende Folgen. Die dazugehörigen Krankheitsbilder werden unter dem Begriff der lysosomalen Speichererkrankungen (LSD, *lysosomal storage disorders*) zusammengefasst. Diese sind durch eine reduzierte Funktion oder den vollständigen Funktionsverlust der Lysosomen gekennzeichnet und umfassen über 70 verschiedene genetische Erkrankungen. Ihre kumulative Inzidenz beträgt etwa 1:5.000-5.500 Geburten, variiert aber je nach Erkrankung und geographischer Region stark. Die Ursache von LSDs ist eine Mutation verschiedener Gene, deren Vererbung meist autosomal-rezessiv ist. Das klinische Erscheinungsbild ist sehr heterogen, es kann zum Beispiel zu ausgeprägter kognitiver Beeinträchtigung, Schwäche, Atemproblemen und Sehstörungen kommen. Die Symptome beginnen in der Regel im frühen Kindesalter und erklären sich teilweise durch die Akkumulation von nicht abgebautem Material in den Lysosomen und weiteren Beeinträchtigungen zentraler Zellfunktionen (7).

## **1.2 Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen - Die CLN7-Erkrankung**

Eine Gruppe der LSDs sind die Ceroiden Lipofuszinosen (*neuronal ceroid lipofuscinoses* - NCLs), welche durch eine intrazelluläre Ansammlung von autofluoreszierendem Ceroid-Lipofuszin charakterisiert sind (8). Die einzelnen Erkrankungen unterscheiden sich in ihrer klinischen Manifestation und Prognose, gemein ist ihnen jedoch eine rasch progrediente Neurodegeneration, die sich in Symptomen wie Sehstörungen, Epilepsie und Demenz äußert (9). Die charakteristischen Ablagerungen befinden sich in den Lysosomen und bestehen vor allem aus der Untereinheit C der mitochondrialen ATP-Synthase, Sphingolipid-

Aktivator-Proteinen A und D und beta-Amyloid (10-12). Es kommt zu einem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen vor allem im cerebralen und cerebellären Kortex. Dies führt zu einer ausgeprägten Atrophie dieser Hirnareale. Dazu kommt eine lokale Neuroinflammation, welche axonale und retinale Degenerationen verursacht. (13, 14).

Die weltweite Inzidenz von NCLs wird auf 1:100.000 geschätzt (15), es gibt jedoch große Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen sowie regionale Häufungen (16). NCLs sind hereditäre Erkrankungen, die zumeist autosomal-rezessiv vererbt werden. Ursprünglich wurden die NCLs basierend auf dem Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation in die Kategorien „angeboren“, „infantil“, „spätautistisch“, „juvenile“ und „adult“ eingeteilt. Diese Klassifizierung wurde ergänzt durch das jeweils betroffene CLN-Gen (*ceroid lipofuscinosis, neuronal*). Nach aktuellem Stand der Wissenschaft existieren 14 verschiedene betroffene Gene, zu denen insgesamt 493 Mutationen bekannt sind (17). Die CLN-Gene kodieren für verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionen und Lokalisationen. Darunter befinden sich vor allem lysosomale (CLN1, CLN2, CLN5, CLN10, CLN13), aber auch zytoplasmatische (CLN4, CLN14) sowie transmembranöse Proteine (CLN3, CLN6, CLN7, CLN8). Die spezifischen Funktionen der verschiedenen Proteine sind zum Teil nicht bekannt (18).

Die meisten NCL-Formen können trotz intensiver Forschungen bislang nicht geheilt oder spezifisch behandelt werden. Stattdessen erfolgt eine symptomatische, palliative Therapie. Vielversprechende therapeutische Ansätze sind die Gen- und Enzymersatztherapie. Gentherapien mittels Adeno-assoziierten Viren (AAV) für CLN2 (19), CLN3 (20), CLN6 (21) befinden sich momentan in verschiedenen Phasen der klinischen Entwicklung. Enzymersatztherapien spielen bereits heute eine wichtige Rolle bei der Behandlung einzelner lysosomaler Speichererkrankungen (22).

Das ubiquitäre Transmembran-Protein CLN7 wird vom gleichnamigen Gen kodiert. Es hat eine Größe von ~58 kDa und 12 Transmembrandomänen (23). Wegen seiner Ähnlichkeit zu den *major-facilitator-superfamily-domain*-Proteinen (MFSD) wird das CLN7-Protein auch als MFSD8-Protein bezeichnet. Proteine der *major facilitator superfamily* ermöglichen den sekundär aktiven Transport verschiedener Substrate über die Zellmembran hinweg (24). Aufgrund seiner Lokalisation kann davon

ausgegangen werden, dass es ein lysosomales Membranprotein ist (23), seine spezifische Funktion ist bislang weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es sich dabei um einen lysosomalen Chloridkanal handelt, der den lysosomalen pH-Wert, das lysosomale Membranpotential und die Freisetzung von lysosomalen Calciumionen reguliert (25).

Das CLN7-Gen liegt auf dem Chromosom 4q 28.1–q28.2 und hat eine Größe von ~5 Kilobasen (23). Mutationen des CLN7-Gens werden autosomal-rezessiv vererbt (18). Die ersten Symptome dieser Mutationen zeigen sich meist im Lebensalter von zwei bis sechs Jahren. Häufig manifestiert sich die Erkrankung dann zuerst mit generalisierten Krampfanfällen und Visusverlust bis zur vollständigen Erblindung. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Verlust bereits erworbener Fähigkeiten, Entwicklungsverzögerung und -regression sowie Sprach- und motorischen Störungen. Die Erkrankung verläuft rasch progredient, sodass die Betroffenen meist vor dem 20. Lebensjahr versterben (26-28). Wahrscheinlich besteht jedoch eine gewisse Heterogenität in der phänotypischen Ausprägung von Mutationen im CLN7-Gen. In der Datenbank des University College London sind momentan 34 verschiedene Mutationen eingetragen (17), außerdem sind Mutationen mit atypischen Verläufen bekannt, die zu Phänotypen mit milderem Verlauf (27) oder Makulopathien und Retinopathien ohne begleitende neurologische Symptomatik führen (29, 30). Des Weiteren gibt es Berichte über heterozygote Mutationen, die frontotemporale Demenz (31) und amyotrophe Lateralsklerose verursachen (32). Ebenso wie bei den meisten anderen NCLs gibt es keine Behandlungsmöglichkeiten, die den Krankheitsverlauf verlangsamen oder aufhalten. Stattdessen konzentriert sich die Therapie auf palliative Konzepte. In den letzten Jahren hat die intensivierte Forschungsarbeit allerdings große Fortschritte erreicht (33). Für die AAV-vermittelte CLN7-Gentherapie wird momentan eine Phase-1-Studie durchgeführt (34).

### **1.3 Zusammenhang zwischen CLN7 und der SARS-CoV-2-Infektion**

Das SARS-CoV-2-Virus (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) ist der Auslöser der Infektionskrankheit COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), die erstmals im Dezember 2019 beschrieben wurde (35, 36). Der Ausbruch wurde im Januar 2020 durch die *World Health Organization* zum internationalen Gesundheitsnotstand und

zwei Monate später zu einer Pandemie erklärt (37). SARS-CoV-2 gehört zur Familie der Coronaviren. Während einige Infektionen asymptomatisch verlaufen, erkranken die meisten infizierten Personen an COVID-19. Die Erkrankung verläuft hochvariabel, Symptome reichen von milden Erkältungsbeschwerden bis hin zu schweren Pneumonien. Neben den Atmungsorganen können auch andere Organsysteme betroffen sein, so zum Beispiel das zentrale Nervensystem, der Magen-Darm-Trakt und das Herz-Kreislauf-System, wodurch das Risiko für Komplikationen erhöht wird (38). Seit Beginn der Pandemie gab es über 7 Millionen bestätigte Todesfälle durch COVID-19 (39).

Ein Fokus in der Erforschung des Virus liegt auf dem S-Protein, das auch als Spike-Protein bezeichnet wird und eine zentrale Rolle bei der Aufnahme des Virus in Zellen spielt. Es befindet sich auf der Virushülle und verleiht den Coronaviren aufgrund seiner gezackten Struktur (Krone, lateinisch *corona*) ihren Namen (40). Nach einer ersten Spaltung in der Virus-produzierenden Zelle (*priming*) besteht das Spike-Protein aus zwei Untereinheiten, der S1- und der S2-Domäne. Die S1-Domäne bindet das an der Oberfläche der Zielzelle befindliche *Angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2), um in die Zielzellen einzudringen (41). ACE2 ist ein Enzym, dessen physiologische Funktionen vor allem in der Regulation des kardiovaskulären Systems liegen (42). Als Rezeptor vermittelt es die Aufnahme von SARS-CoV und SARS-CoV-2 in die jeweiligen Zielzellen. Die Bindung von ACE2 an die S1-Domäne führt zur erneuten proteolytischen Spaltung des Spike-Proteins an einer Spaltstelle in der S2-Domäne (43). Diese Spaltung erfolgt durch verschiedene Proteasen, vor allem TMPRSS2 (*transmembrane protease serine subtype 2*) (41), aber auch Cathepsin B/L (41, 44, 45), Neuropilin (46), CD-147 (47) und weitere. Dieser Vorgang löst die endozytotische Aufnahme des Virus in die Zelle aus. Im Anschluss fusioniert die Membran der Virushülle mit der des Endosoms, sodass die virale RNA in das Zytosol gelangt (48). Die Interaktion mit dem Spike-Protein verursacht eine verminderte Expression von ACE2. Aufgrund der regulatorischen Funktion von ACE2 für das Gefäßsystem verstärkt eine solche verringerte ACE2-Expression unvorteilhafte Effekte wie Entzündung, Hypertrophie und eine erhöhte Vasopermeabilität in verschiedenen Organsystemen. Dies erhöht das Risiko für Komplikationen wie das *acute respiratory distress syndrome* (49, 50).

Die Mechanismen der Aufnahme und Vermehrung von Coronaviren sind als Ansatzpunkte für die Entwicklung von Impfungen und Medikamenten von besonderem wissenschaftlichem Interesse. Eine wichtige Rolle spielen deshalb Wechselwirkungen von SARS-CoV-2 mit zellulären Proteinen. Auch das CLN7-Protein scheint mit verschiedenen viralen Proteinen zu interagieren, darunter NSP4, NSP6, ORF7A, ORF7B, ORF14, E und S (51, 52). Darüber hinaus sind auch Lysosomen bei der Aufnahme und Sekretion von Coronaviren involviert (53, 54), was aufgrund der Rolle von CLN7 als lysosomales Membranprotein die These eines Zusammenhangs zwischen der SARS-CoV-2-Aufnahme und CLN7 stützt. Versuche zur SARS-CoV-2-Infektion von CLN7-defizienten Zellen zeigten eine um 90 % reduzierte Viruslast im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Andersherum erzeugt eine Überexpression von CLN7 eine Erhöhung der Viruslast um fast 90 %. Ein wichtiger Baustein für die Erklärung dieser Beobachtung könnten Lipid Rafts sein, da diese eine große Rolle in der Virusaufnahme spielen und bei CLN7-defizienten Zellen wahrscheinlich in ihrer Funktion gestört sind (55). Lipid Rafts sind cholesterinreiche Membrandomänen, die in Abschnitt 1.4 genauer erläutert werden. Ihre Funktion kann experimentell durch den Entzug von Cholesterin mittels Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) gestört werden. Dies resultiert in einer stark reduzierten Infizierbarkeit mit SARS-CoV-Viren (56). CLN7-defiziente Zellen exprimieren deutlich geringere Mengen des Gangliosids GM1, welches einen zentralen Bestandteil von Lipid Rafts und einen Kofaktor für die Bindung von SARS-CoV-2 an die Zellmembran darstellt (55, 57). Fraglich ist, ob auch der Cholesteringehalt und die -verteilung mit CLN7 in Zusammenhang stehen.

#### **1.4 Die Schlüsselrolle des Cholesterins**

Cholesterin ist als wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und strukturelle Komponente von Steroidhormonen und Gallensäuren ein zentrales Molekül des menschlichen Körpers. Gleichzeitig ist die erhöhte Blutkonzentration von Cholesterin durch die Bildung atherosklerotischer Plaques einer der wichtigsten Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit und Schlaganfälle. Für die Regulation der Blutkonzentration sind Lipoproteine und Lipoproteinrezeptoren von großer Wichtigkeit. Mit Fettsäuren verestertes Cholesterin wird an Lipoproteine gebunden transportiert und über Lipoproteinrezeptoren in Zellen aufgenommen. Dabei

sind das *low density lipoprotein* (LDL) und das *high density lipoprotein* (HDL) besonders wichtig.

Die zelluläre Cholesterin-Homöostase wird durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten: Erhöhte Cholesterinmengen können im endoplasmatischen Retikulum verestert und somit gespeichert werden. Außerdem wird die Synthese von Cholesterin selbst und von LDL-Rezeptoren gehemmt. Ein zu geringer Cholesteringehalt kann durch Biosynthese sowie Endozytose von Cholesterin-beladenen LDL-Rezeptoren ausgeglichen werden.

Um durch Endozytose aufgenommene Cholesterinester zu hydrolysieren und somit nutzbar machen zu können, sind Lysosomen von zentraler Bedeutung. Nach der Aufnahme in die Zelle wird die Einheit aus LDL, dem gebundenen Cholesterinester und dem LDL-Rezeptor an das endosomal-lysosomale System übergeben. Durch den sinkenden endosomalen pH-Wert dissoziert aufgenommenes LDL vom Rezeptor. Die Esterhydrolyse selbst wird durch lysosomale Enzyme durchgeführt. Bei Störungen der lysosomalen Funktionen (zum Beispiel durch Anhebung des pH-Werts durch Hydroxychloroquin oder bei einigen LSDs) kann der Ester nicht abgebaut werden und das Cholesterin akkumuliert. (58-60)

Die Verteilung des Cholesterins innerhalb der Zelle wird ebenfalls stark reguliert. Anomalien in der zellulären Cholesterin-Verteilung gehen mit einer Dysfunktion der Zelle einher. Das in den Membranen der Zelle enthaltene „freie“ (nicht veresterte) Cholesterin trägt durch seine hydrophoben Eigenschaften zur Regulierung der Membranfluidität bei. Aufgrund ihrer spezifischen Funktionen weisen die unterschiedlichen Membranen auch unterschiedliche Zusammensetzungen auf. Untersuchungen des Cholesteringehalts in der Plasmamembran ergeben einen hohen Anteil von etwa 65-90 % (61). Intrazelluläre Membranen, die mit der Plasma-Membran über vesikulären Austausch in Kontakt stehen, haben mittlere Cholesterin-Level. Diese Membranen gehören zu den Endosomen, Lysosomen und dem trans-Golgi-Netzwerk. Die äußere mitochondriale Membran, das endoplasmatische Retikulum und das cis-Golgi-Netzwerk enthalten nur wenig Cholesterin (62). Die Cholesterin-Homöostase ist unabdingbar für die Viabilität von Zellen, wie sich beispielsweise bei Jurkat T-Zellen zeigt. Diese können einen bis etwa 50 % reduzierten Cholesteringehalt tolerieren. Bei

einer Behinderung des intrazellulären Cholesterintransports durch Senkung der Temperatur auf 0 °C sind die Zellen bereits bei einem Verlust von 35 % des zellulären Cholesterins nicht mehr lebensfähig (63).

Auch innerhalb der Zellmembran ist Cholesterin nicht gleichmäßig verteilt. Im Gegenteil existieren spezielle Domänen, die sich in der Zusammensetzung von der restlichen Membran unterscheiden. Diese Bereiche werden als Lipid Rafts bezeichnet und befinden sich sowohl in der Plasmamembran als auch in den Membranen von Zellorganellen wie dem Mitochondrium und Lysosomen. Sie sind in ihrem Aufbau dynamisch und durch einen hohen Gehalt an Cholesterin und Sphingolipiden charakterisiert (64). Substanzen wie M $\beta$ CD, die Cholesterin abbauen oder binden, stören die Funktion der Lipid Rafts (65, 66). Eines der in Lipid Rafts enthaltenen Sphingolipide ist GM1. Aufgrund der reduzierten GM1-Expression CLN7-defizienter Zellen wird vermutet, dass die Funktion von Lipid Rafts in diesen Zellen gestört ist (55). Lipid Rafts werden vielfältige Aufgaben insbesondere bei der Signaltransduktion, Endo- und Exozytose, Apoptose sowie Zelladhäsion und -migration zugeschrieben (67-69). Außerdem fungieren sie als Eintrittspforte für intrazelluläre Pathogene und spielen eine Rolle bei der Pathophysiologie zahlreicher Krankheiten, darunter Alzheimer Demenz, Morbus Parkinson und der systemische Lupus Erythematoses (70, 71).

### **1.5 Die Rolle von CLN7 bei immunologischen Vorgängen und das THP-1-Zellmodell**

Obwohl die genaue Funktion des CLN7-Proteins weiterhin nicht abschließend geklärt ist, gibt es einige Hinweise darauf, dass es eine wichtige Funktion beim Ablauf immunologischer Vorgänge hat. So besteht laut verschiedener Veröffentlichungen eine Interaktion zwischen CLN7 und HLA-DQA1 (72-74). HLA-DQA1 ist eines der Gene, das für die Untereinheit  $\alpha$  des HLA-DQ-Moleküls kodiert. HLA-DQ wiederum ist einer der Isotypen aus der Gruppe der MHC-Klasse-II-Moleküle und somit ein Rezeptor auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen, wie Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen (75). MHC-II-Moleküle präsentieren vor allem extrazelluläre Peptide an der Zelloberfläche, die zuvor in der Zelle durch das endosomal-lysosomale System verarbeitet wurden. Der Komplex aus MHC-II-Molekül

und Peptid kann dann von CD4<sup>+</sup>-Zellen erkannt werden und diese aktivieren (76). Innerhalb der Zellen werden die MHC-II-Moleküle über tubuläre lysosomale Netzwerke transportiert. Diese bilden eine Sonderform der Lysosomen, die vor allem in phagozytierenden und antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Monozyten zu finden ist. Sie lassen sich insbesondere durch die Differenzierung der Zellen mit Phorbolestern induzieren. Die Funktion der tubulären Lysosomen ist nicht abschließend aufgeklärt, wahrscheinlich spielen sie jedoch eine Rolle bei der Pinozytose und der Antigenpräsentation (77, 78). In laborinternen Arbeiten (Katharina Tschakert und Elena Heinl, AG Reichold, Universität Regensburg) wurde in tubulären Lysosomen CLN7-überexprimierender HEK239T-Zellen CLN7 nachgewiesen. Um den vermuteten Zusammenhang zwischen dem CLN7-Protein und den tubulären Lysosomen mittels eines weiteren Zellmodells zu überprüfen, eignen sich zum Beispiel THP-1-Zellen. Dabei handelt es sich um Zellen einer etablierten, spontan immortalisierten Zelllinie, die von Monozyten aus dem Blut eines einjährigen Kindes mit akuter myeloischer Leukämie abstammt (79). Durch Behandlung mit Phorbolestern können diese Vorläuferzellen zu makrophagenähnlichen Zellen differenziert werden, die auch als M0-Makrophagen bezeichnet werden. Diese naiven M0-Makrophagen können durch verschiedene Substanzen aktiviert werden und zwei verschiedene Phänotypen ausbilden (80). Aufgrund der Ähnlichkeit zu primären humanen Monozyten werden THP-1-Zellen in der Forschung vielfach als Modell für Funktion und Mechanismen des Monozyten-Makrophagen-Systems verwendet (81).

Weitere Proteine, die mit CLN7 interagieren sollen und eine Rolle in der Funktion des Immunsystems spielen, sind der Interleukin-7-Rezeptor und der *complement component 5a receptor 1* (72, 74). Laborinterne Versuche durch Karina Schüppler (AG Reichold, Universität Regensburg) mittels In-Situ-Hybridisierung auf verschiedene Organe der Maus haben des Weiteren eine hohe CLN7-Expression in primären und sekundären lymphatischen Organen ergeben. Dies stützt die These, dass CLN7 eine wichtige Rolle bei immunologischen Vorgängen spielen könnte.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der Forschungsarbeiten zu CLN7 ist es, durch ein besseres Verständnis der Funktion und pathophysiologischer Mechanismen potenzielle therapeutische Ansätze für CLN7-assoziierte Erkrankungen zu entwickeln. In dieser Dissertation wurden Untersuchungen zur Rolle von CLN7 bei immunologischen Prozessen, insbesondere der SARS-CoV-2-Infektion, sowie dem Cholesterinstoffwechsel durchgeführt.

Die Viruslast von HEK293T-Zellen nach SARS-CoV-2-Infektion steht in engem Zusammenhang mit der CLN7-Expression (55). Aufgrund der Rolle von ACE2 bei der Virusaufnahme (41) sollten die zelluläre Verteilung und Expressionsstärke von ACE2 im HEK293T-Zellmodell in Abhängigkeit der CLN7-Expression untersucht werden.

ACE2-Rezeptoren sind in Lipid Rafts lokalisiert, welche für die Aufnahme verschiedener pathogener Viren und Mikroorganismen wichtig sind (56, 70). Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen CLN7 und der Funktion von Lipid Rafts (55). Da Lipid Rafts sich durch einen besonders hohen Cholesterin-Gehalt auszeichnen (64), sollte die Verteilung und Menge von Cholesterin in HEK293T-Zellen in Abhängigkeit der CLN7-Expression analysiert werden.

Um außerdem die bereits vorhandenen Erkenntnisse zu CLN7 im HEK293T-Zellmodell zu festigen, sollte ein weiteres Zellmodell etabliert werden. Aufgrund der Hinweise auf eine wichtige Rolle des CLN7-Proteins für das Immunsystem wurden hierfür THP-1-Zellen verwendet. Diese humane Zelllinie stammt von Monozyten ab und wird in der immunologischen Forschung vielfach verwendet (81). Mittels RNA-Interferenz sollte ein transienter Knockdown von CLN7 in THP-1-Zellen durchgeführt werden.

Die THP-1-Zellen wurden des Weiteren mit einem CLN7-EGFP-Plasmid transfiziert, um durch die Fluoreszenz des erzeugten Fusionsproteins tubuläre Lysosomen sichtbar zu machen. Diese speziellen Lysosomen wurden bereits in verschiedenen Zelllinien des Monozyten-Makrophagen-Systems sowie in CLN7-überexprimierenden HEK293T-Zellen nachgewiesen (77).

Diese Versuche dienten dem Bestreben, weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen dem CLN7-Protein und dem Immunsystem zu erlangen. Ein

besseres Verständnis dieser Wechselwirkungen könnte ein Schritt auf dem Weg zu einem umfassenden Wissen um die Funktion des Proteins selbst, der Pathophysiologie der CLN7-Erkrankung und letztlich der Entwicklung therapeutischer Möglichkeiten sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
accu-jet pro Pipettierhelfer	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Axio Observer Z1	Carl Zeiss AG (DE)
BD Accuri C6 Durchflusszytometer	Becton, Dickinson and Company (US)
BD FACSCelesta Durchflusszytometer	Becton, Dickinson and Company (US)
VWR CT15RE Zentrifuge	VWR International GmbH (DE)
Hettich EBA 20 Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. K (DE)
FastGene FAS V Geldokumentationssystem	Nippon Genetics Europe GmbH (DE)
Inkubationsschrank C170	Binder GmbH (DE)
LightCycler 480 Instrument II (96-well)	F. Hoffmann-La Roche AG (CH)
Milli-Q-Anlage (Biocel A10)	Millipore (DE)
MSC Advantage Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
NanoDrop2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (DE)
Primovert Mikroskop	Carl Zeiss AG (DE)
T-Personal 48 Thermocycler	Biometra GmbH (DE)
Transferpette S (1 µl / 10 µl / 100 µL / 1000 µl)	Brand GmbH & Co. KG (DE)
Unipack 250	Biotech SL (ES)
Wasserbad WNE 29	Memmert GmbH & Co. KG (DE)
Xplorer elektronische Pipette	Eppendorf (DE)
Z300 Zentrifuge	Hermle Labortechnik GmbH (DE)

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Adhäsive Verschlussfolie, für Realtime-PCR	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
BD Microlance 3 Kanülen (27 G)	BD Biosciences (DE)
BioLite 6-well Multidish	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
BioLite Cell Culture Treated Dishes (35 mm/100mm)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Centrifuge tubes PP (15 ml/50 ml)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
Einwegspritzen (1 ml)	BD Biosciences (DE)
Filter tips (10 µl/100 µl/1250 µl)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
PCR Microcentrifuge tubes (0,2 ml/0,5 ml)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
PCR-Platte PP (96x0,2ml)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
Pipettenspitzen (10 µl/200 µl/1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG
Reagiergefäß (1,5 ml/2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipette PS (10 ml/25 ml/50 ml)	Nerbe plus GmbH & Co. KG (DE)
Zellkulturflaschen BioLite (25 cm <sup>2</sup> /75 cm <sup>2</sup> )	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)

### 2.1.3 Chemikalien, Substanzen und Lösungen

Produkt	Hersteller
FCS (Fetales Kälberserum)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Gibco 0,5% Trypsin-EDTA in DPBS (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Ham's F-12 Nutrient Mixture Bovines Fibronectin	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
MEM (Minimales essenzielles Medium) mit EarleSalzen und L-Glutamin	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Midori Green Xtra	Nippon Genetics Europe GmbH (DE)
M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) H-	Promega GmbH (US)
Mounting Medium Glycergel	Dako North America Inc (US)
Mouse anti rat CD68 Antikörper, Klon ED1	Bio-Rad Laboratories GmbH (DE)
Nuclease-free Water	Promega GmbH (US)
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Random Primers	Promega GmbH (US)
Rnase-Inhibitor (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor)	Promega GmbH (US)
RT-Puffer (Rerverse Transkription Puffer)	Promega GmbH (US)
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA (DE)
TAE (TRIS-Acetat-EDTA) – Puffer (50x)	AppliChem GmbH (DE)
Takyon No Rox SYBR MasterMix blue dTTP	Eurogentec (BE)

### 2.1.4 Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller
Accutase Cell Detachment Solution (1x)	Capricorn Scientific GmbH (DE)
Lipofectamine 3000	Thermo Fisher Scientific Inc. (US)
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (DE)

### 2.1.5 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Lösung	Inhaltsstoffe	Menge
Accutase-Lösung	Accutase Cell Detachment Solution (1x) DPBS 1x	10 ml 40 ml
Coating-Medium für Life Cell Imaging	Ham's F-12 Nutrient Mixture Bovines Fibronectin (1 mg/ml in H <sub>2</sub> O) Collagen (calf skin) (1 mg/ml in 0,1M AcOH) Bovines Serumalbumin (BSA) (7,5%) Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	97 ml 1 ml 1 ml 50 ml 1 ml
Decontamination Solution für BD Accuri™ C6	10-15% Natriumhydrochlorit Millipore Wasser	21 ml 479 ml

FACS Puffer	DPBS Fetales Kälberserum (FCS)	48 ml 2 ml
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) 1x pH = 7,4 (NaOH/HCl)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl Ad 1 l mit Aqua dest.	1,8 mM 10,3 mM 137 mM
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA (TAE) – Puffer (50x) Ethyldiamintetraacetat (EDTA) Ad 1 l mit Aqua dest	10 mM 1 mM
Zellkulturmedium HEK293T-Zellen für	DMEM mit Earle-Salzen und L-Glutamin Fetales Kälberserum (FCS) Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml)	500 ml 50 ml 5 ml
Zellkulturmedium für THP-1-Zellen	RPMI 1640 Fetales Kälberserum (FCS) Penicillin Streptomycin (10.000 U/ml)	500 ml 50 ml 5 ml

### 2.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Gewebe	Bezugsquelle
Human Embryonic Kidney (HEK)-293T-Zellen	Mensch	Niere	Monther Abu-Remaileh (Assistant Professor Stanford University)
CLN7 -/- 99-4 Human Embryonic Kidney (HEK)-293T-Zellen	Mensch	Niere	Monther Abu-Remaileh (Assistant Professor Stanford University)
CLN7 -/- 94-5 Human Embryonic Kidney (HEK)-293T-Zellen	Mensch	Niere	Monther Abu-Remaileh (Assistant Professor Stanford University)
THP-1-Zellen	Mensch	Blut	Prof. Dr. Barbara Schmidt (Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg)

### 2.1.7 Plasmide und DNA-Vektoren

Plasmid	Funktion	Bezugsquelle
PIRES AcGFP/CLN7	Überexpression von AcGFP und CLN7	Intern (Katharina Tschakert)
pEGFP-C1-CLN7	Überexpression des Fusionsproteins EGFP-CLN7	Dr. Vladimir Milenkovic (Universitätsklinikum Regensburg)
pGFP	Überexpression von GFP	Intern (Prof. Dr. rer. nat. Rainer Schreiber)
PIRES2-AcGFP1	Überexpression von AcGFP	Clontech Laboratories, Inc. (US), 632435

### 2.1.8 RNA-Vektoren

siRNA	Target-Gen	Bezugsquelle
siMFSD8	MFSD8	siTOOLs Biotech (DE)
Negativkontrolle	-	siTOOLs Biotech (DE)

### 2.1.9 Sequenzierungsprimer

Primer	Primersequenz	Annealingtemperatur
CLN7 sense	5' CACCTGGAAGCAGAGAATGG 3'	62 °C
CLN7 antisense	5' ACCCTACACTGCTGAGAAC 3'	61 °C
hGAPDH sense	5' CTGCACCACCAACTGCTTAG 3'	60 °C
hGAPDH antisense	5' CTTCCCCATGGTGTCTGAG 3'	60°C

### 2.1.10 Software

Name	Hersteller
BD Accuri C6 Software	Becton, Dickinson and Company (US)
BD FACSDiva Software	Becton, Dickinson and Company (US)
EndNote X7	Clarivate Analytics (UK)
Flow Jo	Becton, Dickinson and Company (US)
GIMP GNU Image Manipulation Program	The GIMP Team
GraphPad Prism	GraphPad Software (US)
Zen Lite 2011	Carl Zeiss AG (DE)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuche an HEK293T-Zellen

Die etablierte HEK293T-Zelllinie (*Human Embryonic Kidney Cells*) wird in der Forschung vielfach verwendet, da sie einfach zu kultivieren und zu transfizieren ist. Die ursprünglichen HEK-Zellen entstammten einem menschlichen Embryo. Ihre Herkunft wurde lange als renal angesehen, inzwischen wird jedoch angenommen, dass sie aus der embryonalen Nebennierenanlage stammen (82). Durch die Transfektion mit DNA-Bruchstücken des Adenovirus Typ 5 entstand die HEK293-Zelllinie (83). Die verwendete Variante HEK293T exprimiert zusätzlich das SV40-large-T-Antigen, welches die Replikation von Plasmiden mit dem entsprechenden SV40-Replikationsursprung erlaubt (84).

Durch vollständiges Ausschalten des CLN7-Gens mithilfe der CRISPR/CAS-Methode (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein*) durch Monther Abu-Remaileh (Stanford University) entstanden die beiden CLN7-defizienten HEK293T-Zelllinien knockout 94-5 und knockout 99-4 (CLN7 ko 94-5 und ko 99-4). Diese beiden Knockout-Zelllinien wurden durch Schneiden des CLN7-Gens an unterschiedlichen Stellen erschaffen. Die Verwendung von zwei verschiedenen Knockout-Zelllinien diente der Vermeidung verfälschter Ergebnisse durch Off-Target-Effekte. Die Knockout-Zellen wurden in den beschriebenen Versuchen HEK293T Wildtyp-Zellen (wt) gegenübergestellt.

### 2.2.1.1 Kultur und Passage

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Sämtliche Arbeiten wurden unter keimfreien Bedingungen an der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in T-25-Flaschen mit spezifischem Medium, welches alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Bei Erreichen einer Konfluenz über 90 % erfolgte die Passage. Dazu wurde nach dem Waschen der Zellen mit DPBS eine fünfminütige Inkubation mit Trypsin-EDTA bei 37 °C durchgeführt, um die adhärenten Zellen von der Oberfläche zu lösen. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Verdünnen mit Medium und der Abzentrifugierung (1.000 rpm, 3 Minuten) wurden die Zellen in neuem Medium auf die gewünschte Konzentration ausgesät.

### 2.2.1.2 ACE2-Antikörper-Färbung

Zur Untersuchung der ACE2-Rezeptor-Dichte an der Oberfläche verschiedener HEK293T-Zelllinien wurde eine Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten IgG-Antikörper durchgeführt. Der polyklonale Ziegen-Antikörper bindet spezifisch an humanes ACE2 und ist mit Allophycocyanin (APC) konjugiert. APC dient durch seine Fluoreszenz der Markierung spezifischer Biomoleküle, sodass Zellen gezielt mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchfluszytometrie untersucht werden können (85). Aufgrund der Photosensitivität des APCs erfolgten alle Arbeiten unter Lichtschutz.

#### 2.2.1.2.1 ACE2-Antikörper-Färbung zur Fluoreszenzmikroskopie

Die Färbung wurde einmalig an je einer Schale HEK293T wt und CLN7 ko 94-5 durchgeführt. Mindestens zwei Tage zuvor wurden die zu färbenden Zellen in Schalen mit 3 mm Durchmesser auf gecoateten Glasplättchen (ø 22mm, rund) ausgesät. Der

APC-gekoppelte ACE2-Rezeptor-Antikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt und ein Mastermix hergestellt. Auf jede der Schalen wurden 700 µl des so verdünnten Antikörpers gegeben. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde wurden der Antikörper wieder entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde je ein Tropfen vorgewärmtes Mounting-Medium auf einen Objektträger gegeben. Das Deckglas wurde dann mit den nach unten weisenden Zellen auf das Mounting-Medium gegeben. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben mindestens 20 Minuten bei 4°C gelagert, um eine Aushärtung des Mediums zu erreichen.

#### 2.2.1.2.2 ACE2-Antikörper-Färbung zur Durchflusszytometrie

Zur Ermittlung des Hintergrundsignals durch unspezifische Antikörperbindung wurde eine Isotypkontrolle genutzt. Isotypkontrollen sind Antikörper, die im Isotyp, der Wirtspezies und dem Fluoreszenzfarbstoff mit dem Primärantikörper übereinstimmen, jedoch gegen ein unspezifisches Antigen gerichtet sind. Durch ihre Verwendung kann das unspezifische Hintergrundsignal ermittelt und so die Spezifität des primären Antikörpers bestätigt werden. Die Kontrolle wurde mit einem ebenfalls APC-konjugierten IgG-Antikörper der Gattung Ziege vom gleichen Hersteller durchgeführt. An jedem Versuchstag wurden drei Schalen mit HEK293T Zellen des Wildtyps sowie CLN7 ko 99-4 und ko 94-5 verarbeitet und vermessen. Je eine Schale wurde mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt, die dritte enthielt ungefärbte Zellen, um eventuelle Unterschiede in der Autofluoreszenz zwischen den Zelllinien feststellen zu können. Die Messungen an wt- und CLN7 ko 94-5-Zellen fanden an neun verschiedenen Tagen statt, die an CLN7 ko 99-4-Zellen nur an sieben.

Für die Färbung wurden die kultivierten Zellen vorerst vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, indem sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur in 3 ml Accutase (1:5 in DPBS) inkubiert wurden. Nach der Zentrifugation (2.000 rpm, 3 Minuten) wurden die Zellen in 1 ml kaltem FACS-Puffer resuspendiert und ab diesem Zeitpunkt auf Eis gelagert, ausschließlich mit gekühlten Reagenzien in Kontakt gebracht und bei 4 °C zentrifugiert. An dieser Stelle erfolgte die Ermittlung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer. Die benötigte Menge der Zellsuspension für 800.000 Zellen wurde erneut zentrifugiert. Die Proben wurden nun in je 50 µl FACS-Puffer

aufgenommen und gefärbt. Zur ACE2- und Isotypkontroll-Gruppe wurden je 10 µl des jeweiligen Antikörpers, gelöst in 50 µl FACS-Puffer, hinzugegeben. Zur ungefärbten Kontrollgruppe wurden stattdessen 60 µl FACS-Puffer pipettiert. Bei Färbung mehrerer Proben erfolgte zuvor die Herstellung eines Master-Mix. Alle Proben wurden nun bei 4 °C lichtgeschützt 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte das Abzentrifugieren des Farbstoffs, ein Waschschritt mit 1 ml FACS-Puffer und die Resuspension mit 300 µl FACS-Puffer. Die Proben wurden bis zur Messung lichtgeschützt und auf Eis gelagert und schnellstmöglich vermessen.

### 2.2.1.3 Filipin-Färbung

Filipin ist der Überbegriff für vier isomere Makrolide, die aus einer Kultur von *Streptomyces filipinensis* isoliert wurden (86). Dabei ist das in der Forschung meist verwendete Filipin III das vorherrschende Isomer (87). Im weiteren Text wird der Name „Filipin“ synonym für dieses Isomer verwendet. Es bindet an freies, nicht aber an verestertes Cholesterin und verfügt über eine natürliche Fluoreszenz, mithilfe derer auf Cholesteringehalt und -verteilung in Zellmembranen geschlossen werden kann. Aufgrund seiner Interaktion mit der Membranstruktur kann es nicht an lebenden Zellen verwendet werden (88).

Die Färbungen erfolgten nach dem etablierten Protokoll von Kruth et al. (89). Der Filipin-Stock wurde gemäß Herstellerangaben hergestellt, indem Filipin in mit Stickstoff begastem DMSO gelöst und auf eine Konzentration von 5 mg/ml verdünnt wurde. Der Stock wurde kurz vor der Färbung mit DPBS auf die Arbeitskonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Die Färbungen wurden an den Zelllinien HEK293T CLN7 wt, ko 94-5 und ko 99-4 durchgeführt. Aufgrund der Photosensitivität des Filpins erfolgten alle Arbeiten unter Lichtschutz.

#### 2.2.1.3.1 Filipin-Färbung zur Fluoreszenzmikroskopie

Der Versuch wurde einmalig durchgeführt. Nach Entfernung des Mediums und zweifachem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1 ml Fixierlösung (1 % Formaldehyd in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von je 1 ml Glycin (3 % in PBS) für 10 Minuten, um verbliebenes Paraformaldehyd zu entfernen. In jede Schale wurden 700 µl des Filipin-Stocks (100 µg/ml) gegeben. Dann erfolgte die Inkubation für mindestens eine Stunde unter

Lichtschutz. Die Filipinlösung wurde im Anschluss entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde das Präparat wie in 2.2.1.2.1 beschrieben eingedeckelt.

#### 2.2.1.3.2 Filipin-Färbung zur Durchflusszytometrie

An diesem Experiment wurden zwei der Zelllinien, wt- und CLN7 ko 99-4, an acht verschiedenen Tagen und die CLN7 ko 94-5-Zelllinie an sieben Tagen vermessen. Pro Versuchstag wurde jeweils eine Probe der zu testenden Zelllinien gefärbt und mit einer ungefärbten Probe verglichen. Mindestens einen Tag vor der Färbung wurden die Zellen in Schalen mit 100 mm Durchmesser ausgesät. Nach dem Waschen mit 5 ml DPBS wurden die Zellen vom Schalenboden abgelöst, indem sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur in 3 ml Accutase (1:5 in DPBS) inkubiert wurden. Im Anschluss an die Zentrifugation bei 2.000 rpm für 3 Minuten wurde die Accutase entfernt und die Zellen in Medium resuspendiert. An dieser Stelle erfolgte die Zellzählung mittels der Neubauer-Zählkammer. Pro Zelllinie wurden dann 1,2 Millionen Zellen in je zwei Eppendorf-Cups überführt. Nach dem Abzentrifugieren des Mediums und einem Waschschritt wurden die Zellen in je 1 ml Paraformaldehyd (1 % in PBS) fixiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten Waschen wurde die Färbung mit Filipin begonnen. Dazu wurde jede zu färbende Probe in 500 µl des verdünnten Filipins (Arbeitskonzentration von 100 µg/ml) resuspendiert. Die Proben, die als Negativkontrolle nicht gefärbt werden sollten, wurden in der gleichen Menge DPBS aufgenommen. Die Inkubation für mindestens eine Stunde fand im Dunkeln statt. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis transportiert.

#### 2.2.1.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Zählung und Analyse von Zellen und anderen kleinen Partikeln in einer Suspension. Dabei werden die Zellen einzeln durch eine Kapillare geleitet, während sie von Laserstrahlen getroffen werden. Durch diese Laserstrahlen entsteht ein charakteristisches Streu- und Fluoreszenzlicht. Dieses wird von Sensoren erfasst und verarbeitet. So können Rückschlüsse auf Anzahl, Größe und Granularität der Partikel gezogen werden. Des Weiteren können spezifische intra- und extrazelluläre Strukturen durch fluoreszenzmarkierte Antikörper besetzt und so

quantifiziert werden. Alle Versuche erfolgten an HEK293T-Zellen der Zelllinien CLN7 wt, ko 94-5 und ko 99-4.

#### 2.2.1.4.1 Quantifizierung von ACE2-Rezeptoren

Zur quantitativen Ermittlung der ACE2-Rezeptoren wurde ein BD Accuri C6 mit der gleichnamigen Software verwendet. Zur Exzitation der Fluorophore wurde Licht der Wellenlänge 640 nm und der FL4-Filter (675/25 mm) verwendet. Bei jeder Messung wurden drei Schalen einer jeden Zellgruppe wie in 2.2.1.2.1 beschrieben gefärbt und vermessen. Von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Events aufgenommen. Zur Auswertung wurden die Fluoreszenz-Mediane der drei Proben einer Zellgruppe gemittelt.

#### 2.2.1.4.2 Quantifizierung von freiem Cholesterin

Die Versuche zur Quantifizierung von freiem Cholesterin wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Rüdiger Eder (Regensburger Centrum für Interventionelle Immunologie) am BD FACSCelesta Flow Cytometer der Firma BD mit der dazugehörigen FACSDiva-Software durchgeführt. Zur Anregung wurde ein Laser mit ultraviolettem Licht (UV, Wellenlänge 355 nm) verwendet. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie in 2.2.1.3.2 beschrieben. Vor der Vermessung wurde die Zellsuspension durch ein 35 µm Zellsieb gefiltert, um eine einheitliche Suspension zu erhalten. Von jeder Probe wurden mindestens 10.000 Events aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo. Zur Auswertung wurde der Median des Fluoreszenzsignals verwendet.

### 2.2.2 Versuche an THP-1-Zellen

Bei den verwendeten THP-1-Zellen handelt es sich um eine etablierte, spontan immortalisierte Zelllinie, die von Monozyten aus dem Blut eines einjährigen Kindes mit akuter myeloischer Leukämie abstammt (79). Durch Behandlung mit Phorbolestern können sie zu Makrophagen-ähnlichen Zellen differenziert werden, die auch als M0-Makrophagen bezeichnet werden. Diese naiven M0-Makrophagen können durch verschiedene Substanzen aktiviert werden und einen M1- oder M2-Phänotyp ausbilden (80). Aufgrund der Ähnlichkeit zu primären humanen Monozyten werden THP-1-Zellen in der Forschung vielfach als Modell für Funktion und Mechanismen des Monozyten-Makrophagen-Systems verwendet (81). An dieser Stelle wurden sie

aufgrund des vermuteten Zusammenhangs zwischen dem CLN7-Protein und dem Immunsystem verwendet.

#### *2.2.2.1 Kultur und Passage*

Die allgemeinen Bedingungen in der Zellkultur entsprechen den bereits für die HEK293T-Versuche beschriebenen (siehe 2.2.1.1). Die THP-1-Zellen wurden in T25- und T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Drei Mal wöchentlich wurde die Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt, einmal wöchentlich wurde zudem die Viabilität der Kultur durch Anfärbung abgestorbener Zellen mit Trypanblau (1:20 in DPBS) überprüft. Nach der Zählung wurde die Zellsuspension durch Zugabe frischen Mediums verdünnt, bis die Zielkonzentration von 300.000 bis 500.000 Zellen pro Milliliter erreicht war. Bei Erreichen des maximalen Füllungstands der Flaschen erfolgte die Passage durch Verwerfen eines Anteils der Zellsuspension und erneuter Verdünnung durch Zugabe von Medium bis zur gewünschten Zelldichte.

#### *2.2.2.2 Transfektion von CLN7*

Um für die späteren Transfektionen Hinweise auf die besten Transfektionsbedingungen zu erhalten, wurden Vorversuche mit dem GFP-Plasmid durchgeführt, da der Transfektionserfolg durch die Fluoreszenzmikroskopie unkompliziert zu überprüfen ist. Des Weiteren wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen CLN7-Vektoren transfiziert. Der acGFP-CLN7-pIRES-Vektor wurde bereits in Vorarbeiten von Katharina Tschakert (Universität Regensburg, AG Reichold) hergestellt und führt zur Koexpression des nichfusionierten CLN7-Wildtypproteins und des Markers AcGFP. Außerdem wurde ein von Dr. Vladimir Milenkovic (Universität Regensburg) erzeugtes EGFP-CLN7-C1-Plasmid verwendet, das die Überexpression einer EGFP-gekoppelte Variante von CLN7 verursacht

Da THP-1-Zellen schwer zu transfizieren sind, sollten möglichst viele verschiedene Bedingungen getestet werden. Diese sind der untenstehenden Tabelle 1 zu entnehmen. Die genaue Durchführung der Versuche wird im Folgenden näher beschrieben. Zur einfacheren Zuordnung werden die Versuche mit den in Tabelle 1 angegebenen Nummern bezeichnet.

Nr.	Methode	Vektor	Zellen	Anzahl Versuche	Anzahl Schalen
1	Lipofectamine3000	GFP	THP-1-Zellen	1	8
2	Lipfectamine3000 /Dreamfect	- acGFP-CLN7-pIRES - EGFP-CLN7-C1	Makrophagen	1	12
3	Elektroporation	GFP	THP-1-Zellen	1	6
4	Elektroporation	- acGFP-CLN7-pIRES - EGFP-CLN7-C1	THP-1-Zellen, im Anschluss teilweise Differenzierung	2	6

**Tabelle 1:** Transfektion verschiedener Plasmide in THP-1-Zellen und aus ihnen differenzierten Makrophagen

#### 2.2.2.2.1 Lipofektion

Mittels Lipofektion können zeitweilig ein oder mehrere Plasmide in Zellen eingebracht werden. Die Methode beruht auf der Anwendung von kationischen Lipiden. Diese bilden in wässrigen Lösungen Liposomen mit einer Lipid-Doppelschicht (90). Beim Zusammentreffen mit Nukleinsäuren, in diesem Fall Plasmid-DNA, entstehen sogenannte Lipoplexe. Diese werden vor allem über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Über noch nicht abschließend geklärte Mechanismen können die Lipoplexe die Endosomen verlassen und in das Zytosol übergehen. Um transkribiert zu werden, muss die DNA anschließend aus dem Zytosol in den Zellkern gelangen. Dies kann zum einen während der Auflösung der Kernmembran im Zuge der Zellteilung geschehen, zum anderen ist ein aktiver, energieabhängiger Transport in den Nucleus möglich. Ferner wird auch die Fusion von Lipoplex-gefüllten Endosomen mit der Kernmembran diskutiert (91).

Für die Anwendung der Methode mit dem GFP-Plasmid an THP-1-Zellen (Versuch Nr. 1) wurde das Lipofectamine3000-Kit der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (US) genutzt. Das Protokoll entsprach den Angaben des Herstellers und wurde um das von Tang et al. beschriebene Vorgehen ergänzt (92). Nach dem Zentrifugieren (1.000 rpm, 5 Minuten) der Zellsuspension wurde das alte Zellkulturmedium entfernt. Die Zellen

wurden in neuem Medium resuspendiert und je 500.00 Zellen in ein Eppendorf Cup (1,5 ml, konische Form) mit 500 µl Medium gegeben. Während der 3-stündigen Inkubation konnten sich Zellaggregate am Boden des Cups bilden. Zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurden unterschiedliche Zellzahlen und bei der Herstellung der Lipofektionsreagenzen unterschiedliche Konzentrationen getestet. Die genauen Mengen der einzelnen Reagenzen sind der untenstehenden Tabelle 2 zu entnehmen. Es wurden zwei Ansätze pipettiert: OptiMEM und Lipofectamine3000 (Ansatz 1) bzw OptiMEM, und P3000 (Ansatz 2). Nach dem Vermischen beider Ansätze und der zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 50 µl des Reaktionsansatzes auf die Zellen gegeben. Nach etwa 36-stündiger Inkubation im Inkubator erfolgte die Überprüfung des Transfektionserfolges mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Cup Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	
Zellzahl	$1 \times 10^5$				$5 \times 10^5$				
OptiMEM (Ansatz 1) [µl]	100								
Lipofectamine 3000 [µl]	0,75	1,5	0,75	1,5					
OptiMEM (Ansatz 2) [µl]	100								
GFP-Plasmid [µg]	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1	
P3000 [µl]	1	2	1	2	1	2	1	2	

**Tabelle 2: Tranfektionsbedingungen GFP-Plasmid/Lipofectamine3000 in THP-1-Zellen**

Für Versuch Nr. 2 sollten THP-1-Zellen nach ihrer Differenzierung zu Makrophagen transfiziert werden. Dafür wurden je 1.000.000 THP-1-Zellen in 6-Well-Platten auf gecoateten Glasplättchen ( $\varnothing$  22 mm, rund) in 2 ml Zellkultur-Medium je Well ausgesät. Anschließend erfolgte die Differenzierung durch Hinzugabe von 10 ng/ml Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 Stunden. Im Anschluss wurden die Zellen mit den acGFP-CLN7-pIRES- und EGFP-CLN7-C1-Plasmiden transfiziert. Es wurden jeweils zwei Schalen mit dem acGFP-CLN7-pIRES-Vektor bzw. dem EGFP-CLN7-C1-Plasmid transfiziert. Zwei weitere Schalen wurden kotransfiziert

Die Transfektion wurde mit dem Lipofectamine3000-Kit und DreamFect durchgeführt. Die verwendeten Mengen der einzelnen Reagenzen und Vektoren sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Zellen wurden vor der Transfektion mit PBS gewaschen und zur

Optimierung der Transfektionseffizienz in serumfreiem Medium inkubiert. Der weitere Ablauf der Transfektion mit Lipofectamine3000 erfolgte wie zuvor beschrieben.

<b>Zellzahl</b>	1x10 <sup>6</sup>
<b>OptiMEM (Ansatz 1) [µl]</b>	125
<b>Lipofectamine 3000 [µl]</b>	3,75
<b>OptiMEM (Ansatz 2) [µl]</b>	125
<b>acGFP-CLN7-pIRES-Plasmid [µg]</b>	2
<b>EGFP-CLN7-C1-Plasmid [µg]</b>	0,5
<b>P3000 [µl]</b>	<i>Doppelte Menge der jeweiligen Plasmide</i>

**Tabelle 3:** Transfektionsbedingungen acGFP-CLN7-pIRES- und EGFP-CLN7-C1-Plasmide/Lipofectamine3000 in aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagen

Des Weiteren wurde die Transfektion auch mit dem Lipofektionsreagenz DreamFect versucht. Nach Angaben des Herstellers wurden DreamFect und OptiMEM zu einem ersten Ansatz pipettiert, die jeweiligen Plasmide und OptiMEM zu einem zweiten. Die genauen Mengen sind in Tabelle 4 angegeben. Die beiden Ansätze wurden anschließend vermischt und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben.

<b>Zellzahl</b>	1x10 <sup>6</sup>
<b>OptiMEM (Ansatz 1) [µl]</b>	100
<b>DreamFect [µl]</b>	6
<b>OptiMEM (Ansatz 2) [µl]</b>	100
<b>acGFP-CLN7-pIRES-Plasmid [µg]</b>	2
<b>EGFP-CLN7-C1-Plasmid [µg]</b>	0,5

**Tabelle 4:** Transfektionsbedingungen acGFP-CLN7-pIRES- und EGFP-CLN7-C1-Plasmide/Dreamfect in aus THP-1-Zellen differenzierten M0-Makrophagen

Das Zellkulturmedium wurde etwa 4 Stunden später mit FCS auf eine Zielkonzentration von 10 % ergänzt. Die Untersuchung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach weiteren 44 Stunden im Inkubationsschrank.

#### 2.2.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation ist ebenfalls eine transiente Transfektionsmethode. Durch ein externes elektrisches Feld kann das Membranpotenzial von Zellen beeinflusst werden.

Dieses legt man meist in Form eines kurzen Impulses an, sodass die Permeabilität der Membran kurzzeitig erhöht wird. So können exogene Moleküle, in diesem Fall Plasmid-DNA, in die Zelle gelangen. Bei optimalen Bedingungen ist nicht nur der Eintritt von Substanzen in das Zellinnere möglich, sondern auch eine darauffolgende Erholung und das Überleben der Zelle (93).

Die Elektroporation wurde gemäß der Anleitung des Herstellers mittels des Neon Transfection System durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde das Neon Transfection Tube in die Pipettenstation gesteckt und mit 3 ml E-Buffer gefüllt. Nach der Abzentrifugation des Zellkulturmediums (5 Minuten, 1.000 rpm) wurden die Zellen drei Mal mit DPBS gewaschen, anschließend gezählt und mit dem Neon Resuspension Buffer auf eine Zielkonzentration von 200.000 Zellen/ $\mu$ l verdünnt. Je Schale wurden dann 10  $\mu$ l der Zellsuspension mit der entsprechenden Menge Plasmid versetzt. Im Vorversuch (Versuch Nr. 3) mit dem GFP-Plasmid wurden zwei verschiedene Plasmidmengen (1 und 3  $\mu$ g) getestet, dabei wurden mit jeder der beiden Konzentrationen drei Schalen transfiziert. Zur Transfektion der beiden CLN7-Vektoren (Versuch Nr. 4) wurde jeweils 1  $\mu$ g Plasmid verwendet. Dabei wurden jeweils zwei Schalen mit dem acGFP-CLN7-pIRES-Vektor bzw. mit dem EGFP-CLN7-C1-Plasmid transfiziert sowie zwei weitere Schalen kotransfiziert. Im Anschluss wurde die Suspension mit der Neon Pipette und einer 10  $\mu$ l Neon Pipettenspitze luftblasenfrei aufgenommen und mit der Pipettenstation konnektiert. Dann erfolgte die Elektroporation mit den folgenden Parametern: Spannung: 1700 V, Impulsdauer: 20 ms, Anzahl: 1. Die Suspension wurde in vorbereitete Schalen mit antibiotikafreiem Medium gegeben und bis zum Live-Cell-Imaging inkubiert. Jede Pipettenspitze wurde für maximal zwei Transfektionen verwendet. Bei Wechsel des zu transfizierenden Plasmids wurden der Elektroporationsbuffer und die Pipettenspitze ausgetauscht.

Nach der Transfektion der beiden CLN7-Vektoren wurde die Hälfte der Zellen wie in 2.2.2.1 beschrieben zu Makrophagen differenziert, um eventuelle Unterschiede in der Transfektionseffizienz durch die Differenzierung feststellen zu können. Alle Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 2.2.2.3 CLN7-Knockdown durch RNA-Interferenz an THP-1-Zellen

Die RNA-Interferenz ist ein biologischer Prozess, bei dem kurze RNA-Moleküle verwendet werden, um die Expression bestimmter Gene zu hemmen. Die Proteintranslation einer Ziel-mRNA (*messenger ribonucleic acid*) wird durch Eintritt der entsprechenden doppelstängigen RNA (dsRNA) in die Zelle ausgeschaltet. Die dsDNA wird durch das sogenannte Dicer-Enzym zu kleineren doppelsträngigen Abschnitten namens *small interfering RNA* (siRNA) gespalten (94). Die siRNA wird im Anschluss in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut. Dieser befindet sich zu diesem Zeitpunkt in seiner Vorläufer-Form (pre-RISC). Im Anschluss werden die RNA-Stränge entwunden, gespalten und nur der Leitstrang verbleibt im Komplex. Dessen Auswahl erfolgt gemäß der thermodynamischen Stabilität der beiden Einzelstränge (95). Diese Schritte markieren den Übergang in die aktive Form des RISCs (holo-RISC). Dann wird eine zum Leitstrang komplementäre mRNA in den RISC integriert und durch die katalytische Untereinheit Argonaute2 blockiert oder gespalten (96, 97).

Die RNA-Interferenz kann genutzt werden, um im Rahmen eines Gen-Knockdowns durch die Einführung von siRNA in die Zelle gezielt die Translation spezifischer Gene zu verhindern. So kann die Funktion dieser Gene genauer untersucht werden. Zur zielgerichteten Ausschaltung des CLN7-Gens erfolgte die Transfektion mit siRNA Pools der Firma siTOOLs Biotech. Die siRNA Pools bestehen aus 30 verschiedenen siRNAs mit demselben Zielgen, um so durch die unterschiedlichen Sequenzen und die geringere benötigte Konzentration der einzelnen siRNAs unspezifische Effekte auf andere Gene zu minimieren. Als Kontrolle wurde eine vom Hersteller designete Negativkontrolle in Form einer siRNA ohne Ähnlichkeit zu einer menschlichen DNA-Sequenz verwendet. Außerdem wurden bei jeder Transfektionen unbehandelte Zellen zum Vergleich herangezogen.

Um für die späteren Versuche optimale Bedingungen zu ermöglichen, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Dabei variierten zum Beispiel die Transfektionsmethode und Menge der eingesetzten siRNA. In einem der Versuche wurde außerdem ein Effekt auf die CLN7-mRNA-Expression durch das verwendete Reagenz durch eine Mock-Transfektion ohne siRNA ausgeschlossen. Aufgrund der niedrigen Effizienz der Transfektionen wurde außerdem eine Mehrfachtransfektion

versucht. Dazu wurden die Zellen 48 und 96 Stunden nach der ersten Transfektion erneut wie beschrieben transfiziert. Teilweise wurden in einem Versuch mehrere verschiedene Bedingungen parallel getestet. Insgesamt wurden sechs Experimente mit unterschiedlichem Versuchsaufbau durchgeführt. Die genauen Transfektionsbedingungen sind der untenstehenden Tabelle 5 zu entnehmen. Die Versuche wurden für jede der Gruppen in Triplets durchgeführt.

Nr.	Methode	Zellzahl		siPool [nM]			Dream-Fect [ $\mu$ l]	Mock-Kontrolle	Anzahl Transfektionen
I	Elektroporation	$1 \times 10^5$		$50$			-	Nein	1
II	Lipofektion	$5 \times 10^5$			50		4	8	Nein
III		50					4	Ja	1
IV		30					4	Nein	1
V		40					4	Nein	1
VI		40					4	Nein	3

**Tabelle 5:** Transfektionsbedingungen siRNA gegen CLN7 in THP-1-Zellen

Der Ablauf der Elektroporation entspricht dem in 2.2.2.2.2 beschriebenen Vorgehen. Der Versuch wurde auf einer 24-Well-Platte durchgeführt. Für jede der Kombinationen aus Zellzahl und eingesetzter siRNA-Menge wurden zwei Wells mit gegen CLN7 gerichteter siRNA und eines mit der Negativkontrolle transfiziert.

Bei der Lipofektion erfolgte nach der Entfernung des Zellkulturmediums durch Zentrifugation die Zellzählung und die Viabilitätsüberprüfung mit der Trypanblau-Färbung (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Die Zellen wurden in 700  $\mu$ l serumfreiem Zellkulturmedium in jedes Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Je Transfektion wurden nun zwei Ansätze vorbereitet: 75  $\mu$ l Opti-MEM und die Tabelle 5 entsprechende Menge eines 1,5  $\mu$ M Stocks des jeweiligen siPools (Ansatz 1) sowie 75  $\mu$ l Opti-MEM und die jeweilige Menge DreamFect (Ansatz 2). Die Ansätze wurden nun vermischt und 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei mehreren Transfektionen wurde ein Master-Mix verwendet. Auf jedes Well wurden 100  $\mu$ l des Reaktionsgemischs gegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurde die Zellsuspension je Well durch

100 µl FCS und 200 µl des vor dem Aussäen entfernten Mediums ergänzt, um die Zellproliferation anzuregen.

#### 2.2.2.4 Quantifizierung der CLN7-Expression mittels qRT-PCR

Um die CLN7-mRNA im Anschluss an die Behandlung mit der siRNA zu quantifizieren, wurde die Methode der qRT-PCR (Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription) genutzt. Nach der Zelllyse und der Isolation der mRNA erfolgte die Transkription in cDNA. Diese wurde mit der qPCR amplifiziert und durch den Farbstoff SYBR Green I nachgewiesen. Die relative Menge der cDNA wurde mithilfe der Normierung auf das ebenfalls amplifizierte Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt.

##### 2.2.2.4.1 mRNA-Isolation

Zwei Tage nach der letzten siRNA-Transfektion erfolgte die Lyse der THP-1-Zellen und die anschließende Präparation der enthaltenen mRNA mithilfe des NucleoSpin RNA Kits der Macherey-Nagel GmbH & Co. KG. Das Kit nutzt die Silika-Membran-Methode. Das im Folgenden beschriebene Vorgehen entspricht den Angaben des Herstellers.

Die Zellsuspension aus jedem einzelnen Well wurde in Eppendorf-Cups überführt und 5 Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle weiteren Zentrifugationsschritte für 30 Sekunden bei 11.000 g durchgeführt. Nach Abschütteln des Überstandes wurden die Cups auf Eis gelagert und lysiert, indem pro Cup 350 µl Lysis-Buffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben wurden. Bei mehreren Proben wurde zuerst ein Mastermix hergestellt. Der Lysis-Buffer lysiert die Zellemembran, optimiert die Bindung der RNA an die Silika-Membran und ist in Verbindung mit β-Mercaptoethanol für die Degradation von RNasen zuständig. Bei hohen Zellzahlen ( $> 1 \times 10^6$  Zellen) erfolgte die Homogenisierung der Suspension durch eine Spritze mit einer 20-Gauge-Kanüle, um größere Partikel besser zu zerkleinern. Die NucleoSpin Filter wurden auf den Sammelrörchen platziert und das Lysat hineingegeben. Nach der Zentrifugation für eine Minute wurde der NucleoSpin Filter verworfen, 350 µl Ethanol (70 %) zum Lysat gegeben und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Im Anschluss wurden die NucleoSpin RNA Columns auf neue Collection Tubes gesetzt und die Suspension hinzugegeben, um die Bindung der

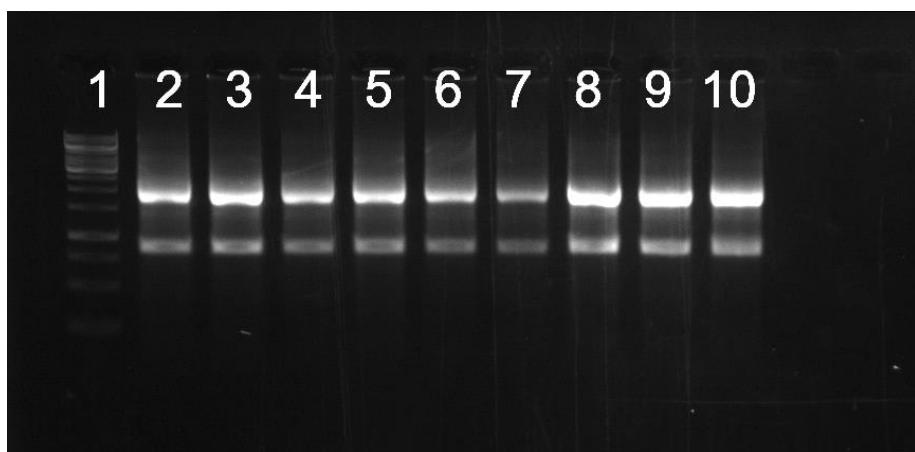
mRNA an die RNA Column zu bewirken. Nach der Zentrifugation wurde die RNA-Säule in ein neues Collection Tube platziert und 350 µl Membrane Desalting Buffer hinzugegeben. Dieser sorgt durch die Entfernung von Salzen für eine bessere Wirksamkeit der rDNase. Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen wurden pro Ansatz 10 µl rDNase und 90 µl rDNase-Reaction Buffer vermischt und 95 µl des so entstandenen Gemischs auf die Säulen gegeben. Die Reaktion fand während einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss wurde die rDNase durch Zugabe von 200 µl Buffer RAW2 deaktiviert. Nach der erneuten Zentrifugation und Platzierung der Säule in einem neuen Sammelrörchen wurden zum Waschen 600 µl Buffer RA3 hinzugegeben. Die Probe wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dann erfolgte der letzte Waschschritt durch Zugabe von 250 µl Buffer RA3. Um die Membran vollständig zu trocknen, wurden die Proben jetzt 2 Minuten lang zentrifugiert. Zur Elution der isolierten mRNA wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen in neuen Sammelrörchen gegeben und eine Minute lang zentrifugiert. Um höhere mRNA-Konzentrationen zu erreichen, wurde das Eluat im Anschluss noch einmal auf die Säule aufgetragen und erneut zentrifugiert. Konzentration und Absorptionsmaxima der Proben wurden mithilfe des NanoDrop 2000c bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### 2.2.2.4.2 Gelelektrophorese des mRNA-Isolats

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, das verwendet wird, um biologische Makromoleküle wie DNA, RNA und Proteine zu trennen und zu analysieren. Dazu wird eine gelartige Substanz verwendet, in die die Makromoleküle eingebettet werden. Anschließend wird ein elektrischer Strom durch das Gel geleitet, wodurch die Makromoleküle aufgrund ihrer elektrischen Ladung und Größe in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel migrieren. Die aufgetrennten Moleküle können mittels spezieller Farbstoffe visualisiert werden, um ihre Größe und Menge zu analysieren.

Um eine Degeneration der RNA auszuschließen, wurde das Produkt der RNA-Isolation gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist beispielhaft in Abbildung 1 dargestellt. Für die Auftrennung wurde ein einprozentiges Agarosegel aus 50 ml Tris-Aacetat-EDTA-Puffer, 0,5 g Agarose und 3 µl MidoriGreen Xtra verwendet. Nach der Aushärtung wurde das Gel in einer Laufkammer mit TAE-Puffer

bedeckt. Je 1 µl des RNA-Produkts wurden mit der gleichen Menge RNA-Gel-Ladefarbstoff (2x) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard fungierten 2 µl eines 1 kb (Kilobase) Längenstandards. Dann wurde für 10 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt. Im Anschluss konnten bei intakter RNA eine 18S- und eine 28S-Bande identifiziert werden. Letztere sollte dabei eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität aufweisen. Für die Dokumentation wurde das Geldokumentationssystem FastGene FAS verwendet.



**Abbildung 1: Gelelektrophorese des RNA-Isolats von 48 h zuvor mit siRNA transfizierten THP-1-Zellen 1**

1 kb Längenstandard; 2-3: Transfektion mit siRNA gegen CLN7; 4-6: Transfektion mit unspezifischer siRNA; 5-10: unbehandelte Zellen

#### 2.2.2.4.3 cDNA-Synthese

Die isolierte mRNA wurde mithilfe der Methode der reversen Transkription in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben. Hierfür wurden Produkte des Herstellers Promega verwendet. Das folgende Vorgehen entspricht den Angaben des Herstellers.

Zunächst wurden je Probe 1 µg RNA, 1 µg Random Primer und PCR-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 15 µl pipettiert. Der Ansatz wurde im Cycler 5 Minuten lang auf 70 °C erhitzt, das anschließende Abkühlen auf 4 °C begünstigt die Anlagerung der Random Primer. Als Nächstes wurden zu dem Ansatz 5 µl Reaction Buffer 5x, 1,25 µl dNTPs 10 mM, 1 µl RNase-Inhibitor und 3,75 µl PCR-Wasser hinzugegeben. Diese Schritte dienen der Vorbereitung auf die eigentliche Transkriptase-Reaktion: Der Reaction Puffer schafft optimale Bedingungen für die Enzymaktivität, der RNase-Inhibitor inaktiviert eventuell vorhandene RNasen und die dNTPs bilden die Grundlage der zu synthetisierenden cDNA. An dieser Stelle wurde der Ansatz aufgeteilt: 6 µl

wurden als Kontrolle auf Kontamination mit genomischer DNA ohne reverse Transkriptase (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase/M-MLV-RT*) entnommen, die restlichen 20 µl wurden mit 1 µl reverser Transkriptase versetzt. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte dann im Cycler nach Tabelle 6:

Temperatur	Dauer
Raumtemperatur	10 Minuten
50 °C	50 Minuten
70 °C	15 Minuten
4 °C	konstant

**Tabelle 6: Ablauf Polymerase-Ketten-Reaktion zur cDNA-Synthese**

Zur späteren relativen Quantifizierung mittels einer Standard-Kurve wurde ein Standard hergestellt, indem aus den reserve-Transkriptase-positiven Ansätzen jeweils gleiche Mengen entnommen und vermischt wurden. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe analog Tabelle 7 angelegt.

Verdünnung	Ausgangslösung	PCR-H <sub>2</sub> O [µl]
1:5	2 µl unverdünnter Standard	8
1:25	2 µl 1:5 verdünnter Standard	8
1:50	1 µl 1:5 verdünnter Standard	9
1:125	2 µl 1:25 verdünnter Standard	8

**Tabelle 7: Standard-Verdünnungsreihe bei 2 µl Entnahme je Probe**

#### 2.2.2.4.4 Quantitative PCR

Mittels der quantitativen PCR wurde die gewonnene cDNA quantifiziert. Dazu wurde ein spezifisches Primerpaar für das humane CLN7-Gen verwendet. Die Normalisierung der Expression des Zielgens erfolgte durch das konstitutiv exprimierte Housekeeping Gen GAPDH. Für die DNA-Quantifizierung wurde Takyon No Rox SYBR MasterMix dTTP Blue des Unternehmens Eurogentec entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. In diesem Master Mix sind neben dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I auch ein Puffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs und eine Hotstart-DNA-Polymerase enthalten. Es wurde ein Master Mix nach dem Pipettierschema in Tabelle 8 hergestellt:

Lösung	Volumen [µl] pro Ansatz
Takyon No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue	5,0
Sense-Primer 10 µM	0,5
Antisense-Primer 10 µM	0,5
PCR-H2O	3,5

**Tabelle 8:** Pipettierschema für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Je 9 µl des Mastermix' wurden auf eine 96-well-Microtiter-Platte aufgetragen und anschließend je 1 µl des jeweiligen Templates hinzugegeben. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 2.500 g konnte die Reaktion im LightCycler 480 Instrument II (96-well) der Firma Hoffmann-La Roche AG durchgeführt werden. Die Hotstart-Polymerase wurde durch dreiminütiges Inkubieren bei 95 °C aktiviert. Im Anschluss folgte in 40 Zyklen die Amplifikation der cDNA: Die Messung der Fluoreszenz fand in jedem Zyklus am Ende der Elongation statt.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	95	15
Annealing	57	20
Elongation	72	20

**Tabelle 9:** Programm der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion

#### 2.2.2.4.5 Kontrolle der reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Um Verunreinigungen der Ansätze mit DNA auszuschließen, wurden verschiedene Negativkontrollen verwendet. In den Ansätzen ohne hinzugefügte reverse Transkriptase sollte keine cDNA-gebildet werden. In diesen Proben konnte keine DNA vorliegen, es sei denn, es lag eine Verunreinigung vor. Um wiederum eine Kontamination der Negativkontrolle auszuschließen, wurde die Messung außerdem mit gereinigtem Wasser durchgeführt.

Die Schmelzkurvenanalyse verifiziert, dass keine unspezifischen DNA-Amplikons vorliegen. Dazu wurde das PCR-Produkt nach der RT-PCR langsam von 56 °C auf 95 °C erwärmt und das Fluoreszenzsignal dabei kontinuierlich gemessen. So kann durch den Anstieg und das spätere Abfallen des Signals der Übergang zwischen doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden. Im Anschluss kann die Kurve der Änderungsrate der Fluoreszenz in Bezug auf die Temperatur analysiert

werden: Liegt lediglich ein Peak (Höhepunkt der Kurve) vor, ist eine Verunreinigung durch unspezifische Produkte unwahrscheinlich, es sei denn, diese haben eine ähnliche Größe.

#### 2.2.2.4.6 Auswertung - relative Quantifizierung

Die Ergebnisse wurden mit der Methode der relativen Quantifizierung berechnet. Dabei wurde die Expression des CLN7-Gens relativ zu der des Housekeeping-Gens GAPDH bestimmt. Die Transkription eines solchen ubiquitär und homogen exprimierten Gens unterliegt keinen Regulationsmechanismen, sodass es als endogene Kontrolle dienen kann. Fehler bei der RT-PCR, variierende Zellzahlen und andere Ursachen verfälschter Ergebnisse können so ausgeglichen werden. In der Praxis wird normalerweise keine optimale Effizienz ( $E$ ) der Reaktion erreicht, zudem können die Effizienzen des Ziel- und des Housekeeping-Gens unterschiedlich sein. Aus diesem Grund wurde ein Effizienz-korrigiertes relatives Quantifizierungsmodell verwendet. Zur Berechnung der Effizienz diente die Verdünnungsreihe. Aus den  $C_t$ -Werten der Verdünnungsreihe wurde eine Regressionsgerade gebildet, deren Steigung  $m$  die Berechnung der Effizienz nach folgender Formel zugrunde liegt:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Mithilfe der Effizienzen und  $C_t$ -Werte des Ziel- und Referenzgens konnte im Anschluss die relative Expression der jeweiligen Gene berechnet werden:

$$\text{Relative Expression} = \frac{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_t_{\text{Referenzgen}}}}{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_t_{\text{Zielgen}}}}$$

Der erhaltene Wert konnte mit anderen Werten verglichen werden, am zuverlässigsten ist der Vergleich zwischen Werten des gleichen PCR-Laufs.

#### 2.2.2.4.7 Gelelektrophorese der cDNA

Ebenso wie das RNA-Isolat wurde auch die mittels reverser Transkription synthetisierte cDNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. An dieser Stelle wurde ein dreiprozentiges Argarosegel, bestehend aus 50 ml TAE-Puffer und 1,5 g Agarose verwendet. Außerdem wurde ein 50 bp (Basenpaar) Längenstandard verwendet. Das weitere Vorgehen entspricht dem in 2.2.2.4.2. beschriebenen Ablauf. Hier sollte, sofern

keine unspezifischen DNA-Fragmente durch Verunreinigungen vorliegen, lediglich eine einzelne Bande zu sehen sein.

### 2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung verschiedener Zelllinien wurde ein inverses Mikroskop des Herstellers Zeiss verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit dem 40x-Objektiv in Ölimmersion. Neben der Durchlichtmikroskopie wurde Licht verschiedener Wellenlängen verwendet: 335-383 nm (DAPI, Zellkerne), 450-490 nm (GFP) und 625-655 nm (Cy5). Bei adhärenten Zellen wurde vor der Mikroskopie das Zellkulturmedium entfernt, das zellbewachsene Glasplättchen in die Live-Cell-Kammer eingespannt und mit Leibovitz's L-15-Gibco bedeckt. Die nicht adhärenten Zellen wurden in der Suspension aus Zellkulturmedium in die vorbereitete Einheit aus Live-Cell-Kammer und einem sauberen Glasplättchen gegeben und im Anschluss untersucht.

#### 2.2.3.1 Darstellung der Zellkerne durch bisBenzimide Hoechst 33258

Zur erleichterten Identifizierung einzelner Zellen in Übersichtsaufnahmen bei der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellkerne vor der Analyse mittels bisBenzimide Hoechst 33258 gefärbt. Dazu wurde die benötigte Menge für eine Zielkonzentration von 1:200 zu den Zellen gegeben und diese anschließend für 30 Minuten inkubiert.

### 2.2.4 Auswertung

#### 2.2.4.1 Statistische Auswertung

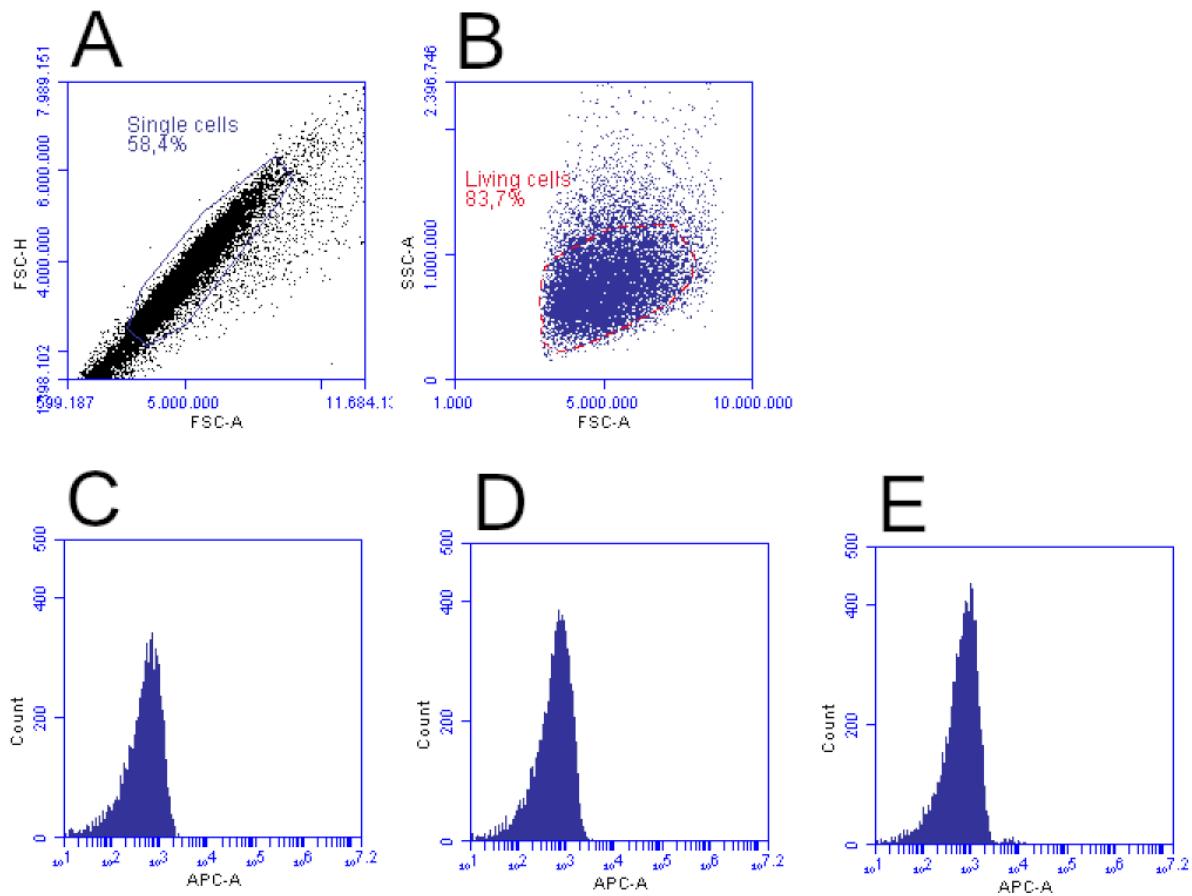
Zur statistischen Auswertung wurden t-Tests für unabhängige Stichproben sowie einfaktorielle Varianzanalysen (*analysis of variance*, ANOVA) genutzt. Die Messwerte wurden bei Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mittels des D'Agostino-Pearson-Tests (omnibus K2) auf Normalverteilung überprüft. Für die Auswertung mit einem t-Test wurde die Normalverteilung nicht überprüft, da dieser gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme als weitgehend robust gilt (98). Zur Testung der Varianzhomogenität wurde der Brown-Forsythe-Test verwendet. Bei nicht gegebener Varianzhomogenität wurde der t-Test um die Welch-Korrektur ergänzt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) wurde mit einem Stern (\*) gekennzeichnet, nichtsignifikante Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ) mit „ns“.

#### 2.2.4.2 Auswertung Durchflusszytometrie-Messungen

Das Gating stellt einen zentralen Schritt bei der Analyse von durchflusszytometrischen Daten dar. Dabei werden die Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker selektiert, um gezielte Aussagen über bestimmte Zellpopulationen zu ermöglichen und gleichzeitig unerwünschte Ereignisse, wie beispielsweise tote Zellen oder Zellaggregate, zu eliminieren. Dieser Vorgang erfolgte im Anschluss an die in den Abschnitten 2.2.1.2.1 und 2.2.1.4.1 (Quantifizierung von ACE2-Rezeptoren) sowie 2.2.1.3.2 und 2.2.1.4.2 (Quantifizierung von freiem Cholesterin) beschriebene Färbung und Messung der HEK293T CLN7 wt- und CLN7 ko-Zellen.

Das folgende Vorgehen beschreibt die Auswertung der ACE2-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie. Aufgrund der durchflusszytometrisch zwar detektierbaren, aber schwachen Fluoreszenzintensität in den Vorversuchen wurde zur genaueren Differenzierung eine Negativkontrolle mittels eines Isotypkontroll-Antikörpers durchgeführt. Die Quantifizierung der ACE2-Rezeptoren erfolgte mithilfe des BD Accuri C6 und der entsprechenden BD Accuri C6 Software. Um Zellaggregate, auch als Doublets bezeichnet, zu entfernen, wurde FSC-H gegen FSC-A aufgetragen und ein Gate um die Einzelzellen gelegt (siehe Abbildung 2A). Danach erfolgte, wie in Abbildung 2B gezeigt, die Darstellung von SSC-A gegen FSC-A, um tote Zellen und Zelltrümmer zu identifizieren und auszuschließen. Innerhalb dieser Zellpopulation wurde abschließend das Fluoreszenzsignal des APC-Fluorochroms in Form eines Histogramms visualisiert. Um eventuelle Unterschiede der Autofluoreszenz zwischen den verschiedenen Zelllinien aufzudecken, wurden zudem bei jedem Versuch auch ungefärbte Proben vermessen (siehe Abbildung 2C). Abbildung 2D zeigt beispielhaft das Signal der mit der Isotypkontrolle gefärbten Zellen, während Abbildung 2E das Signal der mit dem ACE2-Antikörper behandelten Zellen präsentiert.

In der weiteren Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrolle von jener der mit dem ACE2-Rezeptor-Antikörper gefärbten Zellen abgezogen, um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu eliminieren. Im letzten Schritt wurden die Werte der beiden CLN7-Knockoutzelllinien zu denen des Wildtyps in Relation gesetzt.



**Abbildung 2: Gatingstrategie der ACE2-Messungen am BD Accuri C6**

(A) Ausschluss der Doubletten durch Auftragen eines FSC-H/ FSC-A-Plots. (B) Ausschluss nichtvitaler Zellen im SSC-A/FSC-A-Plot. Auftragen der APC-Signale in Form eines Histogramms, hier beispielhaft gezeigt ungefärbte Zellen (C) und mit dem Isotypkontroll-Antikörper (D) bzw. dem ACE2-Antikörper gefärbte HEK293T CLN7 ko 99-4-Zellen (E).

Für die Auswertung der Messungen des Cholesteringehalts mit dem BD FACSCelesta Flow Cytometer wurde das Programm FlowJo verwendet. Die Messungen selbst sowie das Gating wurden extern durch Herrn Rüdiger Eder (Regensburger Centrum für Interventionelle Immunologie) im Sinne einer Serviceleistung übernommen. Von jeder Probe wurde die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt und hinsichtlich der Unterschiede zwischen Wildtyp- und CLN7-Knockoutzellen analysiert.

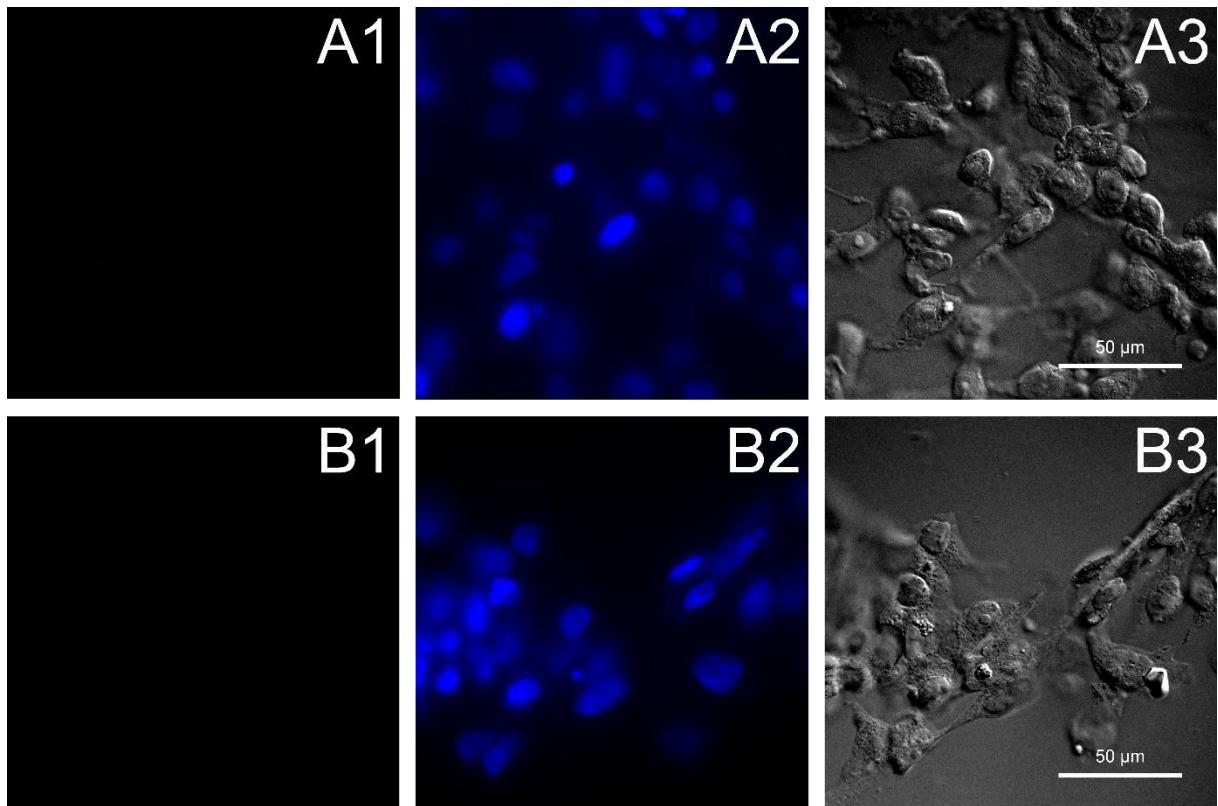
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuche an HEK293T-Zellen

##### 3.1.1 Untersuchung der Assoziation von CLN7 und ACE2

###### 3.1.1.1 Visualisierung der ACE2-Rezeptoren durch Immunfluoreszenz

Aufgrund der Relevanz des ACE2-Rezeptors für die zelluläre Aufnahme von SARS-CoV-2-Viren wurde die ACE2-Oberflächenexpression in HEK293T-Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Ziel war es, mögliche Unterschiede der ACE2-Expression in Abhängigkeit der CLN7-Expression zu erkennen. Proben der Zelllinien HEK293T CLN7 wt sowie CLN7 ko 94-5 wurden mit einem polyklonalen APC-Antikörper gefärbt, der an den humanen ACE2-Rezeptor bindet, und durch das Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Wie in Abbildung 3 zu erkennen, konnte in keiner der untersuchten Zelllinien ein mit den Augen klar erkennbares Signal festgestellt werden. Diese Beobachtung zeigte sich auch bei Wiederholung des Versuchs. Gründe dafür könnten ein nicht optimales Protokoll oder eine zu geringe ACE2-Expression der untersuchten Zellen sein. Deshalb wurde im Anschluss eine durchflusszytometrische Quantifizierung von ACE2 durchgeführt, welche eine höhere Sensitivität besitzt.



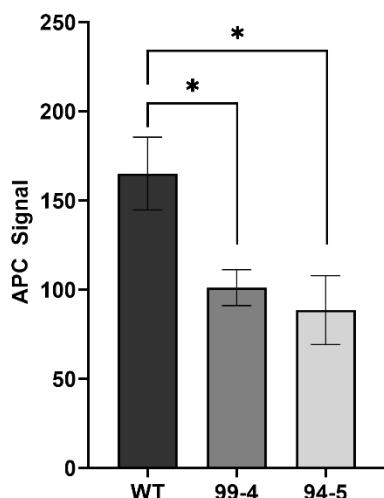
**Abbildung 3: ACE2-Oberflächenexpression von HEK293T CLN7 wt (A) und CLN7 ko 94-5 (B)**

Vitale HEK293T-Zellen wurden mit einem APC-gekoppelten polyklonalen Antikörper gegen humane ACE2-Rezeptoren gefärbt. In keiner der Zelllinien konnte mit dem bloßen Auge ein den ACE2-Rezeptoren entsprechendes Signal beobachtet werden. (1) Mit APC-gekoppeltem ACE2-Antikörper gefärbte ACE2-Rezeptoren (2) Mit Höchst 33258 gefärbte Zellkerne. (3) Durchlichtbild.

### 3.1.1.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der ACE2-Rezeptoren

Aufgrund des schwachen Signals in der Fluoreszenzmikroskopie wurden wegen der höheren Sensitivität durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Damit sollte zum einen die Funktion des Antikörpers und das Protokoll der Färbung überprüft werden, zum anderen sollte die ACE2-Expression zur besseren Vergleichbarkeit genau quantifiziert werden. Es wurden Vorversuche durchgeführt, in denen durchflusszytometrisch eine zwar detektierbare, aber schwache Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Deshalb wurde zur genaueren Differenzierung eine Negativkontrolle mittels eines Isotypkontroll-Antikörpers durchgeführt. Diese Antikörper stimmen im Isotyp, der Wirtspezies und dem Fluoreszenzfarbstoff mit dem Primärantikörper überein, sind jedoch nicht gegen ein spezifisches Antigen gerichtet. Dessen Signal wurde von dem Signal der mit dem ACE2-Rezeptor-Antikörper gefärbten Zellen

abgezogen, um die unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu eliminieren. Jede Probe wurde dreifach gemessen und die Mediane wurden zur Auswertung genutzt. Die Analysen zeigten, wie in Abbildung 4 dargestellt, eine um etwa 40 % reduzierte Expression von ACE2-Rezeptoren in beiden CLN7-Knockout-Zelllinien gegenüber dem Wildtyp.



**Abbildung 4: Durchflusszytometrische Quantifizierung der ACE2-Rezeptoren-Dichte in den Zelllinien HEK 293T wt, CLN7 ko 99-4 und 94-5**

Vitale HEK293T-Zellen wurden mit einem APC-gekoppelten ACE2-Rezeptor-Antikörper gefärbt. Ein Isotypkontroll-Antikörper wurde als Kontrolle für das Hintergrundsignal genutzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aller gemessenen Mediane nach Abzug des Hintergrundsignals. Gegenüber dem Wildtyp ist die ACE2-Oberflächenexpression in beiden CLN7-Knockout-Zelllinien um etwa 40 % reduziert. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an.  
\* =  $p < 0,05$  gegenüber dem Wildtyp.

Die Unterschiede zwischen den Wildtyp-Zellen und der jeweiligen Knockout-Zelllinie waren signifikant, die p-Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen. Die verringerte Expression von ACE2 kann mit einer gestörten Funktion der Lipid Rafts in CLN7-defizienten Zellen zusammenhängen.

HEK293T-Zelllinie	wt	CLN7 ko 99-4	CLN7 ko 94-6
SEM	20,43	10,05	19,28
MW	165,10	101,07	88,52
n	9	7	9
p (gegenüber wt)	-	0,0224	0,0150

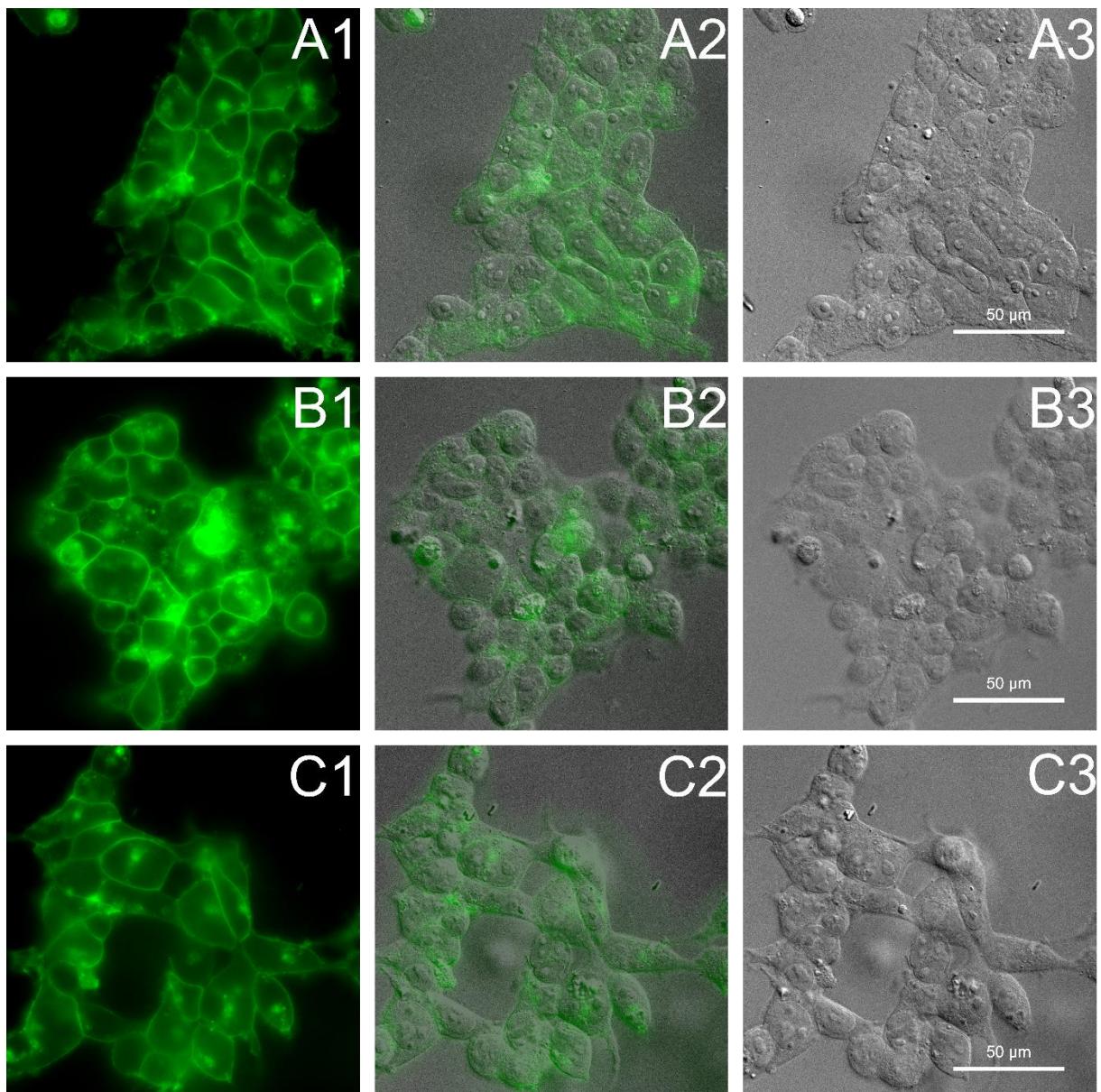
**Tabelle 10: Statistische Auswertung der ACE2-Oberflächenexpression verschiedener HEK293T-Zelllinien**

### 3.1.2 Untersuchung des Cholesterin-Stoffwechsels im HEK293T-Zellmodell

Cholesterin ist ein essenzieller Bestandteil von Lipid Rafts (64). Aufgrund der angenommen zentralen Rolle von CLN7 bei der Funktion von Lipid Rafts sollten mit der Quantifizierung des freien Cholesterins Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit dem CLN7-Protein erlangt werden. Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit Filipin III gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch sowie durchflusszytometrisch untersucht. Filipin III färbt freies Cholesterin an, das vor allem in den Membranen der Zelle enthalten ist. Verestertes Cholesterin wird nicht gefärbt (88).

#### 3.1.2.1 Lokalisation von Cholesterin in HEK293T Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen

Um die Verteilung freien Cholesterins zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen des Wildtyps mit den beiden CLN7-defizienten HEK293T-Zelllinien CLN7 ko 94-5 und ko 99-4 verglichen. Nach der Fixierung mit Formaldehyd und der anschließenden Behandlung mit Glycin wurden die Zellen mit dem zuvor angefertigten Filipin-Stock gefärbt. Nach der einstündigen Inkubation erfolgte die Entfernung des Farbstoffs und die Fluoreszenzmikroskopie der Präparate. Die Färbung der drei Zelllinien ist in Abbildung 5 dargestellt. In allen Zelllinien ließ sich eine besonders hohe Fluoreszenz im Bereich der Zellgrenzen beobachten, welche mit dem hohen Cholesteringehalt in der Plasmamembran erklärt werden kann. Des Weiteren zeigen sich im Zellinneren unterschiedlich geformte Strukturen, die Filipin besonders stark anreichern. In der Fluoreszenzmikroskopie ließ sich mit bloßem Auge kein eindeutiger Unterschied in der Stärke der Fluoreszenz feststellen, somit konnten keine Rückschlüsse auf einen unterschiedlichen Cholesteringehalt der Zelllinien getroffen werden. Deshalb wurden die Zellen zur Quantifizierung des freien Cholesterins durchflusszytometrisch untersucht.



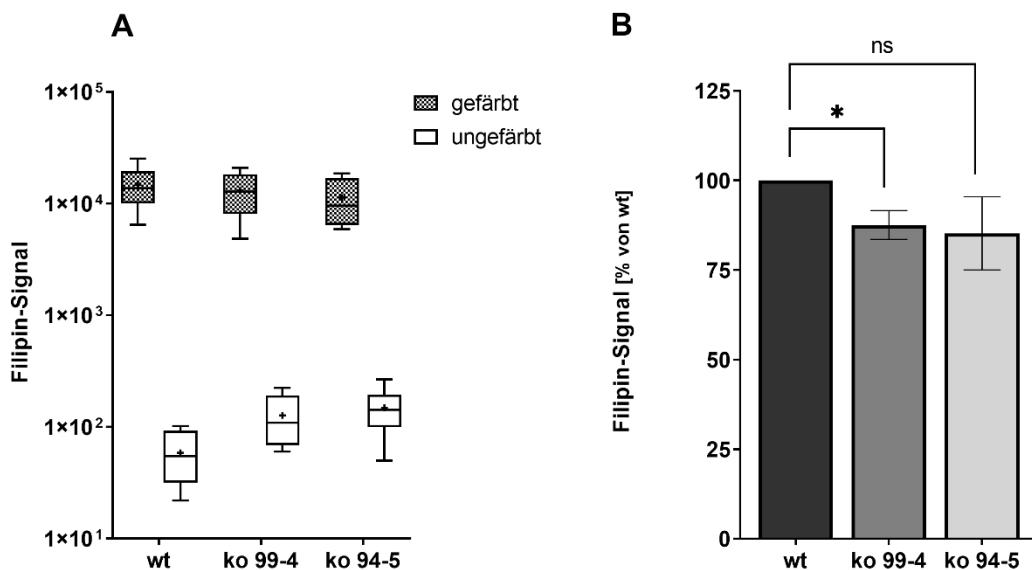
**Abbildung 5:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von freiem Cholesterin in HEK293T WT und CLN7 KO-Zellen

Fixierte HEK293T-Zellen des Wildtyps (A) und der CLN7-Knockout-Varianten ko 99-4 (B) und ko 94-5 (C) wurden mit Filipin III (grün) gefärbt. In allen drei Zelllinien ließ sich eine optisch ähnliche Verteilung und Intensität des Cholesterins-Signals erkennen. Neben der Plasmamembran waren auch zytoplasmatische Strukturen angefärbt. (A) Filipin III. (B) Mischbild. (C) Durchlichtbild.

### 3.1.2.2 Quantifizierung von Cholesterin in CLN7-defizienten HEK293T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Bei der Quantifizierung des Cholesteringehalt wurden HEK293T-Zellen des wt, ko 94-5 und ko 99-4 miteinander verglichen, indem sie nach der Färbung mit Filipin III durchflusszytometrisch vermessen wurden. In allen Fällen lag das Signal der gefärbten

Zellen deutlich über dem der nicht gefärbten Zellen. Wie in Abbildung 6 dargestellt, wiesen die gefärbten Zellen ein etwa 100-fach höheres Signal als die ungefärbten Zellen auf.



**Abbildung 6: Durchflusszytometrische Quantifizierung von freiem Cholesterin in HEK293T CLN7 Wildtyp- und Knockout-Zellen**

Fixierte HEK293T CLN7 wt- sowie CLN7 ko 99-4- und 94-5-Zellen wurden mit Filipin III gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Mittlere Fluoreszenzintensitäten von gefärbten und ungefärbten Zellen. Die gefärbten Zellen zeigten ein etwa 100-fach höheres Signal als die ungefärbten Zellen. (B) Vom Signal gefärbter Knockout-Zellen wurde das Hintergrundsignal abgezogen, das durch ungefärbte Zellen der gleichen Gruppe bestimmt wurde. Im Anschluss wurde die Signalstärke in Relation zu ebenfalls gefärbten Wildtyp-Zellen gesetzt. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen haben beide CLN7 ko-Zelllinien (99-4 und 94-5) einen um knapp 14 % verminderten Cholesteringehalt. Die Whisker der Boxplots sind über die jeweiligen Minimal- und Maximalwerte definiert. Das +-Symbol markiert die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an. \* =  $p < 0.05$ , ns =  $p \geq 0.05$ .

In den gezeigten Daten wurde das Signal der ungefärbten Knockout-Zellen von dem der gefärbten Zellen subtrahiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität mit dem Signal von ebenfalls gefärbten Wildtyp-Zellen prozentual in Relation gesetzt. Es konnte in beiden CLN7-Knockout-Zelllinien eine Reduktion des Cholesteringehalts um knapp 14 % gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Der Unterschied zwischen HEK293T wt- und CLN7-ko-99-4-Zellen war statistisch signifikant, der zwischen wt- und ko-94-5-Zellen hingegen nicht. Die Werte schwankten dabei zwischen den einzelnen Messstagen recht stark. Die genauen Daten der statistischen Auswertung

sind Tabelle 11 zu entnehmen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Gehalt freien Cholesterins in CLN7-defizienten Zellen verringert ist. Außerdem unterstützen sie die These, dass CLN7 eine wichtige Rolle für die Funktion der Lipid Rafts innehaltet.

HEK293T-Zelllinie	wt	CLN7 ko 99-4	CLN7 ko 94-6
SEM	2182,33	2008,22	1934,38
MW	14718,56	13154,56	11185,71
n	8	8	7
p (gegenüber wt)	-	0,0172	0,1981

**Tabelle 11: Statistische Auswertung des Gehalts freien Cholesterins in verschiedenen CLN7 knockout HEK293T-Zelllinien**

### 3.2 Versuche an THP-1-Zellen

#### 3.2.1 Transfektion von THP-1-Zellen und M0-Makrophagen mit verschiedenen Plasmiden

Aufgrund des vermuteten Zusammenhangs zwischen CLN7 und zentralen Immunprozessen wurden verschiedene Transfektionsversuche an THP-1-Zellen durchgeführt. Diese dienen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu primären humanen Monozyten als Modell für Funktion und Mechanismen des Monozyten-Makrophagen-Systems (81).

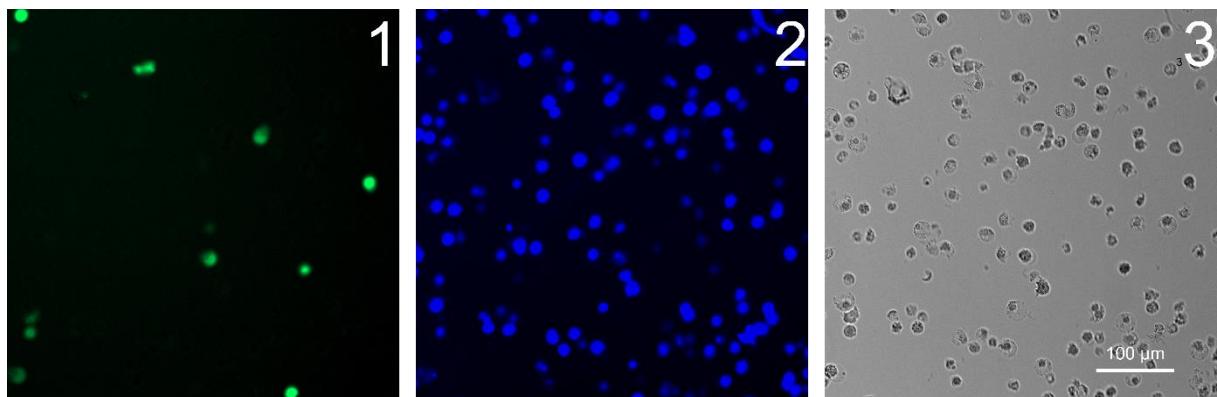
##### 3.2.1.1 Vorversuche mit GFP-Plasmid

Um für die anschließenden Transfektionen mit verschiedenen Vektoren möglichst optimale Transfektionsbedingungen schaffen zu können, wurden Vorversuche mit einem GFP-Plasmid durchgeführt. Eine erfolgreiche Transfektion ist hier durch die Fluoreszenzmikroskopie einfach zu überprüfen, da GFP fluoresziert. Die im Folgenden verwendete Nummerierung der Versuche entspricht Tabelle Nr. 1 in Abschnitt 2.2.2.2., die zur besseren Übersicht hier erneut aufgeführt wird.

Nr.	Methode	Vektor	Zellen	Anzahl Versuche	Anzahl Schalen
1	Lipofectamine3000	GFP	THP-1-Zellen	1	8
2	Lipfectamine3000 /Dreamfect	- acGFP-CLN7-pIRES - EGFP-CLN7-C1	Makrophagen	1	12
3	Elektroporation	GFP	THP-1-Zellen	1	6
4	Elektroporation	- acGFP-CLN7-pIRES - EGFP-CLN7-C1	THP-1-Zellen, im Anschluss teilweise Differenzierung	2	6

**Tabelle 12 (zur besseren Übersicht erneut aufgeführt): Transfektion verschiedener Plasmide in THP-1-Zellen und aus ihnen differenzierten Makrophagen**

Die THP-1-Zellen wurde gemäß der Herstellerangaben mit Lipofectamine3000 transfiziert (Versuch Nr. 1, Lipofektion) und nach 48 h mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei konnte keine einzige fluoreszierende Zelle beobachtet werden (Bild nicht gezeigt), sodass als Nächstes eine Transfektion durch Elektroporation (Versuch Nr. 3) versucht wurde. Diese wurde mit dem Neon Transfection System durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Plasmidmengen (1 und 3 µg) getestet. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Wie in Abbildung 7 zu sehen, zeigten sich vereinzelt transfizierte Zellen. Diese Zellen wurden gezählt und ihre Anzahl wurde mit Gesamtzahl der Zellen verglichen, sodass auf eine Transfektionseffizienz von etwa 10 % geschlossen werden konnte. Die unterschiedlichen Plasmidmengen hatten keinen erkennbaren Unterschied in der Transfektionseffizienz zur Folge. Des Weiteren war zu beobachten, dass viele Zellen eine sehr granuläre Struktur aufwiesen und vermehrt Überreste untergangener Zellen in der Suspension auftraten. Daraus konnte auf einen negativen Einfluss der Elektroporation selbst oder der Expression des GFP-Plasmids auf die Zellviabilität geschlossen werden. Aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz und der zytotoxischen Effekte wurden die Versuche nicht fortgeführt.



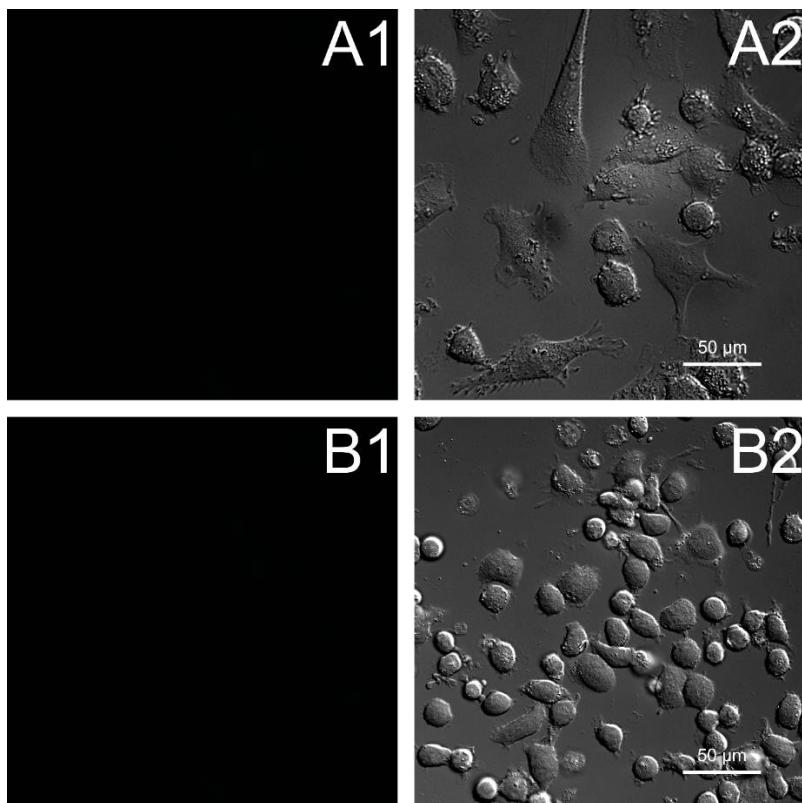
**Abbildung 7:** Mit GFP-Plasmid durch Elektroporation transfizierte THP-1-Zellen (Versuch Nr. 3)

THP-1-Zellen wurden mithilfe des Neon Transfection System mit 1 µg GFP-Plasmid transfiziert und nach 48-stündiger Inkubation fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden mit einer Effizienz von etwa 10 % transfiziert und wiesen eine granuläre Struktur auf. (1) Erfolgreich mit GFP transfizierte Zellen. (2) Mit Höchst 33258 angefärbte Zellkerne. (3) Durchlichtbild.

### 3.2.1.1.1 Transfektion von acGFP-CLN7- und EGFP-CLN7-Plasmiden in THP-1-Zellen und M0-Makrophagen

M0-Makrophagen sollten mit fluoreszierenden CLN7-Plasmiden transfiziert werden, um die Zellen auf das Vorhandensein von tubulären Lysosomen hin zu untersuchen. Die hier verwendete Nummerierung der Versuche entspricht Tabelle Nr. 1 in Abschnitt 2.2.2.2 bzw. 3.2.1.1. In einem Versuch (Versuch Nr. 2, Lipofektion) wurden aus THP-1-Zellen differenzierte Makrophagen transfiziert, in einem anderen erfolgte die Differenzierung im Anschluss an die Transfektion (Versuch Nr. 4, Elektroporation). Das unterschiedliche Vorgehen ergab sich aus der Adhärenz der differenzierten Zellen, die als Transfektionsmethode lediglich die Lipofektion erlaubt, eine Elektroporation ohne erneutes Ablösen der Zellen jedoch unmöglich macht. Als Vektor wurde in beiden Versuchen sowohl das acGFP-CLN7-pIRES- als auch das EGFP-CLN7-C1-Plasmid im Sinne einer Kotransfektion verwendet. In Versuch Nr. 2 wurden THP-1-Zellen durch Hinzugabe von 10 ng/ml Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 Stunden differenziert und im Anschluss transfiziert. Die Transfektion wurde in einem Teil der Zellen mit Lipofectamine3000, in einem anderen Teil mit DreamFect durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine weitere Gruppe zwar differenziert, aber nicht transfiziert. In Abbildung 8 werden die mit Lipofectamine3000 transfizierten Zellen mit der Kontrollgruppe verglichen. Die mit DreamFect transfizierten Zellen unterschieden sich nicht von denen, die mit Lipofectamine3000 behandelt wurden. Die Zellen aller

Gruppen waren adhären, woraus auf eine erfolgreiche Differenzierung zu M0-Makrophagen geschlussfolgert werden konnte. In keiner der Gruppen war ein GFP-Signal zu erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Transfektion in keiner einzigen Zelle gelungen ist oder aber im Falle einer gelungenen Transfektion die CLN7-Überexpression eine zelltoxische Wirkung hatte. Aus diesem Grund wurden die Versuche nicht fortgeführt. Die Zellen zeigten jedoch eine Reaktion auf den Vorgang der Transfektion. In der transfizierten Gruppe zeigten die meisten Zellen einen veränderten Phänotyp, der sich durch verflachte Zellkörper und lange Fortsätze auszeichnet und typisch für aktivierte Makrophagen der Subtypen M1 oder M2 ist. In der Kontrollgruppe hingegen zeigten fast alle Zellen die typische runde Form von M0-Makrophagen (99, 100). Die wahrscheinliche Ursache dafür ist eine Aktivierung der Makrophagen durch den Transfektionsvorgang, die eine weitere Differenzierung in die M1- und M2-Subtypen verursachte.

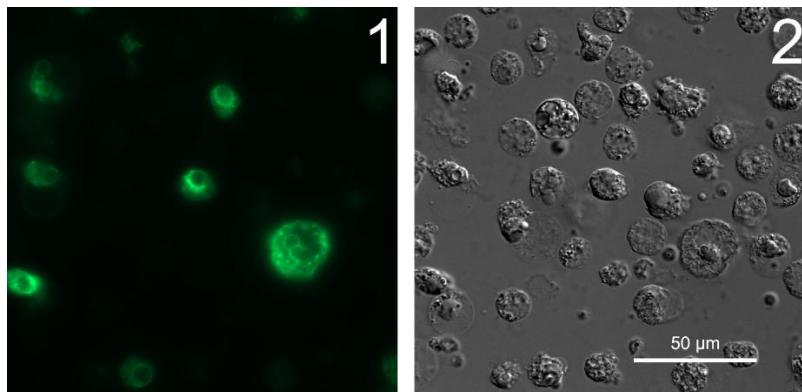


**Abbildung 8: Kotransfektion von aus THP-1-Zellen differenzierten M0-Makrophagen mit acGFP- und EGFP-CLN7 mittels Lipofektion sowie Negativkontrolle (Versuch Nr. 2)**

(A) THP-1-Zellen wurden mit 10 ng/ml Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA) für 48 Stunden differenziert und im Anschluss mittels Lipofectamine3000 mit acGFP-CLN7 und EGFP-CLN7 transfiziert. Es war kein GFP-Fluoreszenzsignal erkennbar. Die transfizierten Zellen zeigten gegenüber der Negativkontrolle eine deutlich veränderte Morphologie mit verflachten Somata und langen Ausläufern. Die Lipofektion kann eine unbeabsichtigte Aktivierung der M0-Makrophagen zu M1- und M2-Makrophagen verursacht haben. (B) Als Negativkontrolle wurden THP-1-Zellen ebenfalls wie zuvor beschrieben differenziert, aber nicht transfiziert. Es gab kein GFP-Fluoreszenzsignal. Die Zellen zeigten größtenteils eine für M0-Makrophagen typische Morphologie. (1) GFP. (2) Durchlichtbild.

Bei Versuch Nr. 4 wurden die THP-1-Zellen mit dem Neon Transfektionssystem elektroporiert und direkt im Anschluss wie zuvor beschrieben differenziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In vereinzelten Zellen war, wie in Abbildung 9 zu sehen, ein GFP-Signal messbar. Durch Auszählung der Zellen konnte auf eine Transfektionseffizienz von etwa 15 % geschlossen werden. Einige wenige Zellen zeigten die bereits in anderen Zelllinien beobachteten intrazellulären Vesikel von 5-10  $\mu\text{m}$  Größe, bei denen es sich wahrscheinlich um vergrößerte Lyosomen handelte. Insgesamt war die Zellviabilität niedrig, es waren Zelltrümmer in der Suspension zu finden und die meisten Zellen waren trotz der Differenzierung nicht adhärent. Außerdem war eine stark veränderte Morphologie zu

beobachten, die sich insbesondere durch eine ausgeprägte Granularität auszeichnete. Es konnte angenommen werden, dass der Vorgang der Elektroporation die Zellen zu stark geschädigt hatte. Deshalb wurde auch dieser Versuch nicht wiederholt.



**Abbildung 9: Kotransfektion von aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagen mit CLN7-Plasmiden mittels Elektroporation (Versuch Nr. 4)**

THP-1-Zellen wurden mittels Elektroporation mit acGFP-CLN7 und EGFP-CLN7 transfiziert, im Anschluss mit PMA differenziert und 48 h später fluoreszenzmikroskopiert. Etwa 15 % der Zellen wurden transfiziert. Die Zellen zeigten eine granuläre Morphologie und waren trotz Differenzierung nicht adhärent, in der Zellsuspension fanden sich vermehrt Überreste untergegangener Zellen. Intrazellulär waren vergrößerte Lysosomen von 5-10 µm zu erkennen. (1) Erfolgreich transfizierte Zellen. (2) Durchlichtbild.

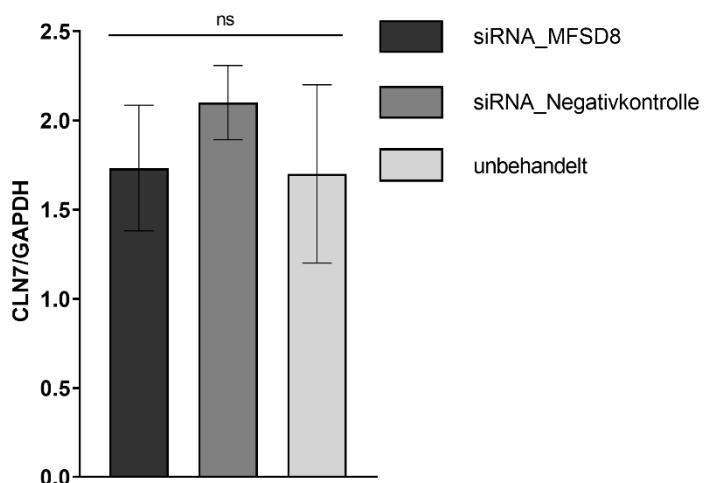
### 3.2.2 Quantifizierung der CLN7-mRNA in THP-1-Zellen nach siRNA-Behandlung

Um den Einfluss von CLN7 auf das Monozyten-Makrophagen-System zu untersuchen, wurde mittels RNA-Interferenz versucht, die Expression des CLN7-Gens in THP-1-Zellen zu reduzieren bzw. möglichst vollständig zu unterdrücken. Dazu wurden THP-1-Zellen mit einer gegen das CLN7-Gen gerichteten siRNA transfiziert. Als Kontrolle diente neben einer Gruppe unbehandelter Zellen eine Gruppe, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurde. Eine solche siRNA hat keine Ähnlichkeit mit menschlichen Gen-Sequenzen. In einem der Versuche wurde außerdem eine „mock“-Transfektion durchgeführt, bei der die Zellen ohne die Zugabe von siRNA dem Transfektionsprozedere ausgesetzt wurden. Die THP-1-Zellen wurden mittels Elektroporation oder Lipofektion mit CLN7-siRNA transfiziert. Der Transfektionserfolg wurde 48 Stunden später mittels qRT-PCR überprüft. Die hier verwendete Nummerierung der Versuche entspricht Tabelle 5 in Abschnitt 2.2.2.3, die im Folgenden zur besseren Übersicht erneut aufgeführt wird.

Nr.	Methode	Zellzahl		siPool [nM]			Dream-Fect [ $\mu$ l]	Mock-Kontrolle	Anzahl Transfektionen
I	Elektro-poration	$1 \times 10^5$		$50$			-	Nein	1
II	Lipo-fektion	$5 \times 10^5$			50		4	8	Nein 1
III		50					4	Ja	1
IV		30					4	Nein	1
V		40					4	Nein	1
VI		40					4	Nein	3

**Tabelle 13 (zur besseren Übersicht erneut aufgeführt): Transfektionsbedingungen siRNA gegen CLN7 in THP-1-Zellen**

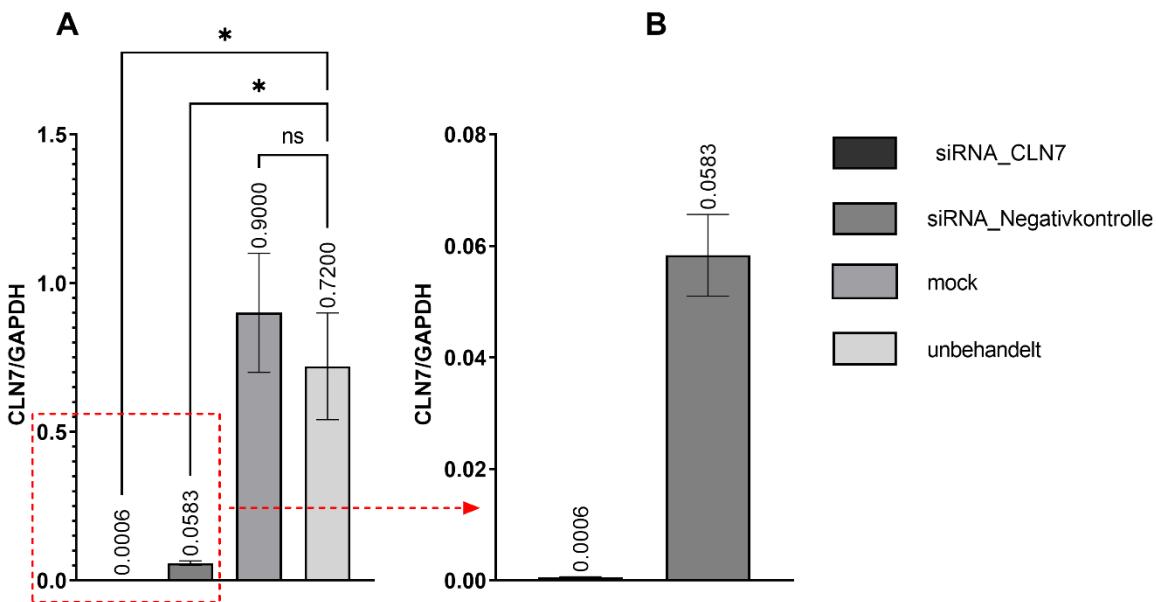
Es gelang vorerst keine signifikante Reduktion der CLN7-Expression. Beispielhaft ist in Abbildung 10 Versuch Nr. IV dargestellt, die Daten für die weiteren Versuche werden nicht gezeigt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 10: Quantifizierung der CLN7-mRNA mittels qRT-PCR nach siRNA-Transfektion (Versuch Nr. IV)**

48 h nach der Transfektion mit siRNA mittels Lipofektion wurde mRNA aus THP-1-Zellen isoliert und mit einer qRT-PCR quantifiziert. Über die Gruppen hinweg waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die Daten werden als Mittelwerte der Triplets gezeigt. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an. ns = p  $\geq$  0.05. GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. qRT-PCR: Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription

In den folgenden Versuchen wurde daraufhin die siRNA-Konzentration sukzessive erhöht, außerdem wurde in einem Versuch eine dreifache Transfektion im Abstand von je 48 h durchgeführt. Schließlich konnte in Versuch Nr. III mittels Lipofektion ein 1.200-facher, signifikanter ( $p = 0,0135$ ) Knockdown der Genexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle erreicht werden (siehe Abbildung 11). Jedoch zeigte sich auch bei der Negativkontrolle eine signifikante ( $p = 0,0208$ ) Reduktion der CLN7-Genexpression um den Faktor 12. Als Ursache dafür können Off-target-Effekte durch zu hohe Konzentrationen der siRNA angenommen werden. Bei der „mock“-Transfektion zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,6772$ ) zu den unbehandelten Zellen. Dementsprechend ist ein Einfluss des Transfektionsreagens auf die Genexpression als unwahrscheinlich anzusehen. Da ein Knockdown sich nur mit signifikanten Off-Target-Effekten erreichen ließ, wurde die Versuchsreihe abgebrochen.



**Abbildung 11: CLN7-Knockdown nach siRNA-Transfektion, mittels qRT-PCR ausgewertet (Versuch Nr. III)**

48 h nach der Transfektion mittels Lipofektion wurde CLN7-mRNA aus THP-1-Zellen isoliert und mit einer qRT-PCR quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mittels relativer Quantifizierung, als Referenzgen diente GAPDH. (A) Mit siRNA gegen CLN7 und unspezifischer siRNA transfierte Zellen zeigten eine Reduktion der CLN7-mRNA-Expression um den Faktor 1200 bzw. 12. Die mock-Transfektion hatte keinen signifikanten Einfluss. (B) Ausschnitt aus A zur besseren Übersicht. Die Daten werden als Mittelwerte der Triplets gezeigt. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an. \* =  $p < 0,05$ , ns =  $p \geq 0,05$ . GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. qRT-PCR: Quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription

## 4 Diskussion

### 4.1 Assoziation zwischen CLN7- und ACE2-Expression

Die Expression von CLN7 beeinflusst die Viruslast von mit SARS-CoV-2 infizierten HEK293T-Zellen in hohem Maße. So wurde von Heinl et al. nachgewiesen, dass die Viruslast nach der Infektion in CLN7-Knockout-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen um 90 % reduziert ist, umgekehrt führt eine CLN7-Überexpression zu einer signifikanten Erhöhung der Viruslast um fast 90 % (55). Dieser Unterschied könnte auf eine gestörte Aufnahme von Coronaviren zurückzuführen sein, bei der das Enzym ACE2 als Rezeptor eine wesentliche Rolle spielt. Um den Zusammenhang zwischen CLN7- und ACE2-Expression zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. In der Fluoreszenzmikroskopie war aufgrund der schwachen Fluoreszenz mit bloßem Auge kein Signal erkennbar. Dies lag wahrscheinlich an einer eher niedrigen ACE2-Rezeptordichte. Deshalb wurden die Experimente durch durchflusszytometrische Analysen ergänzt. Untersucht wurden zwei CLN7-defiziente Zelllinien, die sich durch einen CRISPR/Cas9-vermittelten vollständigen CLN7-Knockout an verschiedenen Stellen des Genoms unterschieden. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Zelllinien diente dazu, verfälschte Ergebnisse durch Off-Target-Effekte zu vermeiden. In beiden Knockout-Zelllinien wurde eine im Vergleich zum Wildtyp um etwa 40% reduzierte ACE2-Expression nachgewiesen (siehe Abbildung 4). Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen CLN7- und ACE2-Expression.

Unklar ist, ob dieser Zusammenhang direkter oder indirekter Natur ist. Es könnte eine bisher unbekannte direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Zellstrukturen bestehen. Zum Beispiel könnten CLN7-defiziente Zellen aufgrund gestörter lysosomaler Funktionen ein verändertes Expressionsmuster von Rezeptoren aufweisen, das ACE2 und möglicherweise auch weitere Rezeptoren betrifft. Lysosomen sind für das Recycling von Rezeptoren zuständig, sodass eine gestörte lysosomale Funktion dieses Recycling behindern und somit eine verringerte ACE2-Expression bedingen könnte. Andererseits ist auch eine indirekte Reduktion der ACE2-Expression denkbar. Es gibt Hinweise darauf, dass in CLN7-defizienten Zellen die Menge an Lipid Rafts und deren Funktion gestört ist (55). Da ACE2 in Lipid Rafts lokalisiert ist, ist es denkbar, dass die verringerte ACE2-Expression indirekt durch die

Störung der Lipid Rafts verursacht wird (56). Um diese Hypothese näher zu untersuchen, könnte man in weiteren Versuchen prüfen, ob andere in Lipid Rafts lokalisierte Rezeptoren ebenfalls vermindert exprimiert werden. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob eine Störung der Lipid Rafts eine verringerte Viruslast nach Infektion von Wildtyp-Zellen verursacht. Eine solche Störung könnte beispielsweise durch Cholesterinentzug mittels Methyl- $\beta$ -cyclodextrin verursacht werden (101). Es wäre auch möglich, einen Rescue-Versuch durchzuführen, um zu untersuchen, ob CLN7-defiziente Zellen nach einer transienten Transfektion mit CLN7 wieder mehr ACE2 exprimieren.

Neben der Relation von ACE2 und CLN7 muss jedoch auch die Beziehung zwischen ACE2-Expression und Viruslast hinterfragt werden. CLN7-defiziente Zellen weisen eine geringere ACE2-Expression und nach Infektion mit SARS-CoV-2 eine niedrigere Viruslast als Wildtyp-Zellen auf. Eine naheliegende Interpretation ist, dass die geringere ACE2-Expression dazu führt, dass weniger Viren in die Zellen gelangen und die Viruslast somit niedriger ist. Wissenschaftlicher Konsens ist, dass SARS-CoV-2 für den Zelleintritt funktionelles ACE2 benötigt (102, 103). Allerdings ist unklar, wie stark sich die Höhe der ACE2-Expression auf die Virusaufnahme auswirkt. Einige Autor\*innen stellen die Hypothese auf, dass die Höhe der ACE2-Expression und somit die Anzahl der Bindungsstellen für das Virus dessen Virulenz beeinflusst (104, 105). Manche verwenden basierend auf dieser Annahme Daten zur Expression von ACE2 zur Bewertung der Vulnerabilität verschiedener Gewebe (106). Andere wiederum stellen eine Beziehung zwischen der Höhe der ACE2-Expression und der Infektionsrate infrage, da SARS-CoV-2 eine sehr hohe Affinität zu ACE2-Rezeptoren aufweist (107). Außerdem sind im klinischen Kontext Merkmale, die mit einer niedrigen ACE2-Expression assoziiert sind (höheres Alter, männliches Geschlecht und Hypertension) Risikofaktoren für eine Ansteckung und einen schweren Erkrankungsverlauf, während Merkmale, die mit einer hohen ACE2-Expression assoziiert sind (niedrigeres Alter, weibliches Geschlecht, Normotension, Therapie mit ACE2-Rezeptor-Inhibitoren oder AT1-Rezeptor-Antagonisten) potenziell protektiv sind (103, 108, 109).

Letztlich scheint die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Höhe der ACE2-Expression und Viruslast aufgrund der begrenzten Relevanz im klinischen Kontext von nachrangiger Bedeutung, was ein Grund dafür sein könnte, dass sie bislang nicht hinreichend untersucht wurde. Im Gesamtkontext des menschlichen Organismus spielt ACE2 nämlich eine ambivalente Rolle - einerseits ist es für den Zelleintritt von SARS-CoV-2 notwendig, andererseits ist eine erniedrigte ACE2-Expression wegen regulatorischer Funktionen als Gegenspieler des homologen Enzyms ACE problematisch. ACE wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um, das durch Bindung an den AT1-Rezeptor vasokonstriktorische, entzündliche und fibrotische Effekte hervorruft. ACE2 hingegen spaltet hauptsächlich Angiotensin II zu Angiotensin-(1-7), welches durch Bindung an den Mas-Rezeptor vasodilatierende, antioxidative und antiproliferative Effekte fördert. So balanciert die ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas-Achse die ACE/Angiotensin II/AT1-Achse aus (110). Eine erniedrigte ACE2-Expression (vorbestehend oder als Resultat einer Downregulation nach Infektion) kann somit als Mitursache von schweren Komplikationen durch Lungenschäden und wichtiger Teil der Pathogenese von COVID-19 als Multiorganerkrankung betrachtet werden (50, 107).

Es bleibt unklar, ob die verringerte ACE2-Expression die Hauptursache für die reduzierte Infizierbarkeit von CLN7-defizienten HEK293T-Zellen ist. Um diese These eingehender zu prüfen, wäre ein Versuchsmodell denkbar, in dem ACE2 in CLN7-Knockout-Zellen transfiziert wird, um ACE-überexprimierende, CLN7-defiziente Zellen zu erzeugen. Diese könnten dann im Hinblick auf ihre Viruslast nach einer SARS-CoV-2-Infektion untersucht werden. Auch könnte überprüft werden, ob CLN7-überexprimierende HEK293T-Zellen mehr ACE2 exprimieren als Wildtyp-Zellen. Außerdem muss als limitierender Faktor der Aussagekraft dieser Ergebnisse die geringe Stichprobengröße (9 bzw. 7 im Vergleich von Wildtyp-Zellen mit den beiden CLN7-Knockout-Zelllinien) erwähnt werden.

Zusammenfassend konnte also eine reduzierte ACE2-Expression in CLN7-defizienten Zellen nachgewiesen werden, die Bedeutung dieser Erkenntnisse ist allerdings nicht abschließend geklärt.

#### **4.2 Auswirkungen der CLN7-Expression auf den Cholesterin-Stoffwechsel**

Es gibt verschiedene Hinweise auf eine gestörte Funktion der Lipid Rafts in CLN7-defizienten Zellen. Insbesondere wurde eine Reduktion des zellulären GM1-Gehalts durch einen CLN7-Knockout nachgewiesen (55). GM1 ist ein zentraler Bestandteil von Lipid Rafts und wird deshalb als Marker verwendet. Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene reduzierte ACE2-Expression passt zu dieser Hypothese, da ACE2 in Lipid Rafts lokalisiert ist (56). Weil Lipid Rafts sich durch einen hohen Gehalt an freiem Cholesterin auszeichnen, sollten HEK293T-Zellen auf Unterschiede im Cholesteringehalt in Abhängigkeit von ihrer CLN7-Expression untersucht werden (64).

Zu diesem Zweck wurde eine Filipinfärbung an Wildtyp- und CLN7-Knockout-Zellen durchgeführt. Filipin, ein aus *Streptomyces filipinensis* isoliertes Makrolid, bezieht sich im Folgenden auf das Isomer Filipin III. Es bindet an freies, nicht verestertes Cholesterin und kann aufgrund seiner natürlichen Fluoreszenz zur Bestimmung von Cholesteringehalt und -verteilung in Zellmembranen verwendet werden (86-88).

Mit bloßem Auge war in der Fluoreszenzmikroskopie kein Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität der verschiedenen Zelllinien erkennbar (siehe Abbildung 5). Deshalb wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Hier wurde in den beiden verwendeten CLN7-Knockout-Zelllinien eine Reduktion des Gehalts an freiem Cholesterin um etwa 15 % gegenüber Wildtyp-Zellen gemessen (siehe Abbildung 6). Diese Ergebnisse können als erster Hinweis auf einen geringeren Gehalt freien Cholesterins in CLN7-defizienten Zellen gewertet werden. Der Unterschied war jedoch nur in einer der beiden verwendeten Knockout-Zelllinien gegenüber den Wildtyp-Zellen signifikant, weshalb diese Hypothese weiter verifiziert werden muss.

Die Messung des freien Cholesterins mittels Filipin brachte einige Herausforderungen mit sich: Aufgrund des rapiden Fluoreszenzverlusts des Farbstoff-Stocks durch Oxidation musste die Farbstoff-Verdünnung an jedem Versuchstag neu hergestellt werden. Dadurch bedingte Unterschiede in der Konzentration sind die wahrscheinlichste Erklärung für die stark schwankenden Messwerte. Bei einer Wiederholung der Versuche müsste das Verfahren also weiter vereinheitlicht werden. Außerdem könnte es hilfreich sein, eine deutlich größere Stichprobe zu untersuchen.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass Filipin nicht nur freies Cholesterin, sondern auch GM1 mit einer ähnlichen Affinität bindet (111). GM1 wird üblicherweise mittels der membranbindenden Untereinheit B des Choleratoxins (CTxB) markiert und quantifiziert (112). Ein um 88 % reduzierter GM1-Gehalt in CLN7-defizienten Zellen wurde in Messungen mit CTxB bereits nachgewiesen (55). Aus den in dieser Arbeit festgestellten Unterschieden in der Fluoreszenzintensität nach Filipinfärbung kann also nicht eindeutig auf eine geringere Menge freien Cholesterins geschlossen werden, da die Unterschiede auch durch die unterschiedliche GM1-Menge verursacht sein könnten. Aufgrund der Herausforderungen einer einheitlichen Färbung mit Filipin und der Affinität von Filipin zu GM1 sollten die durchgeführten Versuche um eine spezifischere Quantifizierungsmethode ergänzt werden. Momentan werden deshalb durch die AG Reichold Untersuchungen zur Quantifizierung freien Cholesterins mit weiteren Methoden der instrumentellen Analytik durchgeführt.

#### **4.3 Generierung einer CLN7-defizienten THP-1-Zelllinie**

Um die bereits vorhandenen Erkenntnisse zu CLN7 im HEK293T-Zellmodell zu festigen, sollte ein weiteres Zellmodell etabliert werden. Es gibt Hinweise auf eine wichtige Rolle des CLN7-Proteins für das Immunsystem. So interagiert CLN7 mit verschiedenen Proteinen des Immunsystems, zum Beispiel HLA-DQA1, einem Gen für ein wichtiges Molekül des MHC-Klasse-II-Systems (72-75). Auch in laborinternen Versuchen (Karina Schüppler und Elena Heinl, AG Reichold, Universität Regensburg) ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen CLN7 und immunologischen Funktionen: Es wurde eine hohe CLN7-Expression in primären und sekundären lymphatischen Organen der Maus nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte CLN7 in tubulären Lysosomen CLN7-überexprimierender HEK239T-Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Tubuläre Lysosomen finden sich vor allem in Immunzellen (77, 78). Aufgrund dieser Gegebenheiten sollten THP-1-Zellen als Modell verwendet werden. Diese humane Zelllinie stammt von Monozyten ab und wird in der immunologischen Forschung vielfach verwendet, außerdem kann sie zu Makrophagen differenziert werden (81). Mittels RNA-Interferenz sollte ein transakter Knockdown von CLN7 in THP-1-Zellen durchgeführt werden.

In den Vorversuchen wurden die THP-1-Zellen mittels Elektroporation und Lipofektion mit einem GFP-Plasmid transfiziert, um die Effizienz der Transfektion auf die Zellen vorab zu prüfen. Nach einer Transfektion mit dem GFP-Plasmid lässt sich der Transfektionserfolg aufgrund der Fluoreszenz einfach mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüfen, außerdem sind keine durch GFP selbst bedingten zytotoxischen Effekte bekannt, während dies für andere Vektoren und die daraus entstehenden Produkte nicht unbedingt ausgeschlossen werden kann. Es gelang nur durch die Elektroporation eine Transfektion. Die Transfektionseffizienz war jedoch niedrig und es waren erhebliche zytotoxische Effekte erkennbar (siehe Abbildung 6). Ursächlich dafür könnte der Vorgang der Elektroporation selbst oder Effekte der Expression eines erfolgreich transfizierten GFP-Plasmids sein. Die Diskussion der wahrscheinlichen Ursache erfolgt in Abschnitt 4.4, um diese auch in den Kontext der Versuche zur CLN7-Transfektion setzen zu können.

Aufgrund der uneindeutigen Ergebnisse aus den Vorversuchen wurde auch die siRNA-Transfektion mit beiden Methoden, Elektroporation und Lipofektion, durchgeführt. Anstatt des in den Vorversuchen genutzten Lipofectamine3000 wurde zur Lipofektion das Reagenz DreamFect verwendet, da verschiedene Autor\*innen mit diesem Reagenz bereits zuverlässige siRNA-Transfektionen mit THP-1-Zellen berichteten (113-116). Es sollten CLN7-siRNA und eine unspezifische siRNA ohne Ähnlichkeit zu menschlichen Gen-Sequenzen zur Negativkontrolle in die Zellen eingebracht werden. Letztere ist vom Hersteller der CLN7-siRNA entwickelt und dient der Detektion von Off-Target-Effekten bei der siRNA-Transfektion. Nach mehreren erfolglosen Versuchen mit anschließender Steigerung der siRNA-Konzentration ließ sich schließlich in einem der Versuche mittels Lipofektion ein gegenüber den unbehandelten Zellen signifikanter Knockdown der CLN7-mRNA um den Faktor 1.200 beobachten. Gleichzeitig zeigte sich ein signifikanter 12-facher CLN7-Knockdown in der Gruppe, die mit der Negativkontroll-siRNA transfiziert wurde (siehe Abbildung 11). Da die CLN7-Genexpression auch durch die unspezifische siRNA der Negativkontrolle signifikant verringert wurde, kann auf sogenannte Off-Target-Effekte geschlossen werden. Das bedeutet, dass die reduzierte Genexpression nicht ausschließlich auf der spezifischen Wirkung der RNA-Interferenz beruht, sondern durch die Transfektion selbst zusätzliche, nicht zielgerichtete Effekte auf verschiedene Gene entstehen. Neben der

Negativkontrolle wurde auch eine „mock“-Kontrolle durchgeführt, in der die Zellen ohne Zugabe von siRNA dem Transfektionsprozess ausgesetzt wurden. Da sich hier kein signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellen zeigte, kann angenommen werden, dass der Knockdown in den mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen nicht durch das Transfektionsreagenz, sondern durch die siRNA verursacht wurde. Ein ausreichender Gen-Knockdown ließ sich also nur auf Kosten der Spezifität erreichen. Die so generierten Zellen exprimierten zwar deutlich weniger CLN7, waren jedoch aufgrund der Off-Target-Effekte nicht für weiterführende Versuche geeignet. Dies ist eine typische Hürde bei Versuchen zur RNA-Interferenz und beruht auf verschiedenen Ursachen. Eine davon ist die nicht erwünschte Herunterregulierung von Sequenzen, die der Zielsequenz ähneln (117). Diesem Problem wurde in den beschriebenen Versuchen bereits durch gepoolte siRNA entgegengewirkt. Dies beschreibt die Verwendung verschiedener siRNAs, die an unterschiedlichen Stellen der Zielsequenz ansetzen und so die Spezifität erhöhen. Des Weiteren können siRNAs eine Immunstimulation der betroffenen Zellen und somit die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen bewirken. Dies bringt zahlreiche intrazelluläre Reaktionen mit sich, die sich als Off-Target-Effekte zeigen können (117). Dies scheint im vorliegenden Fall nicht nur möglich, sondern sogar wahrscheinlich, da die verwendeten THP-1-Zellen als Monozyten immunaktiv sind (79). Den immunstimulatorischen Effekten durch die Transfektion mit siRNA könnte durch eine Anpassung der verwendeten siRNAs entgegengewirkt werden. Die Stärke der Immunstimulation ist sehr unterschiedlich und hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einen Einfluss haben zum Beispiel das Vorhandensein bestimmter stimulatorischer Sequenzmotive, Doppel- oder Einzelsträngigkeit der siRNA sowie die chemische Modifikation bestimmter Uridin- und Guanosin-Reste (117).

Eine weitere Optimierung des Versuchsprotokolls wurde aus ökonomischen und zeitlichen Gründen nicht durchgeführt. Bei einer Wiederaufnahme der Versuche wäre vorerst eine Wiederholung des gezeigten erfolgreichen Knockdowns mit Off-Target-Effekten sinnvoll, da dieser auf einer einzigen Versuchsdurchführung beruht. Im Anschluss sollte das Lipofektions-Protokoll und insbesondere die siRNA-Konzentration weiter optimiert werden. Außerdem könnte auch der verwendete siRNA-

Pool in Zusammenarbeit mit dem Hersteller angepasst werden, um die Off-Target-Effekte zu verringern.

#### **4.4 Einfluss von CLN7 auf das Monozyten-Makrophagen-System**

In verschiedenen Makrophagen-Zelllinien wurden tubuläre Lysosomen nachgewiesen, (77), welche, wie in laborinternen Arbeiten gezeigt, auch in CLN7-überexprimierenden HEK293T-Zellen zu finden sind und selbst das CLN7-Protein enthalten. Deshalb sollten THP-1-Zellen selbst sowie aus diesen mit Phorbol 12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzierte Zellen mit zwei verschiedenen fluoreszierenden CLN7-Plasmiden transfiziert werden. Die Schritte der Differenzierung und der Transfektion erfolgten in Abhängigkeit von der verwendeten Transfektionsmethode in unterschiedlicher Reihenfolge, da die zu Makrophagen differenzierten Zellen sich aufgrund ihrer Adhärenz mit der Lipofektion transfizieren lassen, jedoch nicht elektroporieren können.

Das EGFP-CLN7-C1-Plasmid führt zur Überexpression einer EGFP-gekoppelte Variante von CLN7. Das durch Umklonierung erstellte pIRES-AcGFP-CLN7-Plasmid hingegen verursacht die Koexpression des nichtfusionierten CLN7-Wildtypproteins und des Markers AcGFP. Mittels dieser Transfektionen sollten die zuvor beschriebenen tubulären Lysosomen auch in THP-1-Zellen bzw. den aus ihnen generierten Makrophagen gezeigt werden. Zur Transfektion wurden die Methoden der Lipofektion und Elektroporation angewendet. In beiden Versuchsgruppen waren (ebenso wie in den Abschnitt 4.3 diskutierten Vorversuchen mit dem GFP-Plasmid) in der Fluoreszenzmikroskopie keine oder kaum fluoreszierenden Zellen sichtbar (siehe Abbildung 8). Daraus kann geschlossen werden, dass eine Transfektion entweder nicht gelungen ist oder aber die Überexpression von CLN7 im Falle einer erfolgreichen Transfektion zum Zelluntergang führte.

Eine weitere interessante Beobachtung waren nicht erwartete Nebeneffekte auf die Zellen. Jene Zellen, die nach ihrer Differenzierung zu Makrophagen mittels Lipofektion mit AcGFP- und EGFP-CLN7 transfiziert wurden, zeigten eine andere Morphologie als die Zellen der Negativkontrolle, die nach der Differenzierung nicht transfiziert wurden. Erstere zeichneten sich durch ihre Adhärenz und eine verflachte Form mit Zellefortsätzen aus. Die Zellen der Negativkontrolle waren zwar ebenfalls adharent, in

ihrer Form jedoch eher kugelig ohne Fortsätze (siehe Abbildung 8). Die Adhärenz der beiden Gruppen deutet darauf hin, dass die Differenzierung zu M0-Makrophagen aus den THP-1-Zellen erfolgreich war. Die transiente Transfektion scheint jedoch einen Einfluss auf die weitere Differenzierung gehabt zu haben. So ist die kugelige Form der Negativkontrolle typisch für M0-Makrophagen, sodass die Schlussfolgerung naheliegt, dass diese Zellen sich nicht weiter differenziert haben. Die im Gegensatz dazu verflachte Form der transfizierten Zellen ist eher charakteristisch für M1- und M2-Makrophagen (99, 100). Diese differenzieren sich typischerweise durch den Einfluss verschiedener aktivierender Stimuli aus M0-Makrophagen (80). Wahrscheinlich hat der Transfektionsprozess eine solche Aktivierung der Zellen verursacht. Dies ist nicht untypisch, da Makrophagen ebenso wie THP-1-Zellen schwer zu transfizierende Zellen sind, die durch ihre *Pattern Recognition Receptors* transfizierte Nukleinsäuren und Transfektionsreagenzen als fremd erkennen (118, 119). Die Transfektion führt somit zu einer Aktivierung der Zellen oder zum Zelltod. Dies wurde insbesondere für Lipofectamine nachgewiesen (120). Ob die beobachtete Reaktion durch das Plasmid und/oder das Transfektionsreagenz verursacht wurde, könnte durch eine Mock-Kontrolle näher untersucht werden, in der die M0-Makrophagen dem Transfektionsprozedere ausgesetzt werden, ohne dass ein Plasmid hinzugefügt wird. Da die Versuchsreihe jedoch abgebrochen wurde, war die Beantwortung dieser Frage nicht mehr möglich.

Auch die Anwendung der Elektroporation resultierte in Zellen mit einer veränderten Morphologie: Die THP-1-Zellen wiesen eine stark granuläre Struktur auf, außerdem waren in der Zellsuspension vermehrt Überreste untergegangener Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 9). Für dieses Resultat gibt es zwei mögliche Ursachen: so kann entweder die Elektroporation selbst oder aber die erfolgreiche Transfektion der CLN7-Plasmide zelltoxisch gewirkt haben. Zur Beantwortung dieser Frage können die in Abschnitt 4.2 diskutierten Vorversuche herangezogen werden: Hier wurde die Elektroporation mit dem GFP-Plasmid durchgeführt, da keine durch die Expression von GFP selbst bedingten zytotoxischen Effekte bekannt sind, während diese für das EGFP-CLN7- Fusionsprotein nicht ausgeschlossen werden können. Auch infolge der Transfektion mit GFP traten jedoch zytotoxische Effekte auf (siehe Abbildung 7), sodass angenommen werden kann, dass die Elektroporation selbst die Ursache für

Zellveränderungen und Zelluntergang war. Diese Beobachtung ist nicht untypisch, da die Elektroporation durch die Porenbildung in der Zellmembran, die Zerstörung von Membranproteinen und Lipidperoxidation zu Zellschäden führen kann (121). Diese Effekte werden sogar therapeutisch zur Behandlung von Tumorerkrankungen genutzt (122). Um bei der Transfektion von Zellen derartige Prozesse zu vermeiden, muss die Stärke, Dauer und Anzahl der elektrischen Impulse an die jeweilige Zelllinie angepasst und optimiert werden. In den hier durchgeführten Versuchen wurden diese Parameter an ein zuvor im Rahmen anderer Versuche erfolgreiches Protokoll angelehnt. Prinzipiell wäre eine weitere Optimierung der Transfektionsbedingungen möglich gewesen, aufgrund der geringen Erfolgsaussichten mit den zur Verfügung stehenden Methoden wurden die Elektroporations-Versuche jedoch nicht fortgesetzt. Berichte erfolgreicher Transfektionen von DNA in THP-1-Zellen sind fast ausschließlich bei Anwendung der Nukleofektion als Transfektionsmethode zu finden. Nukleofektion ist eine auf Elektroporation basierende Transfektionsmethode, die ein Nukleofector-Gerät und zelltypspezifische Lösungen verwendet. Auch hier müssen die Transfektionsbedingungen sorgfältig optimiert werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen Elektroporation transportiert Nukleofektion die DNA direkt in den Zellkern anstatt nur in das Zytoplasma. Dadurch kann die Expression des transfizierten Proteins bereits kurz nach der Nukleofektion nachgewiesen werden (123-128). Im Falle einer Fortführung der Versuche wäre diese Vorgehensweise vielversprechend. Auch Transfektionen mit viralen Vektoren scheinen prinzipiell möglich, sind jedoch aufwändig, kostenintensiv und verursachen bislang nicht vollständig verstandene und unkalkulierbare Nebeneffekte (128, 129).

#### **4.5 Abschließende Betrachtung**

Die Durchführung der Versuche wurde durch mehrere Hindernisse beeinträchtigt. Monozytäre Vorläuferzellen und aus ihnen differenzierte Makrophagen zeichnen sich durch eine hohe Transfektionsresistenz aus (118, 119). Dies verhinderte die CLN7-Transfektion in THP-1-Zellen unter Wahrung eines angemessenen Zeit- und Kostenaufwands. Auch die Generierung einer CLN7-defizienten THP-1-Zelllinie mittels RNA-Interferenz wurde durch diese Hürde erschwert, sodass sich ein CLN7-Knockout nur mit signifikanten Off-Target-Effekten erreichen ließ. Zusätzlich wurde die Durchführung der Laborarbeiten durch die COVID-19-Pandemie erheblich behindert.

Trotz dieser Schwierigkeiten konnte im Rahmen der Versuche eine um etwa 40 % reduzierte ACE2-Expression in CLN7-defizienten Zellen nachgewiesen werden, was möglicherweise die von Heinl et al. gezeigte geringere SARS-CoV-2-Viruslast nach einer Infektion dieser Zellen erklären kann (55). Die verringerte ACE2-Expression könnte indirekt durch eine gestörte Funktion der Lipid Rafts in CLN7-defizienten Zellen bedingt sein. Diese These wird gestützt durch die in dieser Arbeit erlangten Hinweise auf eine reduzierte Menge an freiem Cholesterin in CLN7-Knockout-Zellen.

Die Arbeit sollte die Rolle von CLN7 bei immunologischen Vorgängen mit besonderem Fokus auf SARS-CoV-2 und den Cholesterinstoffwechsel untersuchen. Das Transmembranprotein CLN7 ist bei der CLN7-Erkrankung von Bedeutung, einer lysosomalen Speicherstörung, die zu fortschreitender Neurodegeneration und frühem Tod führt. Die bisherige Unkenntnis über die physiologische Funktion des Proteins stellt eine zentrale Herausforderung für die Entwicklung kurativer Behandlungen dar. Trotz der aufgetretenen Schwierigkeiten bieten die Ergebnisse Ansatzpunkte für zukünftige Forschungen mit alternativen Methoden.

## 5 Zusammenfassung

Das CLN7-Protein und das gleichnamige Gen sind aufgrund ihrer Rolle bei der neurodegenerativen CLN7-Erkrankung von wissenschaftlichem Interesse. Diese lysosomale Speicherkrankheit ohne kurative Behandlungsmöglichkeit führt zu einer progredienten Neurodegeneration und zum Versterben im Kindes- oder Jugendalter (26). Die meisten Forschungsarbeiten zielen darauf ab, die bisher weitgehend unbekannte Funktion des Proteins und dazugehörige pathophysiologische Mechanismen zu verstehen. Diese Dissertation untersuchte die Rolle von CLN7 bei immunologischen Prozessen mit besonderem Fokus auf den Cholesterinstoffwechsel sowie SARS-CoV-2 und dessen Rezeptor ACE2.

Da die Viruslast von mit SARS-CoV-2 infizierten HEK293T-Zellen in Zusammenhang mit der CLN7-Expression steht (55), wurden die ACE2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch quantifiziert. So konnte eine um etwa 40 % reduzierte ACE2-Expression in CLN7-defizienten HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Dies könnte die geringere Viruslast erklären und auf einer gestörten Funktion von Lipid Rafts beruhen. Der Verdacht auf eine solche Störung der Lipid Rafts bei CLN7-Mangel wurde auch durch die durchflusszytometrische Messung freien Cholesterins in CLN7-Knockout-HEK293T-Zellen erhärtet: Hier zeigte sich in der Tendenz ein im Vergleich zum Wildtyp geringerer Cholesteringehalt. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Ursächlich dafür könnten die geringe Stichprobengröße sowie die methodischen Herausforderungen in der Arbeit mit dem Farbstoff Filipin III sein. In einer weiteren Versuchsreihe sollte mittels RNA-Interferenz eine CLN7-defiziente THP-1-Zelllinie generiert werden, da es Hinweise darauf gibt, dass CLN7 in immunologische Prozesse eingebunden ist. Es konnte ein 1.200-facher Gen-Knockdown erreicht werden, jedoch kam es dabei zu signifikanten Off-Target-Effekten. Die geplante CLN7-Transfektion zur Erschaffung CLN7-überexprimierender THP-1-Zellen scheiterte an der hohen Transfektionsresistenz monozytärer Vorläuferzellen und der aus ihnen differenzierten Makrophagen.

Trotz der aufgetretenen Herausforderungen liefern die Ergebnisse wertvolle Ansatzpunkte, die in zukünftigen Forschungsarbeiten mit verbesserten oder alternativen Methoden weiterverfolgt und vertieft werden können, um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der CLN7-Erkrankung zu erlangen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sagne C, Gasnier B. Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *Journal of inherited metabolic disease*. 2008;31(2):258-66.
2. Mindell JA. Lysosomal acidification mechanisms. *Annual review of physiology*. 2012;74:69-86.
3. Yim WW-Y, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy. *Cell discovery*. 2020;6(1):1-12.
4. Sorkin A, Puthenveedu MA. Clathrin-Mediated Endocytosis. In: Yarden Y, Tarcic G, editors. *Vesicle Trafficking in Cancer*. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 1-31.
5. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78(1):857-902. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540. PubMed PMID: 19317650.
6. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *The EMBO journal*. 2011;30(17):3481-500.
7. Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tifft CJ. Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;4(1):27.
8. Jalanko A, Braulke T. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2009;1793(4):697-709.
9. Sinha S, Satishchandra P, Santosh V, Gayatri N, Shankar S. Neuronal ceroid lipofuscinoses: a clinicopathological study. *Seizure*. 2004;13(4):235-40.
10. Elleder M, Sokolova J, Hřebíček M. Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase (SCMAS) in Batten disease and in unrelated lysosomal disorders. *Acta neuropathologica*. 1997;93(4):379-90.
11. Tyynelä J, Palmer DN, Baumann M, Haltia M. Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinoses. *FEBS letters*. 1993;330(1):8-12.
12. Kitaguchi T, Wisniewski K, Maslinski S, Maslinska D, Wisniewski T, Kim K.  $\beta$ -Protein immunoreactivity in brains of patients with neuronal ceroid lipofuscinoses: ultrastructural and biochemical demonstration. *Neuroscience letters*. 1990;112(2-3):155-60.
13. Radke J, Stenzel W, Goebel HH. Human NCL neuropathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(10):2262-6.
14. Anderson GW, Goebel HH, Simonati A. Human pathology in NCL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(11):1807-26.
15. Santavuori P. Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood. *Brain and Development*. 1988;10(2):80-3.
16. Rider JA, Rider DL, Opitz JM, Reynolds JF, Pullarkat RK. Batten disease: past, present, and future. *American Journal of Medical Genetics*. 1988;31(S5):21-6.
17. University College London. Mutation and Patient Database 1998 [updated 2020-022023-01-11]. Available from: <https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/mutation-and-patient-database>.
18. Mole SE, Cotman SL. Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(10):2237-41.
19. Sondhi D, Kaminsky SM, Hackett NR, Pagovich OE, Rosenberg JB, De BP, et al. Slowing late infantile Batten disease by direct brain parenchymal administration of a rh. 10 adeno-associated virus expressing CLN2. *Science translational medicine*. 2020;12(572):eabb5413.
20. Bosch ME, Aldrich A, Fallet R, Odvody J, Burkovetskaya M, Schuberth K, et al. Self-complementary AAV9 gene delivery partially corrects pathology associated with juvenile neuronal ceroid lipofuscinoses (CLN3). *Journal of Neuroscience*. 2016;36(37):9669-82.
21. Cain JT, Likhite S, White KA, Timm DJ, Davis SS, Johnson TB, et al. Gene therapy corrects brain and behavioral pathologies in CLN6-Batten disease. *Molecular Therapy*. 2019;27(10):1836-47.
22. Neverman NJ, Best HL, Hofmann SL, Hughes SM. Experimental therapies in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(10):2292-300.

23. Siintola E, Topcu M, Aula N, Lohi H, Minassian BA, Paterson AD, et al. The novel neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 encodes a putative lysosomal transporter. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;81(1):136-46.
24. Pao SS, Paulsen IT, Saier Jr MH. Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1998;62(1):1-34.
25. Wang Y, Zeng W, Lin B, Yao Y, Li C, Hu W, et al. CLN7 is an organellar chloride channel regulating lysosomal function. *Sci Adv*. 2021;7(51):eabj9608. doi: 10.1126/sciadv.abj9608. PubMed PMID: 34910516; PubMed Central PMCID: PMC8673761.
26. Mandel H, Katsanelson KC, Khayat M, Chervinsky I, Vladovski E, Iancu TC, et al. Clinico-pathological manifestations of variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (vLINCL) caused by a novel mutation in MFSD8 gene. *European Journal of Medical Genetics*. 2014;57(11-12):607-12.
27. Kousi M, Siintola E, Dvorakova L, Vlaskova H, Turnbull J, Topcu M, et al. Mutations in CLN7/MFSD8 are a common cause of variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain*. 2009;132(3):810-9.
28. Topçu M, Tan H, Yalnizoğlu D, Usubütün A, Saatçi I, Aynaci M, et al. Evaluation of 36 patients from Turkey with neuronal ceroid lipofuscinosis: clinical, neurophysiological, neuroradiological and histopathologic studies. *The Turkish journal of pediatrics*. 2004;46(1):1-10. Epub 2004/04/13. PubMed PMID: 15074367.
29. Khan KN, El-Asrag ME, Ku CA, Holder GE, McKibbin M, Arno G, et al. Specific alleles of CLN7/MFSD8, a protein that localizes to photoreceptor synaptic terminals, cause a spectrum of nonsyndromic retinal dystrophy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(7):2906-14.
30. Roosing S, van den Born LI, Sangermano R, Banfi S, Koenekoop RK, Zonneveld-Vrieling MN, et al. Mutations in MFSD8, encoding a lysosomal membrane protein, are associated with nonsyndromic autosomal recessive macular dystrophy. *Ophthalmology*. 2015;122(1):170-9.
31. Geier EG, Bourdenx M, Storm NJ, Cochran JN, Sirkis DW, Hwang J-H, et al. Rare variants in the neuronal ceroid lipofuscinosis gene MFSD8 are candidate risk factors for frontotemporal dementia. *Acta neuropathologica*. 2019;137(1):71-88.
32. Huang L, Liu Z, Yuan Y, Shen L, Jiang H, Tang B, et al. Mutation analysis of MFSD8 in an amyotrophic lateral sclerosis cohort from mainland China. *European Journal of Neuroscience*. 2021;53(4):1197-206.
33. Brudvig JJ, Weimer JM. On the cusp of cures: breakthroughs in Batten disease research. *Current Opinion in Neurobiology*. 2022;72:48-54.
34. Greenberg B, National Library of Medicine. Study for the Treatment for CLN7 Disease (CLN7) 2021 [updated 2022-10-04; cited 2023 2023-01-05]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04737460>.
35. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*. 2020;5(4):536-44.
36. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*. 2020;395(10223):497-506.
37. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [cited 2023 2023-01-15].
38. Robert-Koch-Institut. Epidemiologischer Steckbrief zu SARS-CoV-2 und COVID-19 [updated 2021-11-26; cited 2023 2023-01-15].
39. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [updated 2023-01-13; cited 2023 2023-01-15].
40. Virology: Coronaviruses. *Nature*. 1968;220(5168):650.
41. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*. 2020;181(2):271-80. e8.

42. Kuba K, Imai Y, Penninger JM. Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. *Circulation Journal*. 2013;77(2):301-8.
43. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(14):5871-6. doi: doi:10.1073/pnas.0809524106.
44. Zhao M-M, Yang W-L, Yang F-Y, Zhang L, Huang W-J, Hou W, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1):1-12.
45. Hashimoto R, Sakamoto A, Deguchi S, Yi R, Sano E, Hotta A, et al. Dual inhibition of TMPRSS2 and Cathepsin B prevents SARS-CoV-2 infection in iPS cells. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2021;26:1107-14.
46. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*. 2020;370(6518):856-60.
47. Wang K, Chen W, Zhang Z, Deng Y, Lian J-Q, Du P, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5(1):1-10.
48. Bayati A, Kumar R, Francis V, McPherson PS. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;296.
49. Sui Y, Li J, Venzon DJ, Berzofsky JA. SARS-CoV-2 spike protein suppresses ACE2 and type I interferon expression in primary cells from macaque lung bronchoalveolar lavage. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:658428.
50. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong J-C, Turner AJ, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circulation research*. 2020;126(10):1456-74.
51. Laurent EM, Sofianatos Y, Komarova A, Gimeno J-P, Tehrani PS, Kim D-K, et al. Global BioID-based SARS-CoV-2 proteins proximal interactome unveils novel ties between viral polypeptides and host factors involved in multiple COVID19-associated mechanisms. *BioRxiv*. 2020;2020.08.28.272955.
52. Stukalov A, Girault V, Grass V, Karayel O, Bergant V, Urban C, et al. Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Nature*. 2021;594(7862):246-52.
53. Ghosh S, Dellibovi-Ragheb TA, Kerviel A, Pak E, Qiu Q, Fisher M, et al.  $\beta$ -Coronaviruses use lysosomes for egress instead of the biosynthetic secretory pathway. *Cell*. 2020;183(6):1520-35. e14.
54. Homolak J, Kodvanj I. Widely available lysosome targeting agents should be considered as potential therapy for COVID-19. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;56(2):106044.
55. Heinl E-S, Lorenz S, Schmidt B, Laqtom NNM, Mazzulli JR, Francelle L, et al. CLN7/MFSD8 may be an important factor for SARS-CoV-2 cell entry. *Iscience*. 2022;25(10):105082.
56. Lu Y, Liu DX, Tam JP. Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;369(2):344-9. Epub 2008/02/19. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.023. PubMed PMID: 18279660; PubMed Central PMCID: PMC7092920.
57. Fantini J, Chahinian H, Yahi N. Synergistic antiviral effect of hydroxychloroquine and azithromycin in combination against SARS-CoV-2: What molecular dynamics studies of virus-host interactions reveal. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;56(2):106020.
58. Goldstein JL, Brunschede G, Brown M. Inhibition of proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concanavalin A, and Triton WR 1339. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(19):7854-62.
59. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232(4746):34-47.
60. Goldstein J, Dana S, Faust J, Beaudet A, Brown M. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesterol ester storage disease. *Journal of Biological Chemistry*. 1975;250(21):8487-95.
61. Liscum L, Munn NJ. Intracellular cholesterol transport. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1438(1):19-37.

62. Colbeau A, Nachbaur J, Vignais P. Enzymac characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1971;249(2):462-92.
63. Mohammad S, Parmryd I. Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778(5):1251-8.
64. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *science*. 2010;327(5961):46-50.
65. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2007;1768(6):1311-24.
66. Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Breitmayer J-P, Aussel C. Revaluation of the role of cholesterol in stabilizing rafts implicated in T cell receptor signaling. *Cellular signalling*. 2006;18(1):105-22.
67. Parton RG, Richards AA. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. 2003;4(11):724-38.
68. Hanzal-Bayer MF, Hancock JF. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS letters*. 2007;581(11):2098-104.
69. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):31-9.
70. Mañes S, del Real G, Martínez-a C. Pathogens: raft hijackers. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(7):557-68.
71. Michel V, Bakovic M. Lipid rafts in health and disease. *Biology of the Cell*. 2007;99(3):129-40.
72. Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*. 2017;545(7655):505-9.
73. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, et al. The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell*. 2015;162(2):425-40.
74. Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, et al. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell*. 2021;184(11):3022-40. e28.
75. National Center for Biotechnology Information. Entrez Gene: HLA-DQA1 major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1 [Homo sapiens (human)] [updated 2023-01-12; cited 2023-01-25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd>ShowDetailView&TermToSearch=3117>.
76. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present yourself! By MHC class I and MHC class II molecules. *Trends in immunology*. 2016;37(11):724-37.
77. Swanson J, Bushnell A, Silverstein SC. Tubular lysosome morphology and distribution within macrophages depend on the integrity of cytoplasmic microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(7):1921-5.
78. Swanson J, Burke E, Silverstein SC. Tubular lysosomes accompany stimulated pinocytosis in macrophages. *The Journal of cell biology*. 1987;104(5):1217-22.
79. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;26(2):171-6. doi: 10.1002/ijc.2910260208. PubMed PMID: 6970727.
80. Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HF, Wickers HJ. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct*. 2013;4(2):266-76. doi: 10.1039/c2fo30156c. PubMed PMID: 23135314.
81. Chanput W, Mes JJ, Wickers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37-45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002. PubMed PMID: 25130606.

82. Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, et al. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun.* 2014;5:4767. doi: 10.1038/ncomms5767. PubMed PMID: 25182477; PubMed Central PMCID: PMC4166678.
83. Graham FL, Smiley J, Russell W, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of general virology.* 1977;36(1):59-72.
84. Major EO. Human papovavirus infection of an SV40-transformed human embryonic kidney cell line. *Progress in clinical and biological research.* 1983;105:15-27.
85. Glazer AN. Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology.* 1994;6(2):105-12. doi: 10.1007/bf02186064.
86. George B, Whitfield TDB, Alfred Ammann, David Gottlieb, and Herbert E. Carter. Filipin, an Antifungal Antibiotic: Isolation and Properties. *Journal of the American Chemical Society.* 1955;77(18):4799-801. doi: 10.1021/ja01623a032.
87. Bergy ME, Eble TE. Filipin complex. *Biochemistry.* 1968;7(2):653-9.
88. Maxfield FR, Wustner D. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. *Methods Cell Biol.* 2012;108:367-93. doi: 10.1016/B978-0-12-386487-1.00017-1. PubMed PMID: 22325611; PubMed Central PMCID: PMC3626500.
89. Kruth HS, Comly ME, Butler JD, Vanier MT, Fink JK, Wenger DA, et al. Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry.* 1986;261(35):16769-74. doi: 10.1016/s0021-9258(18)66632-3.
90. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1987;84(21):7413-7.
91. Elouahabi A, Ruysschaert J-M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Molecular therapy.* 2005;11(3):336-47.
92. Tang X, Aljahdali B, Alasiri M, Bamashmous A, Cao F, Dibart S, et al. A method for high transfection efficiency in THP-1 suspension cells without PMA treatment. *Anal Biochem.* 2018;544:93-7. doi: 10.1016/j.ab.2017.12.032. PubMed PMID: 29305095.
93. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider P. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal.* 1982;1(7):841-5.
94. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature.* 1998;391(6669):806-11.
95. Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003;115(2):199-208.
96. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004;305(5689):1437-41.
97. Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature.* 2009;457(7228):396-404.
98. Bortz J, Schuster C. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler: Limitierte Sonderausgabe: Springer-Verlag; 2011.
99. Zhang Y, Shi L, Mei H, Zhang J, Zhu Y, Han X, et al. Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. *Nutrition & metabolism.* 2015;12(1):1-14.
100. Wheeler KC, Jena MK, Pradhan BS, Nayak N, Das S, Hsu C-D, et al. VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PloS one.* 2018;13(1):e0191040.
101. Atger VM, de la Llera Moya M, Stoudt GW, Rodriguez WV, Phillips MC, Rothblat GH. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. *The Journal of clinical investigation.* 1997;99(4):773-80.
102. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature.* 2020;579(7798):270-3.

103. Gao S, Zhang L. ACE2 partially dictates the host range and tropism of SARS-CoV-2. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020;18:4040-7.
104. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *The lancet respiratory medicine*. 2020;8(4):e21.
105. Esler M, Esler D. Can angiotensin receptor-blocking drugs perhaps be harmful in the COVID-19 pandemic? *Journal of hypertension*. 2020;38(5):781-2.
106. Zhou L, Niu Z, Jiang X, Zhang Z, Zheng Y, Wang Z, et al. Systemic analysis of tissue cells potentially vulnerable to SARS-CoV-2 infection by the protein-proofed single-cell RNA profiling of ACE2, TMPRSS2 and Furin proteases. *BioRxiv*. 2020:2020.04. 06.028522.
107. Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *European journal of internal medicine*. 2020;76:14-20.
108. Chaudhry F, Lavandero S, Xie X, Sabharwal B, Zheng Y-Y, Correa A, et al. Manipulation of ACE2 expression in COVID-19. *Open Heart*. 2020;7(2):e001424.
109. Yalcin HC, Sukumaran V, Al-Ruweidi MKA, Shurbaji S. Do changes in ACE-2 expression affect SARS-CoV-2 virulence and related complications: a closer look into membrane-bound and soluble forms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(13):6703.
110. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1-7). *Physiological reviews*. 2017.
111. Arthur JR, Heinecke KA, Seyfried TN. Filipin recognizes both GM1 and cholesterol in GM1 gangliosidosis mouse brain. *Journal of lipid research*. 2011;52(7):1345-51.
112. Van Heyningen S. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science*. 1974;183(4125):656-7.
113. Fleischmann KK, Pagel P, von Frowein J, Magg T, Roscher AA, Schmid I. The leukemogenic fusion gene MLL-AF9 alters microRNA expression pattern and inhibits monoblastic differentiation via miR-511 repression. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2016;35:1-15.
114. Pakula R, Melchior A, Denys A, Vanpouille C, Mazurier J, Allain F. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. *Glycobiology*. 2007;17(5):492-503.
115. Vanpouille C, Deligny A, Delehedde M, Denys A, Melchior A, Liénard X, et al. The heparin/heparan sulfate sequence that interacts with cyclophilin B contains a 3-O-sulfated N-unsubstituted glucosamine residue. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(33):24416-29.
116. Wenzel M, Wunderlich M, Besch R, Poeck H, Willms S, Schwantes A, et al. Cytosolic DNA triggers mitochondrial apoptosis via DNA damage signaling proteins independently of AIM2 and RNA polymerase III. *The Journal of Immunology*. 2012;188(1):394-403.
117. Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(1):57-67.
118. Kariko K, Weissman D. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2007;10(5):523.
119. Van De Parre TJ, Martinet W, Schrijvers DM, Herman AG, De Meyer GR. mRNA but not plasmid DNA is efficiently transfected in murine J774A. 1 macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;327(1):356-60.
120. Guo X, Wang H, Li Y, Leng X, Huang W, Ma Y, et al. Transfection reagent Lipofectamine triggers type I interferon signaling activation in macrophages. *Immunology and cell biology*. 2019;97(1):92-6. Epub 2018/08/08. doi: 10.1111/imcb.12194. PubMed PMID: 30084169.
121. Napotnik TB, Polajžer T, Miklavčič D. Cell death due to electroporation—a review. *Bioelectrochemistry*. 2021;141:107871.

122. Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, Puijk RS, et al. High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy. *Radiology*. 2020;295(2):254-72.
123. Troegeler A, Lastrucci C, Duval C, Tanne A, Cougoule C, Maridonneau-Parini I, et al. An efficient siRNA-mediated gene silencing in primary human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Immunology and cell biology*. 2014;92(8):699-708. doi: 10.1038/icb.2014.39. PubMed PMID: 24890643.
124. Maess MB, Buers I, Robenek H, Lorkowski S. Improved protocol for efficient nonviral transfection of premature THP-1 macrophages. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011;2011(5):pdb prot5612. doi: 10.1101/pdb.prot5612. PubMed PMID: 21536764.
125. Martinet W, Schrijvers DM, Kockx MM. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnology letters*. 2003;25:1025-9.
126. Scherer O, Maess MB, Lindner S, Garscha U, Weinigel C, Rummler S, et al. A procedure for efficient non-viral siRNA transfection of primary human monocytes using nucleofection. *J Immunol Methods*. 2015;422:118-24. doi: 10.1016/j.jim.2015.04.007. PubMed PMID: 25891792.
127. Keller AA, Schnoor M., Scheiding B., Lorkowski S. Transfecting Macrophages. *Methods in Molecular Biology*, vol 17842018.
128. Schnoor M, Buers I, Sietmann A, Brodde MF, Hofnagel O, Robenek H, et al. Efficient non-viral transfection of THP-1 cells. *Journal of immunological methods*. 2009;344(2):109-15.
129. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2003;4(5):346-58.

