Untersuchung der funktionellen Konsequenzen eines siRNA-vermittelten Degs1-Knockdowns in primären kortikalen Neuronen in vitro

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Gina Marie Wünsch

aus

Lünen

Berichter: Univ.-Prof. Dr. med. Ingo Kurth
Jun.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Juliane Bremer

Tag der mündlichen Prüfung : 31.08.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis **1**

1. Einleitung **1**

1.1 Leukodystrophien 1

1.1.1 Klinik der *DEGS1*-assoziierten Leukodystrophie 2

1.2 Physiologie von Sphingolipiden 6

1.2.1 Ceramide und ihre Funktionen 6

1.2.2 Ceramidbiosynthese 7

1.2.3 Krankheitsassoziierte Störungen des Ceramid-Metabolismus 8

1.2.4 Delta-4-Desaturase (DEGS1) und Dihydroceramide 9

1.2.5 Bedeutung der Sphingolipide für Neuronen 12

1.3 Experimentelle Strategien zur Expressionsregulation von Degs1 *in vitro* 13

1.4 Zielstellung 15

2. Material **16**

2.1 Tierstämme 16

2.2 shRNA/Primer Sequenzen 16

2.3 Chemikalien und Laborreagenzien 17

2.4 Antikörper 19

2.5 Restriktionsendonukleasen 20

2.6 Geräte 20

2.7 Verbrauchsmaterialien 21

2.8 Kits 22

2.9 Software 22

3. Methoden **22**

3.1 Molekularbiologische Methoden - Klonierungsmethoden 22

3.1.1 Design der shRNA-Oligonukleotide 22

3.1.2 Oligo-Annealing shRNA3 und *scrambled* 23

3.1.3 Oligo-Annealing shRNA1 und 2 24

3.1.4 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung 24

3.1.5 Ligationsreaktion 25

3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* (E. coli) 25

3.1.7 Transformation in chemisch kompetente E. Coli 26

3.1.8 Plasmidisolierung mittels TELT-Methode 27

3.1.9 Sequenzierungs-PCR 28

3.1.10 Analytischer Restriktionsverdau 28

3.1.11 DNA-Gelelektrophorese 28

3.2 Zellkultur 29

3.2.1 Präparation und Kultivierung primärer kortikaler Neurone 29
3.2.2 Kultivierung von N2a-Zellen 30
3.3 Zellbiologische Methoden 30
3.3.1 PolyJet Transfektion 30
3.3.2 Transfektion mittels Lipofektion 31
3.3.3 Transfektion mittels Calciumchlorid ($CaCl_2$) 32
3.3.4 Transfektion der primären embryonalen Kortexneuronen 32
3.3.5 Herstellung RNA-Lysate 33
3.3.6 Herstellung von Ganzzellextrakten (Proteinlysate) 34
3.4 Biochemische Methoden 34
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 34
3.4.2 *Semi Dry* Western Blot 35
3.4.3 cDNA-Synthese und quantitative PCR (qPCR) 37
3.4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung 37
3.5 Immunzytochemische Methoden 38
3.5.1 Immunfärbung embryonaler Neurone 38
3.5.2 Immunfärbung transfizierter N2a-Zellen 39
3.6 Genutzte Software 40
4. Ergebnisse 42
4.1 Klonierung und Validierung der *Knockdown*-Effizienz der shRNA in N2a- Zellen 42
4.2 Validierung der Knockdown Effizienz von Degs1-siRNA mittels qPCR 48
4.3 Transfektion der Degs1-siRNA in primäre Maus-Neuronen 50
5. Diskussion 54
5.1 Experimentelle Ansätze/Strategien zur Modellierung genetischer Erkrankungen in vitro 54
5.2. Gestörte neuronale Entwicklung nach Degs1-siRNA *Knockdown* 56
5.3. Offene Fragen zur neuronalen Pathologie/Pathophysiologie bei Degs1-Dysfunktion 59
6. Zusammenfassung 61
Literaturverzeichnis 63
Danksagung 67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cer	Ceramid
ctrl-siRNA	Kontroll-siRNA
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
DEGS	Δ4-Dihydroceramid-Desaturase
d.h.	das heißt
dhCer	Dihydroceramid
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	*enhanced green fluorescent protein*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	*Fetal Calf Serum*, Fötales Kälberserum
FD	*Fast Digest*
g	Gramm
Glc	Glucose
HCl	Salzsäure
h	Stunde
HEK	*Human Embryonic Kidney cells*
HRP	Meerrettichperoxidase
H_2O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
KD	*Knockdown*
KD-siRNA	*Knockdown*-siRNA
kDa	Kilodalton
KO	*Knockout*
L	Liter

LD	Leukodystrophie
M	Molar
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
mM	Millimolar
mm	Millimeter
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
Na-Ac	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid/Natronlauge
NF-200	Neurofilament 200
ng	Nanogramm
NGS	*Normal Goat Serum*, Ziegennormalserum
Nr.	Nummer
N2a	Neuro-2a-Zellen
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PNK	Polynukleotidkinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
rpm	*rotations per minute*
s	Sekunde
SA	Sphinganin
scr	*scrambled*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Seq-PCR	Sequenzierungs-Polymerasekettenreaktion
shRNA	*small hairpin* RNA
siRNA	*small interfering* RNA

SL	Sphingolipid
SOC	*Super Optimal Broth with Catabolite repression* Medium
SPT	Serin-Palmitoyltransferase
SPTLC	Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N′,N′-Tetramethylethan-1,2-diamin
V	Volt
wt	Wildtyp/wildtypisch
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
%	Prozent
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Leukodystrophien

Leukodystrophien (LD) sind eine heterogene Gruppe hereditärer seltener Erkrankungen, die die weiße Substanz des Gehirns betreffen und so zu einer Störung der Myelinisierung führen. Im Rahmen der PIND-Studie wurden 349 Kinder mit diagnostizierten Leukodystrophien ermittelt, was einem geschätzten Lebenszeitrisiko von 31 pro 1 Million Lebendgeburten in Großbritannien entspricht. Auffällig war, dass viele betroffene Kinder aus konsanguinen Familien stammen (Stellitano, Winstone, van der Knaap, & Verity, 2016). Der häufigste LD-Subtyp ist die X-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie mit einer geschätzten Inzidenz von 1:17.000 (Bezman & Moser, 1998). Andere, häufige LDs sind die Metachromatische Leukodystrophie (Inzidenz 1:40.000 bis 1:100.000 in Nordeuropa und Amerika) (Ługowska, Ponińska, Krajewski, Broda, & Płosk, 2011) oder Morbus Krabbe (Inzidenz 1:100.000 in Europa, 1:250.000 in Amerika) (Jain & Jesus, 2023). Die in der Regel progredienten Erkrankungen betreffen zumeist das Myelin des zentralen Nervensystems (ZNS), können sich aber auch im peripheren Nervensystem manifestieren. Hierbei unterscheidet man zwei Formen: Die vorrangig demyelinisierende LD und die primär hypomyelinisierende LD mit einer Bildungsstörung des Myelins (awmf Leitlinie). Die hypomyelinisierenden Leukodystrophien sind durch einen primären Mangel an Myelinablagerungen gekennzeichnet (Wolf, Van der Knaap, & French-Constant, 2020). LD haben einen sehr variablen klinischen Verlauf, treten aber zumeist im Kindes- und Jugendalter auf. Das Auftreten im Erwachsenenalter ist seltener und kaum untersucht. Generell kann das klinische Bild der Leukodystrophien sehr variabel sein und von milden bis hin zu schweren kognitiven Einschränkungen reichen, wobei ein Auftreten mit schweren neurologischen Auffälligkeiten häufiger ist. Der klinische Verlauf der LD zeigt meist motorische und kognitive Beeinträchtigungen im frühen Kindesalter, welche sich progressiv verschlechtern (Parikh, et al., 2015). Neuere Konzepte zur Klassifikation von Leukodystrophien schließen auch transiente Symptomatiken ein, z.T. sogar mit vollständiger Remission der Symptome. Zudem ist nach aktueller Studienlage zu LDs die Einteilung in nur hypo- und demyelinisierende LDs nicht mehr ausreichend, da die LDs auch durch Defekte in Proteinen verursacht werden, die nicht mit der Myelinfunktion assoziiert sind

(Knaap & Bugiani, 2018). Ein Beispiel hierfür ist die hereditäre diffuse Leukoenzephalopathie mit Sphäroiden, die durch einen Defekt des Mikroglia-spezifischen Kolonie-stimulierenden Faktor 1-Rezeptors (CSF1R) verursacht wird und pathologisch durch eine vorherrschende Axonopathie gekennzeichnet ist (Rademakers, et al., 2011).

1.1.1 Klinik der *DEGS1*-assoziierten Leukodystrophie

Bisher sind 24 Patienten weltweit mit einer *DEGS1*-assoziierten hypomyelinisierenden Leukodystrophie (HLD18; OMIM ID#618404) bekannt, mit insgesamt 15 nachgewiesenen pathogenen Varianten. Klinisch zeigen alle bekannten Patienten einen auffälligen neurologischen Phänotyp bei meist unauffälligem Schwangerschaftsverlauf. Eine Funktionsstörung des Proteins konnte bisher allerdings nur bei einer Variante nachgewiesen werden (Karsai, et al., 2019). Es ist allerdings davon auszugehen, dass auch die anderen Varianten zu einer gestörten Proteinfunktion führen.

Karsai et al. (2019) beschreiben einen türkischstämmigen Patienten konsanguiner Eltern und mit gesunden Geschwistern. Der 1996 geborene Patient zeigte eine gemischt pyramidale und extrapyramidale Bewegungsstörung mit Spastiken, sowie eine globale Entwicklungsstörung. Die motorische Entwicklung des Patienten verlief bis zum sechsten Lebensmonat unauffällig. Im MRT zeigten sich eine globale Hypomyelinisierung, ein atrophes Cerebellum, sowie ein schwach ausgebildetes Corpus Callosum.

Das Körpergewicht und der Kopfumfang des Indexpatienten waren bei Geburt im Normbereich. Im Laufe seines Lebens entwickelte der Patient eine milde Mikrozephalie (53 cm bei der letzten Untersuchung im 21. Lebensjahr, -2.5 SD). Mittels Trio-Exomsequenzierung konnte beim Patienten eine homozygote *missense* Variante im *DEGS1*-Gen (NM_003676.3:c.839C>T, p.Ala280Val, Chr1(hg19):g.224380047C>T) nachgewiesen werden, welche zu einer Aminosäure-Substitution an Position 280 von Alanin zu Valin (p.Ala280Val) führt. Entsprechend eines autosomal-rezessiven Erbganges konnte sowohl bei den Eltern als auch den gesunden Geschwistern diese Variante heterozygot nachgewiesen werden.

Dolgin et al. beschreiben vier Patienten mit einer homozygoten *DEGS1* Variante. Die Patienten weisen alle eine komplexe neurologische Dysfunktion mit eingeschränkter kognitiver Entwicklung, spastischer Tetraplegie sowie mit

erhöhtem Tonus der Achillessehne auf. Drei der Patienten hatten zudem eine Epilepsie. Alle vier Geburten waren unauffällig mit leicht erhöhten Geburtsgewichten (zwischen 3500g und 3900g). Die Patienten entwickelten sich sowohl motorisch als auch kognitiv bis zum 8.bzw. bis zum 18. Monat normal. Danach kam es zu einem Regress bereits erlernter Fähigkeiten wie Sprechen oder Stehen. Das MRT eines der vier Betroffenen zeigte ein dünnes Corpus Callosum, sowie eine Erweiterung der Seitenventrikel (Dolgin, et al., 2019), ähnlich der in Pant et al. (2019) berichteten Patienten.

Pant et al. (2019) beschreiben den Phänotyp der Betroffenen als eine komplexe neurologische Dysfunktion mit einer hypomyelinisierenden LD. Auch hier war im MRT eine progressive Atrophie des Corpus Callosum, des Thalamus und des Cerebellums auffällig. 15 der 19 Patienten zeigten eine schwere motorische Einschränkung mit Dystonie und Spastiken. Bis auf einen wiesen alle Patienten schon im frühen Kindesalter einen Nystagmus und andere Augenprobleme auf. In 80% der Fälle wurden auch hier epileptische Anfälle beschrieben. Nur drei Fälle wiesen eine Mikrozephalie (<2 SD) auf. Die vier Patienten mit *nonsense*-Varianten (p.Trp107*, p.Tyr284*, p.Trp293*, p.Arg173*) verstarben im jungen Kindesalter, während die Patienten mit einer Restfunktion/-aktivität des DEGS1-Enzyms einen milderen Verlauf zeigten. Trotz des milderen Verlaufs entwickelte sich der motorische Regress rasch in einem Alter von 2 bis 16 Jahren.

Gemeinsam haben alle Patienten, dass sie eine komplexe neurologische Funktionsstörung mit motorischen Ausfällen und einer gestörten bis fehlenden Sprachentwicklung haben. Das MRT aller Betroffenen zeigt eine Atrophie des Corpus Callosum und weitere Hirnanomalien wie die namensgebende Hypomyelinisierung, cerebelläre Atrophie und ein genereller Verlust an grauer Hirnsubstanz. Die *DEGS1*-assoziierte HLD18 weist ein breites klinisches Spektrum an Symptomen auf. Allgemein lässt sich die *DEGS1*-assoziierte HLD18 jedoch von anderen Leukodystrophien durch den spezifischen Symptomkomplex, die radiologische Diagnostik und die genetische Diagnostik unterscheiden. Die fortschreitende Hypomyelinisierung ist lokalisiert auf bestimmte Hirnregionen wie das Corpus Callosum oder das Cerebellum. Anders ist das bei anderen LD wie der TUBB4-LD oder der PLP1-assoziierten LD, welche eher eine diffuse und nicht so rasch fortschreitende Hypomyelinisierung aufweisen (Pant, et al., 2019).

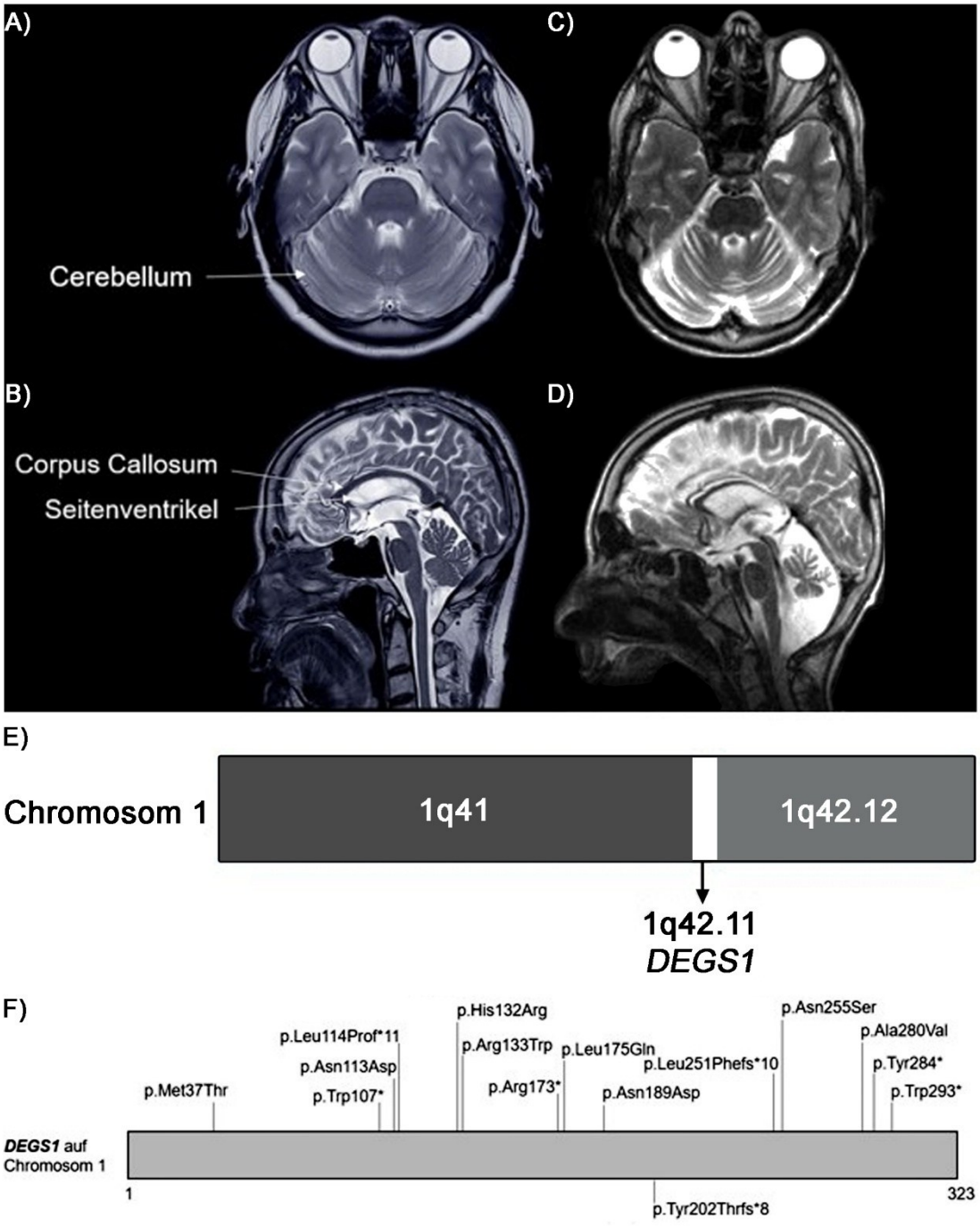


Abb. 1: MRT-Bildgebung zur Visualisierung von hirnmorphologischen Pathologien bei *DEGS1*-Defizienz und Lokalisation pathogener Varianten im *DEGS1*-Gen. (**A-B**) Die Bilder zeigen T2-gewichtete cMRT-Aufnahmen in Sagittal- und Transversalebene eines gesunden Erwachsenen (Quelle: https://www.med360grad.de/leistungsangebot/radiologie/leistungen/kernspintomographie-mrt/mrt-kopf/). (**C-D**) T2-gewichtete cMRT-Aufnahmen eines an einer *DEGS1*-Leukodystrophie erkrankten Patienten. Erkennbar ist eine schwere und langsam fortschreitende Kleinhirnatrophie mit Faserdegeneration der mittleren Kleinhirnstiele. Der Patient zeigt eine leichte kortikale Atrophie und eine dünne weiße Substanz, insbesondere in den posterioren Hirnregionen. (Bildquelle: Karsai et al 2019). (**E**) Chromosomale Lokalisation des *DEGS1*-Gens. (**F**) Pathogene

Varianten entsprechend ihrer Position im *DEGS1*-Protein. Met: Methionin, Thr: Threonin, Trp: Tryptophan, Asn: Asparagin, Asp: Asparaginsäure, Leu: Leucin, His: Histidin, Arg: Arginin, Gln: Glutamin, Tyr: Thyrosin, Ser: Serin, Ala: Alanin, Val: Valin.

Tab. 1: Auflistung aller bisher beschriebenen *DEGS1*-Varianten, n.b.: nicht beschrieben, Met: Methionin, Thr: Threonin, Trp: Tryptophan, Asn: Asparagin, Asp: Asparaginsäure, Leu: Leucin, His: Histidin, Arg: Arginin, Gln: Glutamin, Tyr: Thyrosin, Ser: Serin, Ala: Alanin, Val: Valin

Variante	**Mutationsart**	**Zygosität**	**Referenz**
c.110T>C, p.Met37Thr	*Missense*	*Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019
c.320G>A, p.Trp107*	*Nonsense*	Homozygot	Pant et al., JCI 2019
c.337A>G, p.Asn113Asp	*Missense*	Homozygot	Pant et al., JCI 2019
c.341_342delTT, p.Leu114Profs*11	*Frameshift*	*Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019
c.395A>G, p.His132Arg	*Missense*	Homozygot	Pant et al., JCI 2019
c.397C>T, p.Arg133Trp	*Missense*	*Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019
c.517C>T, p.Arg173*	*Nonsense*	Homozygot	Pant et al., JCI 2019
chr1:224377720T>A, p.Leu175Gln	*Missense*	n.b.	Blackburn et al., JLR 2019
c.565A>G, p.Asn189Asp	*Missense*	*Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019
c.604delT, p.Tyr202Thrfs*8	*Frameshift*	Homozygot	Pant et al., JCI 2019
c.752dupT, p.Leu251Phefs*10	*Frameshift*	*Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019
c.764A>G, p.Asn255Ser	*Missense*	Homozygot/ *Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019 Dolgin et al., EJHG 2019

c.839C>T, p.Ala280Val	*Missense*	Homozygot	Karsai et al., JCI 2019
c.852_855del, p.Tyr284*	*Nonsense*	Homozygot	Pant et al., JCI 2019
c.878G>A, p.Trp293*	*Nonsense*	*Compound* Heterozygot	Pant et al., JCI 2019

1.2 Physiologie von Sphingolipiden

Sphingolipide (SL) sind wichtige Bestandteile aller eukaryotischen Zellen und spielen eine entscheidende Rolle im Aufbau von Membranen, sowie für dynamische Prozesse wie Vesikeltransport und Zellmigration (Hannun & Obeid, 2018). Diese bioaktiven Lipide sind ein wichtiger Bestandteil von Myelin, einer fetthaltigen, von Schwann-Zellen (PNS) und Oligodendrozyten (ZNS) gebildeten Substanz. Myelinscheiden ummanteln die Axone von Neuronen und ermöglichen somit die korrekte und schnelle Weiterleitung elektrischer Signale (Aktionspotentiale). Die Myelinisierung ist für die Bildung und Funktion des zentralen Nervensystems von wesentlicher Bedeutung (James, et al., 2021) und ein fein regulierter Prozess, bei dem es zu Interaktionen zwischen Oligodendrozyten, Axonen, Astrozyten und Mikroglia kommt. SL sind essentiell für die Gehirnentwicklung, aber auch an Demyelinisierungsprozessen in bestimmten Krankheiten beteiligt (Giussani, Prinetti, & Tringali, 2021). Ein Ungleichgewicht an Sphingolipiden ist außerdem an weiteren Stoffwechselstörungen, kardiologischen und Tumor-Erkrankungen sowie Entzündungsreaktionen beteiligt (Pralhada Rao, 2013).

1.2.1 Ceramide und ihre Funktionen

Zunächst wurde angenommen, dass Ceramide hauptsächlich strukturelle Aufgaben übernehmen. Ceramide sind die essentiellen Bausteine aller Sphingolipide und eine Untergruppe der Lipide, welche eine wichtige Rolle in der Übertragung von Zellsignalen spielen (Perry & Hannun, 1998). Sie setzen sich zusammen aus einem Sphingosinmolekül, welches mit einer Fettsäure verestert ist. Diese kann in Länge, Hydroxylierung und in der Sphingoidbase variieren und determiniert so die SL-Klasse (Bikman & Summers, 2011). Inzwischen ist jedoch bekannt, dass Sphingolipide eine wichtige Rolle als bioaktive Lipide einnehmen (Canals, Salamone, & Hannun, 2018). Durch Stressstimuli wie Hypoxie,

Entzündungsmediatoren oder UV- Strahlung können sich die intrazellulären Sphingolipid-Spiegel z.T. stark verändern.

Hypoxie wird definiert als eine Minderversorgung des Körpers oder Gewebes mit Sauerstoff. Devlin et al. (Devlin, et al., 2011) beschreiben, dass Rattenlungen, die einer Hypoxie ausgesetzt wurden, nach kurzer Zeit eine erhöhte Produktion von Dihydroceramiden aufweisen. Dies führt zu einer Inhibition der Zellteilung von pulmonalen Zellen. Im Vergleich dazu war eine höhere Sauerstoffzufuhr nicht mit einem Anstieg von Ceramiden verknüpft (Devlin, et al., 2011). Auch ultraviolette (UV) Strahlung kann zu einer beschleunigten Bildung von Ceramiden durch die Hydrolyse von Sphingomyelin und durch eine Aktivierung des *de-novo*-Synthesewegs führen (Kim, Kim, Lee, & Chung, 2008). Es zeigte sich eine Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges in menschlichen Fibroblasten durch UV-Strahlung. Der Jak/Stat-Signalweg trägt zur Regulation von Zellentwicklung, Homöostase und Wachstumskontrolle bei.

1.2.2 Ceramidbiosynthese

Die Biosynthese der Ceramide kann prinzipiell über 3 verschiedene Wege ablaufen: (1) die *de-novo*-Synthese, welche im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und zu einem kleinen Teil auch in den Mitochondrien stattfindet, (2) den Sphingomyelin-Syntheseweg, wobei Sphingomyelin durch Abspaltung von Phosphorylcholin in der Plasmamembran, dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien zu Ceramiden abgebaut wird, und über (3) den katabolischen Weg durch Rückgewinnung des Ceramids aus komplexen Sphingolipiden (Hannun & Obeid, 2011) (Bikman & Summers, 2011). Die *de-novo*-Synthese ist abhängig von der Verfügbarkeit von Serin und Palmitoyl-CoA, während die anderen beiden Wege eine initiale Menge an Ceramiden benötigen.

Delta 4-desaturase (DEGS1) spielt in der *de-novo*-Synthese eine entscheidende Rolle. Die *de-novo*-Synthese startet am ER mit der Konjugation von L-Serin und Palmitoyl-CoA. Dies geschieht durch das Enzym Serin-Palmitoyltransferase (SPT). Es entsteht das 3-Keto-Sphinganin (Bikman & Summers, 2011), welches zu Sphinganine (SA) reduziert und im Anschluss n-acetyliert wird zu Dihydroceramide (dhCer). In diesem finalen Schritt katalysiert *DEGS1* den Einbau einer Delta-4,5-Doppelbindung in das SA-Rückgrat, wodurch Ceramid entsteht (Karsai, et al., 2019). Sowohl *DEGS1* als auch die Enzyme der vorherigen Schritte sind nachgewiesen im ER lokalisiert (Michel & van Echten-

Deckert, 1997). DhCer oder Cer werden dann vom ER zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie in komplexere Sphingolipide, wie Sphingomyelin umgewandelt werden können.
Der Abbau von komplexen SL erfordert katabolische Enzyme wie Sphingomyelinasen und Hydroxylasen, welche in der Plasmamembran, ER, Golgi-Apparat und den Lysosomen lokalisiert sind.

1.2.3 Krankheitsassoziierte Störungen des Ceramid-Metabolismus

Störungen im Syntheseweg der Ceramide sind vielfach beschrieben und führen u.a. zu Lysosomalen Speicherkrankheiten wie Morbus (Mb.) Gaucher, Niemann-Pick oder Fabry (Hamza Bajwa, 2023). Es gibt über 50 klinisch manifeste Varianten lysosomaler Speicherkrankheiten, und ihre kombinierte Prävalenz wird auf 1 von 5.000 Lebendgeburten geschätzt. Durch eine Fehlfunktion lysosomaler Enzyme kommt es zu einer Anreicherung von abzubauenden Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen oder Polysacchariden in den Lysosomen, was in der Folge zu zellulären Funktionsstörungen in mehreren Organen führt, unter anderem in Gehirn, Muskel, Knochen, Haut, Herz und Milz (José A Martina, 2020). Die betroffenen Enzyme liegen hierbei vor allem im Sphingomyelin-Syntheseweg, sowie in dem katabolischen Weg des Ceramid-Metabolismus. Die lysosomalen Speicherkrankheiten unterteilt man in verschiedene Subtypen. Lipidosen wie Mb. Niemann-Pick, Mb. Tay-Sachs, Mb. Gaucher und Mb. Fabry sind hereditäre monogenetische Speicherkrankheiten, die zu einer Anhäufung von Lipiden führen - je nach Erkrankung sind das Sphingolipide oder Ganglioside. Desweitern sind auch Störungen des Ceramid/Sphingolipid *de-novo*-Synthesewegs mit Epilepsien oder Tumorerkrankungen assoziiert.

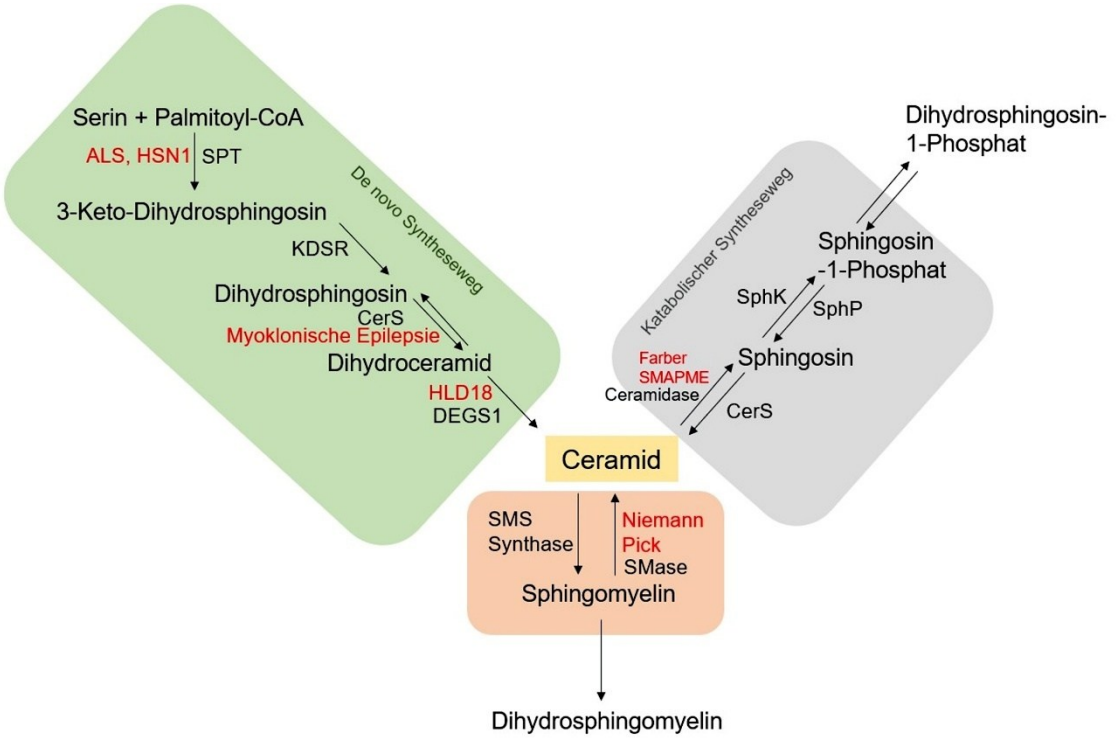


Abb.2: Beispielhafte einzelne erbliche monogene Erkrankungen des Ceramid-Stoffwechsels. Die Abbildung verdeutlicht die Bedeutung des Ceramid-Stoffwechsels für erbliche Erkrankungen. In rot stellen sich die neurologischen Erkrankungen dar. ALS: Amyotrophe Lateralsklerose, HSN1: hereditäre sensorische Neuropathie 1, SMAPME: spinale Muskelatrophie mit progressiver myoklonischer Epilepsie, KDSR: 3-Keto-Dihydrosphingosin-Reduktase, Sphk: Sphingosinkinase, SphP: Sphingosinphosphatase

1.2.4 Delta-4-Desaturase (DEGS1) und Dihydroceramide

Das *DEGS1*-Gen kodiert für die Delta-4-Desaturase und ist auf Chromosom 1q42.11 lokalisiert (Cadena, 1997). Das Enzym katalysiert den letzten Schritt der *de-novo*-Ceramid-Synthese und konvertiert dhCer in Cer durch den Einbau einer ∆4,5-trans Doppelbindung. Bei eingeschränkter Funktionsfähigkeit von *DEGS1* reichern sich Dihydroceramide (dhCer) im Gewebe an, und Ceramid wird dann über den Abbau von SL gebildet (Hannun & Obeid, 2018). Das 323 Aminosäuren lange DEGS1-Protein besitzt 6 Transmembrandomänen und 3 konservierte Histidin-Motive, welche charakteristisch sind für Lipid-Desaturasen und Membran-Hydrocarbon-Hydroxylasen. Der N- und C-Terminus, sowie die Histidin Motive sind zytoplasmatisch lokalisiert (Cadena, 1997). *DEGS1* wird ubiquitär exprimiert, aber dabei verstärkt in Prostata, Haut, Ovarial- und Plazentagewebe. Zudem wurde eine breite *DEGS1*-Expression im zerebralen Kortex, dem Cerebellum und im Rückenmark bei Erwachsenen, sowie Kindern beschrieben

(Pant, et al., 2019). DEGS1 ist ein mitochondrienassoziiertes, membranständiges Enzym des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Planas-Serra, et al., 2023).

Homozygote oder *compound* heterozygote pathogene Varianten in *DEGS1* wurden als Auslöser einer LD in 19 Patienten aus 13 nicht verwandten Familien beschrieben (Pant, et al., 2019). Die Studie von Dolgin et al. identifizierte eine homozygote *DEGS1* Missense-Variante als krankheitsursächliche pathogene Variante in einer konsanguinen arabischen Familie (Dolgin, et al., 2019). Auch Karsai et al wiesen eine homozygote Variante in einer konsanguinen Familie nach. Studien an Tiermodellen belegen zudem die Bedeutung von Degs1 in der prä- und postnatalen Entwicklung. Homozygote Degs1 knock-out Mäuse starben bereits *in utero* oder innerhalb von 8 Wochen nach Geburt mit einem auffälligen Phänotyp. U.a. zeigten sie Minderwuchs, Tremor, spärliche Behaarung und schuppige Haut. Heterozygote Degs1-Mäuse hingegen zeigten keine Auffälligkeiten. Diese Daten zeigen, dass das Fehlen einer Doppelbindung am Sphingosin-Grundgerüst der Sphingolipide enorme Auswirkungen auf die Zellfunktionen hat, die mit einem gesunden Leben z.T. unvereinbar sind (Holland W. B.-P., 2007). Außerdem zeigt eine Studie, dass *DEGS1* eine dualistische Funktion ausführt, indem einerseits die Bildung von intraluminalen Vesikeln gefördert wird, was wiederum zu einer verstärkten Produktion von Exosomen führt, andererseits aber auch den Autophagie-Prozess hemmt. Die Befunde legen nahe, dass die Hemmung der Autophagie durch *DEGS1* dazu beiträgt, die intrazellulären Ressourcen aufrecht zu erhalten (Wu, 2021).

Ein Verlust von Degs1 in Zebrafischen führt zu einer dhCer/Cer Imbalance, einer reduzierten Anzahl von Oligodendrozyten, welche im ZNS die Myelinscheiden der Axone bilden, sowie zu motorischen Defiziten (Pant, et al., 2019).

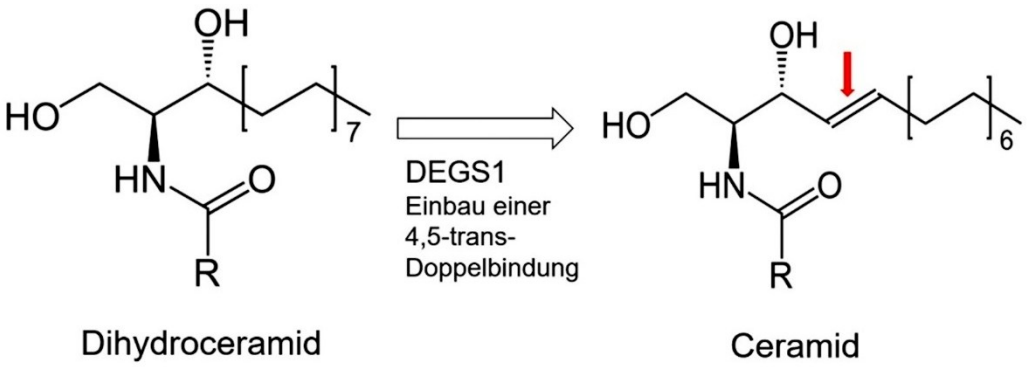


Abb. 3 Letzter Schritt des SL-*de-novo*-Synthesewegs. Die Umwandlung von dhCer zu Cer wird durch *DEGS1* katalysiert. Die eingebaute 4,5-trans-Doppelbindung ist mit dem roten Pfeil markiert.

Viele Jahre wurden die Dihydroceramide (dhCer) als inaktive Ceramid-Intermediate vermutet und nur wenig erforscht. Neue Studien der letzten Jahre belegen allerdings, dass dhCer eine wichtige Rolle in verschiedenen Stoffwechselprozessen der Zelle, wie zum Beispiel der Autophagie, Apoptose und bei der Zellzyklus-Regulation spielt (Lachkar, 2021), und sich in weitaus größerem Umfang in den Geweben anreichert als bisher angenommen (Siddique, Li, Chaurasia, Kaddai, & Summers, 2015). Außerdem haben sie biologische Funktionen, die sich von denen der häufigeren Ceramide unterscheiden. Infolgedessen wird diese bioaktive Lipidklasse in großem Umfang in die Ätiologie, Behandlung und Diagnose (beispielsweise als Biomarker) verschiedener Pathologien, insbesondere Krebserkrankungen, Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes Mellitus Typ II, und neurodegenerative Krankheiten, einbezogen und untersucht (Lachkar, 2021). Es wird berichtet, dass ein Überschuss an dhCer zu vermehrter Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Tiermodell führt (Jung, 2017). Pant et al. beschreiben auch eine übermäßige ROS-Produktion in Fibroblasten von Patienten mit pathologischen *DEGS1*-Varianten. Eine Studie belegt, dass fehlende DEGS1-Aktivität die Bildung von ROS induziert. Die Studie legt außerdem nahe, dass DEGS1 in der Lage ist, die subzelluläre Lokalisierung von *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) zu beeinflussen. Rac1 spielt in vielen Geweben, auch Neuronen, eine entscheidende Rolle bei der Reaktion auf externe Signale und Umweltbedingungen. Insbesondere fördert DEGS1 die Translokation von Rac1 zu spezifischen zellulären Kompartimenten. Dihydroceramid hingegen verändert die Bindung von Rac1 an Zellorganellen. Diese Veränderungen in der Lokalisierung von Rac1 stehen in Zusammenhang mit der Reaktion auf neuronalen oxidativen Stress (Tzou, 2021). Eine weitere Studie zeigt, dass die durch den DEGS1-Mangel erhöhte ROS-Produktion vielfältige zelluläre Quellen hat, wie beispielsweise das ER, Mitochondrien und Peroxisomen (Planas-Serra, et al., 2023). Außerdem konnten Karsai et al. nachweisen, dass ein Verlust von DEGS1 mit einer Bildung eines potentiell toxischen Metabolits, welcher Sphingosin ähnlich ist, einhergeht. Eine stetige dhCer Akkumulation könnte

daher weitere toxische Effekte verursachen. Eine andere Studie zeigt, dass eine Akkumulation von dhCer mit einer Destabilisierung der Zellmembran aufgrund der Bildung von starren Membrandomänen und einer erhöhten Membran-Permeabilität zusammenhängt (Hernandez-Tiedra, 2016).

1.2.5 Bedeutung der Sphingolipide für Neuronen

Das ZNS hat im Vergleich zu allen anderen Geweben den höchsten Lipidanteil sowie die höchste Lipidkomplexität. Der Grund dafür sind die Sphingolipide. Die graue Substanz hat einen Anteil von ca. 5%, die weiße Substanz von ca. 14-21% und das Myelin von über 24% Sphingolipiden am Gesamtlipidanteil (Folch, 1958). Die verschiedenen Sphingolipide erfüllen unterschiedliche, teils antagonistische Aufgaben. Während die Ceramide, wie bereits oben aufgeführt, Stressreaktionen regulieren, fördert Sphingosin-1-phosphat, welches ein Abbauprodukt der Ceramide ist, das Zellwachstum und verhindert die Apoptose (Mandik & Vos, 2021). Die Myelinisierung von Axonen ist die Voraussetzung für eine schnelle und effiziente Weiterleitung von Aktionspotentialen. Die Myelinisierung im ZNS erfolgt durch Ausläufer der Oligodendrozyten. Durch verschiedene strukturgebende Proteine des Myelins (Sphingomyelin, Galactosylceramide) erhalten die Myelinscheiden ihre Architektur. Myelin und Oligodendrozyten sind reich an Sphingomyelin und Galactosylceramiden (GalCer). Als Bestandteil der Myelinscheide fördert Sphingomyelin das axonale Wachstum und somit die neuronale Signalübertragung (Mandik & Vos, 2021). Auch die GalCer sind für die Funktion und Erhaltung des Myelins von entscheidender Rolle, jedoch nicht für den Aufbau des Myelins (Zöller, 2008). Für eine ausreichende Myelinisierung muss es eine präzise Kompartimentierung von Myelinproteinen, sowie Glykosphingolipiden und Galactosylsphingolipiden geben (Olsen, 2017). Ein Ungleichgewicht oder eine Störung in dem feinen Kreislauf der Myelinisierung und der Sphingolipide hätte somit einen starken Einfluss auf die neuronale Struktur und Funktion des Gehirns. Bereits Pant et al. beschreiben eine durch einen DEGS1-Verlust herbeigeführte reduzierte Anzahl an Oligodendrozyten in Zebrafischen. Der Mangel an DEGS1 führte zu einer dhCer/Cer Imbalance und hat eine Motilitätsstörung sowie eine verminderte Myelinisierung zur Folge (Pant, et al., 2019). Eine mangelnde Funktionsfähigkeit von DEGS1 führt somit zu einer Anhäufung von dhCer und einer Erhöhung des dhCer/Cer-Verhältnisses und zu oxidativem Stress in neuronalem Gewebe, was Neurodegeneration zur Folge hat

(Tzou, 2021). Außerdem zeigt sich, dass aufgrund des Funktionsverlusts von DEGS1 ein neuer, potentiell neurotoxischer Metabolit entsteht. Dieser Metabolit stellt ein Isomer von Sphingosin dar und konnte sowohl im Blut eines Patienten, sowie in Zellexperimenten nachgewiesen werden (Karsai, et al., 2019). Die Bildung von neuen toxischen Metaboliten durch eine pathogene Varianten in SL-Metabolismus-Genen wurde bereits für andere Erkrankungen beschrieben (Clark, 2021). Ein exogen zugeführtes dhCer-Analogon führte *in vitro* zu einer Hemmung von axonalem Wachstum, sowie einer Verringerung der axonalen Verzweigungspunkte in primären kultivierten neuronalen Zellen (van Echten-Deckert, 1998). Außerdem zeigte sich eine Reduktion der gesamten Sphingolipide in den Zellen. Lipide und insbesondere Sphingolipide sind schon länger mit Neurodegeneration in Verbindung gebracht worden und spielen eine immer wichtigere Rolle (Mandik & Vos, 2021). So ist u.a. eine mitochondriale Dysfunktion durch Störungen in der Sphingolipid-Synthese eine wiederkehrende Ätiologie bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Alzheimer (Choi J., 2005) (Pavlov P.F., 2009).

1.3 Experimentelle Strategien zur Expressionsregulation von Degs1 *in vitro*

RNA-Interferenz ist ein zelleigener Regulationsmechanismus, der auf regulatorischen kleinen RNA-Molekülen basiert, die die Expression eines bestimmten Gens in Zellen spezifisch und effektiv herunter regulieren. Interferierende RNA-Moleküle finden auch breite Anwendung *in vitro*, um die Expression ausgewählter Gene zu unterdrücken und somit einen *Knockdown* auf Proteinebene zu erzeugen. Dies sollte in dieser Arbeit mittels shRNA (*small hairpin* RNA) und siRNA (*small-interfering* RNA) erfolgen, um die DEGS1-Expressionzu unterdrücken und so die Auswirkungen pathogener funktionseinschränkender Varianten aus den Patienten *in vitro* zu modellieren. Von allen bisher bekannten Varianten im *DEGS1*-Gen wurde erst bei einer Variante (c.839C>T, p.Ala280Val) eine veränderte Desaturase-Aktivität und damit einhergehende veränderte Cer/dhCer Spiegel beschrieben (Karsai, et al., 2019).

Small hairpin RNAs (shRNAs) besitzen kurze komplementäre (*sense* und *anti-sense*) Sequenzbereiche, die eine sog. *stem-loop*-Struktur ausbilden und über die eine Hybridisierung an die Zielsequenz des zu modulierenden Gens stattfindet. Im Vergleich zu *small interfering* RNAs (siRNA), welche

typischerweise doppelsträngige RNA-Moleküle ohne *Loop*-Struktur darstellen, hat die shRNA den Vorteil, dass sie in einen Vektor integriert werden kann. Aufgrund ihrer höheren Stabilität im Vergleich zu siRNAs wird eine shRNA über eine längere Zeitspanne intrazellulär exprimiert. siRNA ist 48h nach Transfektion nahezu komplett abgebaut und hat etwa 24h nach der Injektion/Transfektion ihr Wirkmaximum (Rao, Vorhies, Senzer, & Nemunaitis, 2009). shRNA kann von der Wirtszelle kontinuierlich synthetisiert werden, daher ist eine länger anhaltende Wirkung zu erwarten. Es wurden Experimente beschrieben, in denen ein shRNA-*KD* über 6 Wochen wirksam war, jedoch mit einer progredienten Abnahme der Effektivität (Mwon Ahn, 2010). Somit können mit shRNA-Konstrukten *Knockdown*-Experimente über mehrere Tage durchgeführt werden. Mithilfe der siRNA lassen sich vor allem akute Auswirkungen und Kurzzeiteffekte des *Knockdowns* auf Funktion und Morphologie von Zellen untersuchen.

Die shRNA wird mithilfe eines Vektors in die gewünschten Zellen transfiziert und gelangt so in den Zellkern. Im Zellkern wird die shRNA transkribiert und durch das Enzym Drosha prozessiert. Nachdem die prä-shRNA durch Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma gelangt, wird sie vom Enzym Dicer zu einer siRNA prozessiert. Nun erfolgt die Bindung an RISC (*RNA-induced silencing Complex*). Die Funktion des RISC liegt darin, die Synthese bestimmter Proteine *of interest* herunterzufahren (*knockdown*) oder komplett zu stoppen (*knockout*). Der Prä-RISC besteht nun aus der doppelsträngigen RNA (dsRNA), sowie Proteinen der *Argonaut*-Familie. Als nächstes wird die dsRNA entwunden und gespalten. Der Leitstrang, ein RNA-Einzelstrang, verbleibt im RISC, welcher nun als Holo-RISC bezeichnet wird. Welcher der beiden Einzelstränge der Leitstrang wird, hängt von der absoluten und relativen thermischen Stabilität der Basenpaare an dem 5‘ Ende der RNA ab (Schwarz, 2003). Als letzter Schritt wird nun die zum Leitstrang komplementäre Ziel-mRNA in den RISC eingebaut. Je nach Komplementarität wird die Ziel-mRNA nun abgebaut oder blockiert. Beides führt zum gewünschten Gen-*Knockdown.* Dadurch, dass shRNA-Konstrukte die zelleigenen Prozessierungswege nutzen, wird eine hohe Wirksamkeit und länger anhaltende Wirkung bei geringer Kopienzahl ermöglicht, was meist zu weniger unerwünschten und unspezifischen sog. *Off-Target*-Effekten führt (Rao, Vorhies, Senzer, & Nemunaitis, 2009).

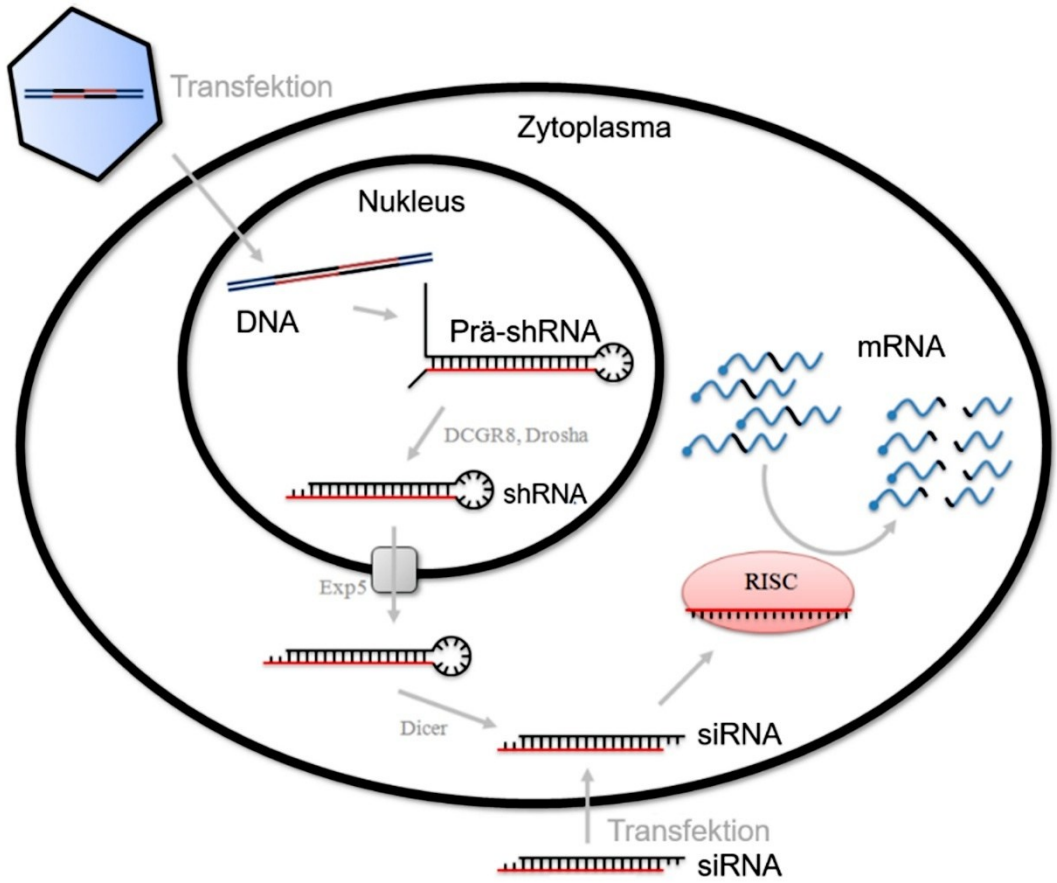


Abb. 4: Schematische Darstellung zu Prozessierung und Wirkmechanismus von siRNA und shRNA. (Modifziert nach: siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing“ von Erin P O’Keefe; https://www.labome.com/method/siRNAs-and-shRNAs-Tools-for-Protein-Knockdown-by-Gene-Silencing.html)

1.4 Zielstellung der Arbeit

Wie bei Sphingolipidosen und anderen lysosomalen Speicherkrankheiten, welche mit einer dysfunktionalen Ceramidsynthese in Verbindung stehen, ist auch bei der DEGS1-assoziierten-Leukodystrophie (HLD18) eine Störung der in diesem Fall *de novo*-Synthese von Ceramiden die pathomechanistische Ursache. DEGS1-Dysfunktion führt zu einer Anhäufung von dhCer, welches Stresssignale wie Autophagie, Apoptose und ROS-Bildung in den Zellen induzieren kann, und auch einen Einfluss auf die Morphologie und Funktion von Nervenzellen hat.

Ziel dieser Arbeit ist es, Tools für einen effektiven *Knockdown* von *DEGS1 in vitro* in neuronalen Zellmodellen zu generieren und zu validieren. Ein DEGS1-*Knockdown* in neuronalen Zellen soll zeigen, wie ein DEGS1-Verlust die Entwicklung von Nervenzellen *in vitro* beeinflusst und somit neue Hinweise für

die phänotypischen Ursachen des im Menschen beschriebenen Krankheitsbildes liefert. Dazu sollen in dieser Arbeit sowohl die neuronalen N2a-Zellen, als auch kortikale Mausneuronen genutzt werden, sowie mit siRNA und shRNA zwei verschiedene *Knockdown*-Strategien. Im Anschluss sollen die Auswirkungen des induzierten Degs1-Mangels zu verschiedenen Zeitpunkten *in vitro* analysiert werden. Der Fokus soll dabei auf der Analyse neuronaler Differenzierung und Morphogenese liegen.

2. Material

2.1 Tierstämme

Für die Arbeit wurden primäre Neuronenkulturen aus dem wildtypischen Mausstamm (*Mus musculus*) C57BL/6J verwendet. Die Tiere stammten alle aus der Zuchtanlage des Institutes für Versuchstierkunde der Uniklinik RWTH Aachen und wurden unter standardisierten Bedingungen (12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus, 20-24°C Raumtemperatur, 45-65% Luftfeuchtigkeit, Futter und Wasser *ad libitum*) gehalten. Embryonale Organentnahmen wurden mit Genehmigung (AZ 81-02.04.2019.A311) des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) von der AG Zimmer-Bensch, Institute of Zoology, RWTH Aachen durchgeführt.

2.2 shRNA/Primer Sequenzen

Tab. 2: Genutzte shRNA Sequenzen. Blau: *Sense* Strang (spezifisch für *mDegs1*), Schwarz: *Loop*, Rot: *Antisense* Strang, Gelb: Schnittstellen

shRNA	Sequenz
shRNA 1 Maus	5'- GATCCGTACCTCGGAGCGGATAAGATTTCAAGAGAATCTTATCCGCTCCGAGGTACTTTTTTGGAAA-3' 3´- GCGTTTCATAGGTCTCTATTTCAAGTTCTCTGAAATAGAGACCTATGAAACGAAAAAACCTTTTCGA-5´
shRNA 2 Maus	5'- GATCCGAGGAAGATCGCAAGTGAGTATTCAAGAGATACTCACTTGCGATCTTCCACTTTTTTGGAAA-3'

	3´- GCGCAAACCGTCAACGTAATTGAAGTTCTCTCAATTACGTTGACGGTTTGCGAAAAAA CCTTTTCGA-5´
shRNA 3 Human	5’- GATCCGGATCATCATCGGTACCTTGGTTCAAGAGACCAAGGTACCGATGATGATCCTT TTTTGGAAA-3’ 3´- GCCTAGTAGTAGCCATGGAACCAAGTTCTCTGGTTCCATGGCTACTACTAGGAAAAAA CCTTTTCGA-5
Scrambled shRNA	5‘- GATCCGAAGTAAGGACTAAGCTAACATTCAAGAGATGTTAGCTTAGTCCTTACTTCTTT TTTGGAAA-3‘ 3’- GCTTCATTCCTGATTCGATTGTAAGTTCTCTACAATCGAATCAGGAATGAAGAAAAAAC CTTTTCGA-5’

Die genutzten Oligos sind mit *Sense*-Strang, *Loop*, *Antisense*-Strang, sowie einer RNA Polymerase III-Terminations-Sequenz ausgestattet. Als Plasmid-Backbone wurde der pRNAT H1.1 Hygro Vektor (zur Verfügung gestellt von M. Kessels, Institut für Biochemie I, Universitätsklinikum Jena) genutzt.

2.3 Chemikalien und Laborreagenzien

Puffer und Lösungen wurden in bi-destilliertem Wasser (ddH_2O) angesetzt, welches aus einer Reinstwasser-Anlage (MilliQ Gradient, Millipore) gewonnen wurde.

Falls nicht weiter angegeben, wurden alle nicht aufgelisteten Chemikalien in reinster Form von den Firmen Thermo Fisher Scientific, Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 3: Verwendete Reagenzien

Reagenz	**Firma**	**Bestell-Nr.**
10x DNA Polymerase Puffer	Invitrogen	10043092
10x Ligase Puffer	ThermoFischer	B69
10x FD Puffer	ThermoFischer	B64
50x B27	Invitrogen	17504044

100x GlutaMax	Invitrogen	35050061
Agarose	Bio-Rad	161302
Ammoniumpersulfat	Roth	9592.2
ATP, 10 mM	New England BioLabs	#B0756A
Chloroform	Roth	3313.1
CMV-forward Primer	ThermoFischer Scientific	-----
DAPi	Merck	1.24653.0100
DMEM high Glucose	ThermoFischer Scientific	31966-047
Dulbeccos PBS	Sigma-Aldrich	D8537
Ethanol 100%	VWR	1009831011
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	E1510
FastAP	ThermoFischer Scientific	EF0654
Fetales Bovines Serum	ThermoFischer Scientific	10270-106
Fetales Bovines Serum	Biowest	S1400
GeneRuler 1 kB Ladder	ThermoFischer	SM0311
HEPES	Roth	HN77.4
Hoechst 33258	Invitrogen	H3569
HRP Juice Plus	PJK GmbH	10315
HST Polymerase	Qiagen	203203
LB-Medium	Roth	6673.2
Laminin	Sigma	L2020
Lipofectamin 2000	ThermoFischer Scientific	11668019
Lysozym	SigmaAldrich	62971
Methanol	VWR	20847.295
Neurobasal	Invitrogen	12348017
Nuclease-freies Wasser 50 ml	Qiagen	129114
PageRuler Plus Ladder	ThermoFischer	26620
pEGFP-reverse-N1 Primer		
Pencillin/Streptomycin	ThermoFischer	15070-063
PNK, 2500U	ThermoFischer Scientific	EK0032
PNK Puffer A	ThermoFischer Scientific	IVGN2304
Paraformaldehyd (PFA)	ThermoFischer Scientific	J19943.K2

PolyJet	Tebu-Bio GmbH	SL100688
Poly-L-Lysin	Sigma	P3069
Prolong Diamond	ThermoFischer Scientific	P36970
Protease Inhibitor Roche	Merck	11836145001
SDS 10%	AppliChem Panreac	A0676,0250
T4 DNA-Ligase	Invitrogen	15224025
T7 Primer	ThermoFischer Scientific	N56002
TEMED	Roth	2367.3
Tri Reagenz	Sigma-Aldrich	93289
Triton-X-100	Roth	3051.3
Trypsin-EDTA	ThermoFischer Scientific	25300-096

2.4 Antikörper

Primäre und sekundäre Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen (IF) und Western Blot Verfahren (WB) wurden separat angegeben.

Tab. 4: Verwendete Antikörper. ms: mouse, rb: rabbit, dk: donkey, HRP: horseradish peroxidase, BP: bindendes Protein

Primäre Antikörper					
Bezeichnung	**Spezies**	**IF**	**WB**	**Firma**	**Bestell-Nr.**
SMi312/ pan-Neurofilament	ms	1:1000	-	BioLegend	837904
Alpha-Tubulin	rb	-	1:2000	Abcam	ab15246
β3-Tubulin (TUBB3)	rb	-	1:2000	Synaptic Systems	302 302
DEGS1	rb	1:1000	1:2000	Abcam	ab167169
GFP	rb	-	1:2000	Abcam	ab6556
GFP	ms	-	1:2000	Merck Milipore	MAB3580
NF200	ms	1:500	-	Sigma-Aldrich	N5389
Sekundäre Antikörper					

Bezeichnung	Spezies	IF	WB	Firma	Bestell-Nr.
Alexa Fluor 546 (gt-anti-ms)	gt	-	1:1000	Invitrogen	A11030
Alexa Fluor 647 (dk-anti-rb)	dk	-	1:1000	Invitrogen	A31573
Ms-anti-rb IgG-HRP	ms	-	1:4000	Santa Cruz	Sc-2357
Ms-IgGk-BP-HRP	-	-	1:5000	Santa Cruz	sc-516102

2.5 Restriktionsendonukleasen

Tab. 5: Verwendete Restriktionsenzyme.

Enzym	Fast Digest	Firma	Bestell-Nr.
HindIII	Ja	ThermoFisher	FD0504
BamHI	Ja	ThermoFisher	FD0054
NheI	Nein	ThermoFisher	ER0971
SmaI	Ja	ThermoFisher	FD0664
HincII	Ja	ThermoFisher	FD0494
EcoRI	Ja	ThermoFisher	FD0274

2.6 Geräte

Tab. 6: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Blotting-Apparatur (‘PerfectBlue’ Semi-Dry-Elektroblotter)	PeqLab
Chemilumineszenz-Imager	Las3000 FujiFilm
Kühlschrank/Tiefkühler	Bosch
Magnetrührer	VELP Scientifica
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss Observer Z.1 - Weitfeldmikroskop mit ApoTome
Zellkultur-Mikroskop	Zeiss
NanoDrop 2000	ThermoFischer Scientific
Orbital-Rotator	Phoenix Instruments RS-TR05
Pipettierhilfe	Eppendorf EasyPet 3
Pipettenset	Eppendorf (Modell: Research Plus)
Reinstwasseranlage	Sartorius Arium pro UV

SDS-Page Kammer	Bio-Rad, Mini-PROTEAN Tetra System
UVSolo Imager	Analytik Jena AG
Vortexer	IKA Vortex 4 digital
Zellkulturbank	Heraeus HERAsafe HS12 bzw KS12
Zentrifuge	Eppendorf 5424/5427R MiniStar NeoLab Roth Micro Centrifuge

2.7 Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	**Firma**
Deckgläser 13mm	VWR
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 – 2 ml)	Eppendorf AG
Filterpapier	Bio-Rad
Glasflaschen (0,25 – 1 l)	Simax
Impfösen 10 µl, sterilisiert	Roth
Konische Gefäße (50 ml)	Falcon
Objektträger 76 x 26 mm	VWR
Parafilm M 100 mm x 38 mm	Roth
PCR Tubes	StarLab
Pipettenspitzen	StarLab
PVDF Membran	GE Healthcare Life Sciences
Serologische Pipetten 5 – 25 ml	Sarstedt
Whatman Paper	GE Life Sciences Health Care
Zellkulturplatten (10 cm, 24 Well, 6 Well)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugationsgefäße (15 ml, 50 ml)	VWR

2.8 Kits

Tab. 8: In der Arbeit verwendete Kits.

Gel DNA Recovery Kit	ZymoResearch
Plasmid MiniPrep Classic	ZymoResearch

2.9 Software

Tab. 9: In der Arbeit verwendete Softwares.

ApE V2.0.64	Jorgensen Lab
BlockIT RNAi Designer	ThermoFischer Scientific
ImageJ 1.53c/ Fiji	ImageJ
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft *Corporation*
Microsoft Office Power Point 2016	Microsoft *Corporation*
Microsoft Office Word 2016	Microsoft *Corporation*
NeBioCalculator Version 1.14.1	New England Biolabs
SnapGene Version 5.3.2	Insightful Science

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden - Klonierungsmethoden

3.1.1 Design der shRNA-Oligonukleotide

Das Design der shRNA-Oligonukleotide erfolgte durch Lars Buschmann, naturwissenschaftlicher Doktorand des Instituts für Humangenetik und Genommedizin, Uniklinikum RWTH Aachen.

Die in der Arbeit genutzten shRNA-Sequenzen wurden mithilfe der shRNA-Funktion des BLOCK-iT™ RNAi Designers erstellt (https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=-1108249303255625700). Als Grundlage diente die Referenz-Nukleotid-Sequenz von *DEGS1* (NM_007853.5), und als Plasmid-Backbone wurde pRNAT H1.1 Hygro genutzt. Die scrambled shRNA wurde mithilfe des Invivogen siRNA Wizard Online Tools (https://www.invivogen.com/sirnawizard/) erstellt und konnte somit als sequenzunabhängige Kontrolle genutzt werden. Bei dem Design wurde darauf geachtet, dass die shRNA-Sequenzen spezifisch für

DEGS1 sind und bioinformatisch keinen Einfluss auf andere Gene, sog. *Off-Target*-Effekte aufwiesen.

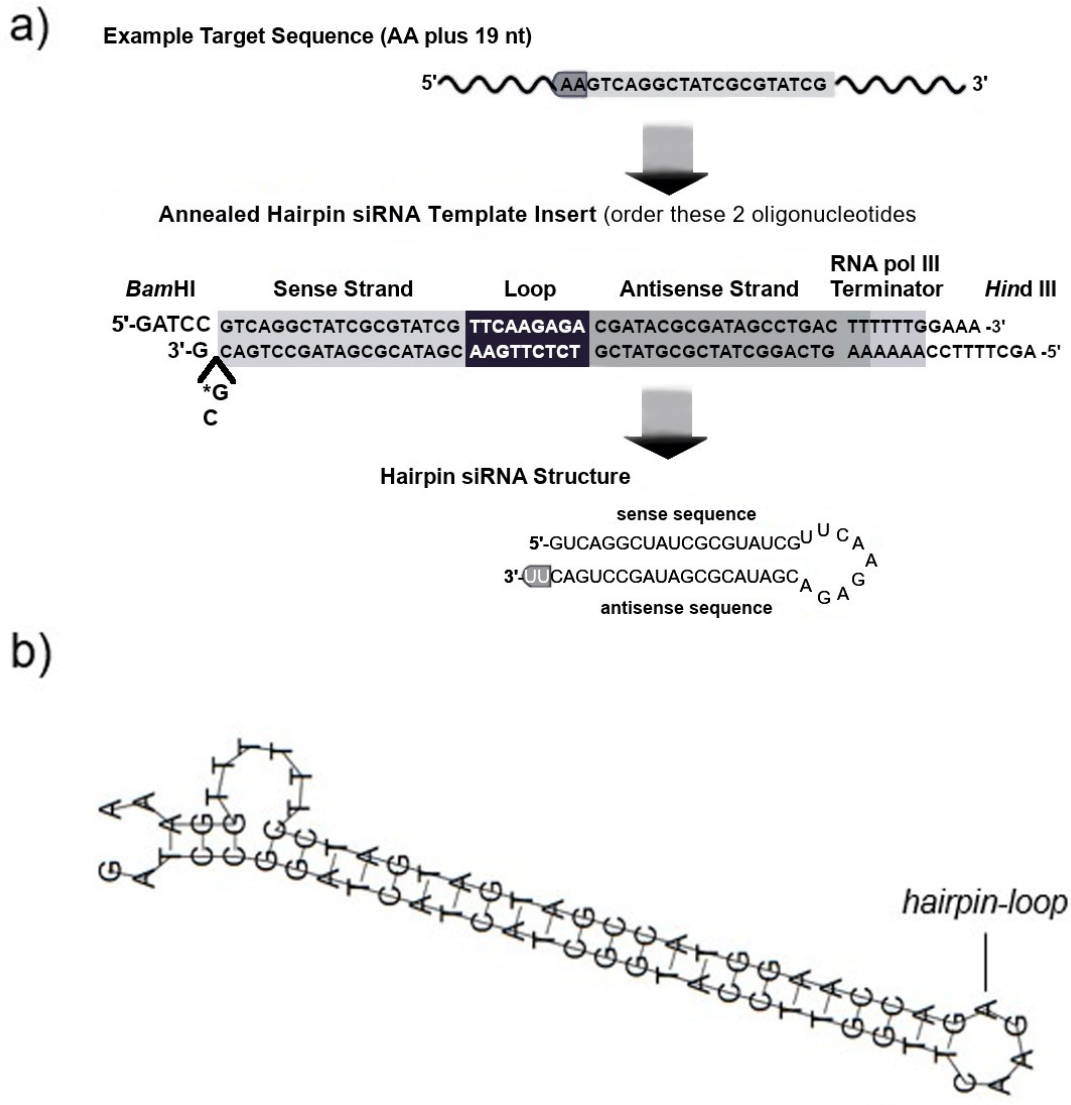


Abb. 5: Struktur der verwendeten shRNA-Oligos und exemplarische Sequenz der shRNA3. **a)** Von links nach rechts: Schnittstelle #1 – *Sense*-Strang (spezifisch für *mDegs1* (Maus Degs1) - *Loop* – *Antisense*-Strang (reverse-complement zum sense strand) – Schnittstelle #2 (Abbildung aus dem pSilencer Manual). Aus: pSilencer Manual. Sequenzen der verwendeten *Degs1*-shRNAs siehe Tab. 2 **b)** Exemplarische Sequenz der shRNA3 mit dargestellten hairpin-loop (Grafik erstellt mit Hilfe von RNAfold http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi)

3.1.2 Oligo-Annealing shRNA3 und *scrambled*

Zur Erzeugung von doppelsträngigen und somit klonierbaren shRNA-Oligonukleotiden wurden die jeweiligen Primer für die *scrambled* und die shRNA3 annealed. Hierfür wurden jeweils 1 µl des *forward* und *reverse* Primers in ein PCR-Gefäß überführt und 1 µl 10x Annealing Puffer sowie 7 µl ddH2O hinzugefügt. Nach Denaturierung für 2 min bei 95 °C wurde das Tube über 45

Minuten auf 25 Grad (-1,5 °C/min) abgekühlt. Nach Zentrifugation erfolgte die Phosphorylierung der freien DNA-Enden durch Zugabe von 2µl PNK Puffer A, 2µl 10mM ATP, 1µl PNK und 5µl ddH2O genutzt. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 37 °C und anschließend zur Enzyminaktivierung 10 min bei 75 °C inkubiert. Die fertige Oligo-Mischung wurde 1:25 in ddH_2O verdünnt und für die Klonierung eingesetzt.

3.1.3 Oligo-Annealing shRNA1 und 2

Es wurden jeweils 5 µl 10µM *forward* und *reverse* Primer zusammen mit 25 µl 2x Annealing Buffer und 15 µl ddH_2O vermischt. Anschließend wurden die Proben im *Thermocycler* für 2min auf 95 °C und anschließend über 45 Minuten auf 25 °C (-1,5 °C/min) runtergekühlt. Im Anschluss an das Annealing wurden die Oligos mit Isopropanol gefällt. Dafür wurde zu den Proben 200 µl Isopropanol hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei maximaler Umdrehung (rpm) zentrifugiert und das Isopropanol abgenommen. Dem Pellet wurden 500 µl 70% Ethanol hinzugegeben und dann für 5 Minuten bei 14.000 rpm gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl 10mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Phosphorylierung, mit 2µl PNK Buffer A, 1µl PNK, 2µl 10 mM ATP und 5 µl ddH_2O damit eine Klonierung in den Vektor möglich ist. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C, gefolgt von einer thermischen Inaktivierung für 10 min bei 75 °C. Die Oligos wurden 1:25 in ddH_2O verdünnt und gelagert.

3.1.4 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Für die Klonierung der shRNA-Oligos wurden im shRNA-Expressionsvektor pRNAT H1.1 mittels Restriktion sogenannte *sticky ends* erzeugt. Der Restriktionsverdau erfolgte immer mit 5 µl Plasmid-DNA, 1-2,5 µl der Restriktionsenzyme, sowie 5 µl 10x FD Buffer. Bei gleichzeitiger Dephosphorylierung wurden zusätzlich 2,5 µl FastAP zu dem Ansatz hinzugegeben. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit ddH_2O aufgefüllt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung des korrekten Restriktionsverdaus wurde die Plasmid-DNA im Vergleich zu einer ungeschnittenen Probe in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend mithilfe

des ZymoClean Kits (ZymoResearch Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aus dem Gel extrahiert.

3.1.5 Ligationsreaktion

Es erfolgte die Ligationsreaktion des geschnittenen Plasmids pRNAT-H1.1. mit den annealten shRNA-Oligos. Zum Berechnen der optimalen Insert-zu-Plasmid Konzentration wurde der NEBioCalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation) genutzt. Die daraus resultierenden Mengen/Volumina wurden mit 1 µl Ligase Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase und ddH_2O ad 10µl versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in E. Coli Bakterien wie unter Punkt 3.1.8 beschrieben.

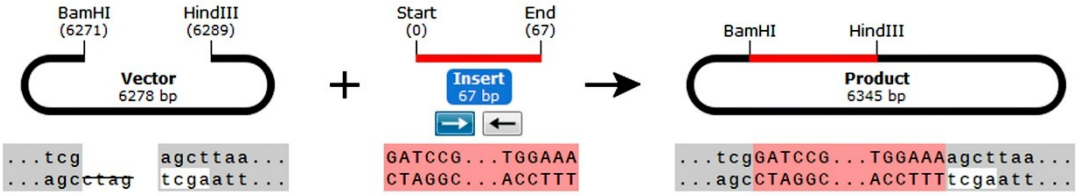


Abb. 6 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie. pRNAT H1.1 wurde hier als Vektor genutzt. Die annealten shRNA-Oligos werden als Insert über die Schnittstellen der Enzyme BamHI und HindIII in den Vektor ligiert.

3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* (E. coli)

Die Herstellung kompetenter E. coli Bakterien erfolgte durch Sebastian Gießelmann (MTLA, Institut für Humangenetik und Genommedizin, RWTH Uniklinik Aachen). Top 10 E. coli wurden initial auf einer Agar-Platte mit der entsprechenden Plasmid-Resistenz ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank (37°C) inkubiert. Nach Animpfen einer Kolonie in einer 5 ml Kultur mit Wachstums-Medium wurde diese bei 37°C unter leichtem Schütteln bei 250 rpm über Nacht inkubiert. Die 5 ml Starterkultur wurde genutzt, um eine 300 ml Kultur anzuimpfen. Diese wurde bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,3 bis 0,5 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und dann bei 4°C für 10 min und 4500x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in TFB1 Puffer resuspendiert. Das Gemisch wurde für 45-90 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C für 8 min und 4500x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in TFB2 Puffer resuspendiert.

Aliquots von 200 µl wurden hergestellt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden die kompetenten Bakterien bei -80°C gelagert.

Tab. 10: Zusammensetzung des Wachstumsmediums.

Material	**Menge**
LB-Medium	500 ml
$MgSO_4$ (1M)	2 ml
KCl (1M)	5 ml
Streptomycin	100 µg/ml

Tab. 11: Zusammensetzung des TFB1 Puffers.

Material	**Menge**
Glycerin	15 % (v/v)
$CaCl_2$	10 mM
KAc	30 mM
$MnCl_2$	50 mM
RbCl	100 mM
pH 5,8	

Tab. 12: Zusammensetzung des TFB2 Puffers.

Material	**Menge**
Glycerin	15 % (v/v)
MOPS	10 mM
$CaCl_2$	75 mM
RbCl	10 mM
pH 6.5	

3.1.7 Transformation in chemisch kompetente E. Coli

Als nächstes erfolgte eine Transformation in *E. coli*-Bakterien. Der Ligationsansatz (siehe 3.1.5 und 3.1.7) wurde zu 100 µl auf Eis aufgetauter Bakterien hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 10 min auf Eis inkubiert. Der darauffolgende 30 s Hitzeschock bei 42 °C bewirkt die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle (Transformation). Nach Abschrecken für 2 min auf Eis wurden 300 µl SOC-Medium hinzugegeben und die

Bakteriensuspension für 30 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Anschließend wurde auf LB-Ampicillin-Resistenz-Agar Platten ausgestrichen und die Kolonien konnten bei 37 °C über Nacht wachsen.
Am nächsten Tag wurden die Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt. Sie wurden für 16 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Tab. 13: Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Material	**Menge**
SOB-Medium	Hefeextrakt 0,5 % (5 g/l), Trypton 2 % (20 g/l), Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l)
Glucose	20 mM

3.1.8 Plasmidisolierung mittels TELT-Methode

Die TELT-Methode ermöglicht es, Plasmid-DNA aus Bakterien für weitere Arbeitsschritte aufzureinigen. Die Bakterien-Übernachtkulturen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei RT und 16000x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 300 µl TELT-Puffer durch vortexen resuspendiert. Im Anschluß wurde 30 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in H_2O) hinzugegeben, das Gemisch bei 99 °C für 1 min gekocht und danach für 5 min auf Eis inkubiert, bis die Lösung zähflüssig erschien. Nach Zentrifugation bei 16000x g für 15 min bei RT wurde das Pellet entfernt und verworfen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus dem Überstand gefällt. Nach Zugabe von 2 Volumenteilen 99,8% EtOH wurde für 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, RT, 16050x g). Der Waschschritt wurde mit 400 µl 70% EtOH für 10 min bei 16000x g durchgeführt. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet im 30µl DEPC-Wasser gelöst und die DNA-Konzentration am Nanodrop photometrisch bestimmt.

Tab. 14: Zusammensetzung des TELT-Puffers.

Material	**Menge**
Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
EDTA	62,5 mM
Triton-X-100	0,4 %
LiCl	2,5 mM

H_2O	

3.1.9 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR dient zur Amplifikation und gleichzeitigen Markierung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente. Für die Sequenzierungs-PCR wurden 25-100 ng DNA, 0,5 µl T7-Primer (1:10 Verdünnung in H_2O), 2µl 2,5x Puffer und 0,5 µl Big Dye verwendet. Aufgefüllt wurde auf 10 µl mit ddH_2O. Die Sequenzierungs-PCR beginnt mit einer Denaturierung (96 °C, 1 min) gefolgt von 28 Zyklen des folgenden Programms: 96 °C, 10 s; 50 °C 8 s; 60 °C 4 min.

Zur Fällung wurden in einem neuen Reaktionsgefäß 10 µl des Seq-PCR-Produkts mit 40 µl H_2O, 5 µl Na-Ac und 125 µl 100% EtOH gemischt und für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 125 µl 70% EtOH gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und vor der Sequenzierung in 20 µl HiDi-Formamide-Puffer resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine Sanger-Sequenzierung mit Hilfe des *Applied Biosystems genetic analyzer* von ThermoFischer. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes *A Plasmid Editor* (APE).

3.1.10 Analytischer Restriktionsverdau

Der analytische Verdau zum Nachweis der korrekten Insertion der shRNA-Oligos in den pRNAT-H1.1 wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI durchgeführt, da sich in dem klonierten shRNA-Insert eine BamHI-Schnittstelle befand. Die Methode wurde genutzt, um eine erfolgreiche Klonierung zu bestätigen. Anschließend wurden die positiven Klone noch sequenziert. Genutzt für den analytischen Verdau wurden 300 ng Plasmid DNA, 0,5µl BamHI und 1 µl 10x FD Buffer. Aufgefüllt wurden die Proben auf 10 µl mit ddH_2O. Der Restriktionsverdau erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben auf ein 1% Agarose Gel aufgetragen und bei 120 Volt für 45 min aufgetrennt.

3.1.11 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde zum Nachweis des erfolgreichen Restriktionsverdaus genutzt. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 0,5 g Agarose und 50 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) verwendet. Diese Mischung wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sich das Agarosepulver aufgelöste und die Lösung klar und ohne Klümpchen war. Dann wurden 6 µl Ethidiumbromid (0,5

µg/ml) hinzugegeben, das Gel wurde mit 10 Taschen in die Kammer gegossen und ungefähr 30 min auspolymerisiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V für 90 min.

Tab. 15: Zusammensetzung des TBE-Puffers.

Material	**Menge**
TRIS-Base	10,8 g
Borsäure	5,5 g
EDTA-Na_2	0,7 g
ddH_2O	Auffüllen auf 1l
pH 8,0	

3.2 Zellkultur

3.2.1 Präparation und Kultivierung primärer kortikaler Neurone

Primäre kortikale Neuronenkulturen von Mäusen am Embryonaltag 14.5 (E14.5) wurden von Jenice Linde und Julia Reichardt am Lehrstuhl für Funktionelle Epigenetik im Tiermodell, Institut für Biologie II, RWTH Aachen (Zimmer, 2011) angefertigt. Hierfür wurde das Muttertier für die Embryoentnahme mittels Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose sediert. Per Kaiserschnitt wurden die beiden Uterushörner eröffnet und die Embryonen zügig entnommen und dekapitiert. Im Anschluss wurde das Muttertier mittels Dekapitation euthanasiert. Die Präparation der embryonalen Gehirne erfolgte in GBSS/Glucose auf Eis. Es wurden 200 µl 0,25% Trypsin auf 1ml HBSS und das Gewebe gegeben. Das Gewebe wurde für 17 Minuten in einem 37°C Wasserbad erhitzt und von Zeit zu Zeit leicht aufgewirbelt. Anschließend wurde aus dem Reaktionsgefäß der Überstand entnommen, und das trypsinierte Gewebe mit 1 ml eiskaltem Stopp- und Aussaatmedium gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe vorsichtig homogenisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Maschennetz gefiltert. Auf die Unterseite des Gitternetzes wurde ein Tropfen Kulturmedium gegeben, und auf die Gegenseite tropfenweise Zellsuspension. Die Einzelzellen wurden auf Eis gelagert. Es erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl, sowie die Aussaat der Zellen. Dazu wurden die Zellen zuerst in Stopp- und Aussaatmedium angesetzt und nach 1h auf Neurobasal-Kulturmedium gewechselt. Die Beschichtung der Deckgläschen erfolgte am Tag der Präparation mit 19 µl

Laminin und 1 µl Poly-L-Lysin (PLL) in 980 µl GBSS. Dies wurde für mindestens 30 min bei 37 Grad inkubiert, anschließend abgespült und vor Nutzung getrocknet. Es wurden 50.000 bis 80.000 Zellen/Well ausgesät.

Tab. 16: Zusammensetzung des Neurobasal-Kulturmediums.

Material	**Menge**
Neurobasal	50 ml
50xB27	1.000 µl
100x GlutaMax	125 µl

Tab. 17: Zusammensetzung des Stopp- und Aussaatmediums.

Material	**Menge**
DMEM (ohne Pyruvat, hoher Glucoseanteil)	44,4 ml
FBS	5 ml
P/S	500 uL (100U/ml Penicillin, 100 g/ml Streptomycin)

3.2.2 Kultivierung von N2a-Zellen

Die Kultivierung der N2a-Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchte im Brutschrank. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet. Das genutzte Medium war *Dulbeccos modified Eagle Medium* (DMEM) mit 1% Penicillin-Streptomycin, 10% FCS und 2,5% HEPES pH 7,4. Zum Splitten wurde zuerst das alte Medium der Zellen abgesaugt. Anschließend erfolgte ein einmaliger Waschschritt mit 5 ml PBS. Abgelöst wurden die Zellen mit 1 ml 0,05% Trypsin-EDTA für 2-5 min bei 37 °C im Brutschrank. Die Zellen wurden im Verhältnis von 1:5 wieder ausgesät und in 10 ml frischem Medium weiter kultiviert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 PolyJet Transfektion

Das Einbringen der klonierten shRNA-Konstrukte in N2a-Zellen erfolgte über eine Transfektion mit PolyJet. Für die Transfektion wurden die N2a-Zellen ca. 6h zuvor auf eine 6-Well Platte ausgesät. 30-60 min vor der Transfektion wurde jeweils 1 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Pro Well wurde 1µg DNA in 50µl

serumfreiem DMEM verdünnt. Parallel dazu wurde pro Well 3 µl PolyJet in 50 µl serumfreiem DMEM verdünnt. Das gelöste PolyJet-Reagenz wurde sofort zur DNA-Verdünnung pipettiert und dann 10-15 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert. 100µl des PolyJet/DNA Gemisches wurde tröpfchenweise in das Medium zu den Zellen gegeben und anschließend durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchte. Nach 12-16 h wurde das Medium gewechselt und die Effekte des shRNA-*knockdowns* ca. 24-48h nach Transfektion ausgewertet.

Tab. 18: Zusammensetzung des N2a-Zellkulturmediums.

Material	**Menge**
DMEM	500 ml
FCS	50 ml
HEPES	12,5 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml

3.3.2 Transfektion mittels Lipofektion

Lipofectamine2000 wurde als Transfektionsreagenz für die *Degs1*- und Kontroll-siRNAs in N2a-Zellen verwendet. 4 bis 6 h vor der Transfektion wurden ca. 500.000 Zellen/Well auf eine 6-Well Platte ausgesät und mit 1 ml Medium versetzt. Dann wurden die in Tabelle 17 aufgelisteten Transfektions-Komponenten angesetzt:

Tab. 19: Verwendete Lipofectamin-Ansätze. Mit den Konzentrationen nach Standardprotokoll sowie mit reduzierten Substanzmengen.

Standard Protokoll (Kontrolle)	**Reduziertes Protokoll (Kontrolle)**
250 µl DMEM ohne Zusätze	125 µl DMEM ohne Zusätze
5 µl Lipofectamine 2000	3,35 µl Lipofectamine 2000
5 µl ctrl-siRNA + 245 µl DMEM	1,25 µl ctrl-siRNA + 123,5 µl DMEM
Standard Protokoll (KD-DEGS1-siRNA)	**Reduziertes Protokoll (KD-DEGS1-siRNA)**
250 µl DMEM ohne Zusätze	125 µl DMEM ohne Zusätze
5 µl Lipofectamine 2000	3,35 µl Lipofectamine 2000
5 µl ctrl-siRNA + 10 µl KD-siRNA + 235 µl DMEM	1,25 µl ctrl-siRNA + 2,5 µl KD-siRNA + 121 µl DMEM

Die verwendete Kontroll-siRNA wurde mit einem Fluorophor (AlexaFlour555) markiert, um transfizierte Zellen über ihre Fluoreszenz im Mikroskop identifizieren zu können. Die beiden Ansätze wurden zusammen pipettiert und das siRNA-Lipofectamin-Gemisch für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde 125 µl bzw. 250 µl des Transfektionsmix (Tabelle 17) tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und bei 37 °C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchte über Nacht inkubiert. Nach ca. 16 Stunden wurde das Medium auf den Zellen gewechselt und durch Standard-Kulturmedium (siehe Tab. 16) ersetzt. Es wurde eine Zeitreihe erstellt und die Zellen nach 16h und 24h geerntet.

3.3.3 Transfektion mittels Calciumchlorid ($CaCl_2$)

Die $CaCl_2$-Transfektion wurde genutzt, um die klonierten shRNA-Konstrukte in N2a-Zellen einzubringen. 4 bis 6 h vor der Transfektion wurden ungefähr 500.000 Zellen/Well einer 6-Well Platte ausgesät und mit 2,25 ml Zellkulturmedium versetzt. 2 µg DNA wurden in 16 µl sterilem 2M $CaCl_2$ und 109 µl sterilem ddH_2O verdünnt. Im nächsten Schritt wurden 125 µl 2x HBS hinzugegeben. Das Gemisch wurde einmal kurz gevortext und dann für 20 min bei RT inkubiert. Nach 20 min wurde das Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und bei 37 °C, 5% CO_2, 100% Luftfeuchte über Nacht inkubiert. Nach 16 h erfolgte die Abnahme des Mediums, die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen und mit 2 ml neuem Zellkulturmedium versetzt.

Tab. 20: Zusammensetzung des 2x HBS

Material	**Menge**
NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na_2HPO_4	1,5 mM
Dextrose	12 mM
HEPES pH 7,05	50 mM

3.3.4 Transfektion der primären embryonalen Kortexneuronen

Die Transfektion der siRNA in die primären Neuronen wurde von Frau Jenice Linde, M.Sc., Lehrstuhl Funktionelle Epigenetik im Tiermodell, Institut für Biologie II, RWTH Aachen durchgeführt.

Tab 21: Transfektionsprotokoll der primären embryonalen Kortexzellen.

Reaktionsgefäß A (Ctrl-siRNA)	**Reaktionsgefäß B (Ctrl-siRNA)**
25 µl OptiMEM	25 µl OptiMEM
0,67 µl Lipofectamine 2000	0,25 µl Ctrl-siRNA
Reaktionsgefäß A (KD-siRNA)	**Reaktionsgefäß B (KD-siRNA)**
25 µl OptiMEM	25 µl OptiMEM
0,67 µl Lipofectamine 2000	0,5 µl DEGS1-siRNA 0,25 µl ctrl-siRNA

Die beiden Lösungen wurden gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Gabe von 50 µl/Well in das Medium.

3.3.5 Herstellung RNA-Lysate

Aus den transfizierten Zellen wurden RNA-Lysate für die nachfolgende qPCR hergestellt. Diese diente dem Nachweis der verminderten *DEGS1*-Expression zur Bestimmung der siRNA/shRNA-*knockdown*-Effizienz. Zu Beginn wurden die Zellen homogenisiert. Dazu wurde 1 ml TriFast auf ein 6-Well gegeben und die Zellen zum Ablösen und Lysieren auf und ab pipettiert. Nun erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei RT. Zur Phasentrennung wurden 200 µl Chloroform pro 1 ml TriFast hinzugegeben und für 15 s kräftig per Hand geschüttelt. Es erfolgte eine erneute 3-10-minütige Inkubation bei RT. Zur Phasenbildung wurde das Zellgemisch danach 5 min bei 12.000x g zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen. Nun erfolgte die RNA-Fällung. In der oberen wässrigen Phase befindet befand sich die RNA. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde für 5-15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4 °C, 12.000x g, 10 min). Danach folgte ein zweimaliger Waschschritt. Dazu wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet mit 75% Ethanol versetzt. Im Anschluss wurde gevortext und bei 4 °C, 12.000xg für 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde das RNA-Pellet für 5 min bei RT getrocknet und in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration mittels NanoDrop photometrisch bestimmt.

3.3.6 Herstellung von Ganzzellextrakten (Proteinlysate)

Die Herstellung der Ganzzellextrakte (Proteinlysate) diente als Vorbereitung für den Western Blot. Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden die Zellen erneut mit 1x PBS versetzt, um sie anschließend mithilfe des Zellschabers aus Eis ernten zu können. Als nächstes erfolgte ein Zentrifugationsschritt (4 °C, 590x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in dem fünffachen Volumen des Pellets in NETN-Puffer mit Proteaseinhibitor (Roche Complete) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Als nächstes erfolgte dreimaliges Frieren/Tauen in flüssigem Stickstoff und im 37 °C Wasserbad. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 4 °C, *full speed* für 15 min pelletiert. Der gewonnene Überstand entsprach dem Ganzzellextrakt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Ganzzell-Proteinlysaten genutzt, um anschließend die *Knockdown*-Effizienz der einzelnen shRNA-Konstrukte in einem Western Blot zu bestätigen. Zunächst wurden die Gelelektrophorese-Kammern zusammengesetzt. Das 10%ige Trenngel und das Sammelgel wurden wie folgt vorbereitet: Trenngel: 1,9 ml H_2O; 1,7 ml 30 % Acryl-Bisacrylamid; 1,3 ml 1.5M Tris pH 8.8; 50 µl 10% SDS; Sammelgel: 1,4 ml H_2O; 330 µl 30% Acryl-Bisacrylamid; 250 µl 1.5M Tris pH 6.8; 20 µl 10% SDS. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. 50 µl Ammoniumpersulfat (APS) wurden hinzugegeben und kurz invertiert. Danach wurden 2 µl TEMED hinzugegeben und erneut invertiert. Das fertige Gemisch wurde in den sog. *Spacer* pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Isopropanol abgeschüttet, und das Sammelgel wurde mit 20 µl APS und 2 µl TEMED versetzt und invertiert. Das fertige Gemisch wurde in den *Spacer* auf das Trenngel pipettiert und dann die Kämme eingesetzt. Die elektrische Leitung wurde durch den SDS-Laufpuffer gewährleistet. Jeweils 20 µg Vollproteinlysat wurde mit 4x SDS-Puffer und NETN+PI versetzt und vor Verwendung denaturiert (5 min bei 99°C). Die Auftrennung der Proteinlysate im Sammelgel erfolgte bei 100 V für 20-30 min, gefolgt von der Auftrennung im Trenngel bei 150 V für ungefähr 1h.

Tab. 22: Zusammensetzung des 10x SDS-Laufpuffer.

Material	**Menge**
SDS	10 g
Tris	30,3 g
Glycin	144,1 g
H_2O	Auffüllen auf 1 l
1:10 Verdünnung mit H_2O	

Tab. 23: Zusammensetzung des 4x SDS-Puffer.

Material	**Menge**
Glycerol	40 %
SDS	8 %
Beta-Mercaptoethanol	20%
Tris HCl	1,5 mM
H_2O	
pH 6,8	

Tab. 24: Zusammensetzung des NETN-Puffers.

Material	**Menge**
NaCl	100 mM
Tris HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	1 mM
Tergitol Typ NP-40	0,5 %
H_2O	

3.4.2 *Semi Dry* Western Blot

Nun erfolgte der *Blotting* Schritt. Hier wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mithilfe eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Zu Beginn wurden 5 Whatman-Filterpapiere in 2,5 ml Methanol (MeOH) und 22,5 ml SDS-Puffer getränkt und auf die Blotplatte gelegt. Die PVDF-Membran wurde in 2,5 ml MeOH aktiviert und kurz in 2,5 ml MeOH und 22,5 ml SDS-Puffer gewaschen. Danach wurde sie auf die Filterpapiere platziert. Das Sammelgel wurde entfernt, und das Trenngel auf der Membran luftblasenfrei platziert. Über die Membran wurden wieder fünf in MeOH und SDS-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt. Der Deckel der *Semi*

Dry Blot-Apparatur wurde verschlossen und es wurde bei 120 mA 45 min geblottet.

Nach dem *Blotting* erfolgte die Blockierung der Membran mit 4% Milchpulver in TBS für eine Stunde bei RT auf dem Rotator, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Danach wurde 3x 10 min mit TBS-T gewaschen.

Der primäre Antikörper (alpha-Tubulin 1:2000) wurde in entsprechender Konzentration in 5ml TBS-T verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Primärantikörper binden spezifisch an das nachzuweisende Protein-Epitop. Danach wurde 3x 10 min mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die sekundären Antikörper (alpha-HRP-rb 1:5000) wurden ebenfalls in 5 ml TBS-T gelöst und dann für eine Stunde bei RT mit der Membran auf dem Schüttler inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet an die Fc-Region des primären AK und katalysiert die Chemolumineszenz-Reaktion des HRP-Substrates. Dann erfolgte erneut ein Waschschritt (10 min mit TBS-T). Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte durch Zugabe von HRP-*Juice*. 30 min vor dem Imaging wurden 0,5 ml Substrat A und 0,5 ml Substrat B vermischt und im Dunkeln inkubiert. Das Gemisch wurde auf die Membran gegeben und 2-20 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnten die Proteine auf der Blotmembran mit dem Fujifilm LAS3000 Bildanalysesystem detektiert und fotografiert werden. Ausgewertet wurden die Western Blots mit Fiji ImageJ (ImageJ Version 1.53c; Java 1.8.0_66). Dazu wurde das Bild in Graustufen konvertiert. Als nächstes wurden die einzelnen Banden markiert und in einer Profildarstellung angezeigt. Die Ausschläge (Peaks) korrespondieren mit der Anzahl der Grauwerte der Banden im Originalbild. Das Hintergrundsignal wurde subtrahiert. Anschließend wurde jeder Peak mit seiner Größe gekennzeichnet. Dies wurde als Prozentsatz der Gesamtgröße aller Peaks ausgedrückt.

Tab. 25: Zusammensetzung des TBS-T Puffers.

Material	**Menge**
10x TBS	10% v/v
Tween 0,1%	0,1% v/v
H_2O	ad 500 ml

3.4.3 cDNA-Synthese und quantitative PCR (qPCR)

Zu Beginn wurden Reaktionspartner in genannter Reihenfolge zusammen pipettiert: 1 µg Gesamt-RNA, 2 µl Enzymmix (enthält Maxima Reverse Transkriptase und RiboLock RNase Inhibitor) und 4 µl Maxima Reverse Transkriptase (RT). Der Ansatz wurde kurz gemischt, anzentrifugiert und dann 30 min bei 50 °C inkubiert. Danach wurde bei 85 °C für 5 min inaktiviert. 2 µl der cDNA wurden dann für einen 50 µl qPCR-Ansatz eingesetzt. Die qPCR wurde genutzt zur Quantifizierung der Degs1-mRNA Mengen zur Bestimmung der Degs1-shRNA *Knockdown*-Effizienz. Hierfür wurde die cDNA zunächst 1:5, und die Primer 1:10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Pro Well wurden dann 0,2 µl *forward* Primer und 0,2 *reverse* µl Primer pro Gen, sowie 2,6 µl Nuklease-freies Wasser zusammengemischt. Nach Zusatz von 5 µl SYBR Green und 2 µl der verdünnten cDNA wurde der Reaktionsansatz in ein Well einer 96 Well Platte pipettiert. Als Kontrolle wurde mActin mitgeführt. Der Programmlauf ist der Tabelle 26 zu entnehmen. Die qPCR wurde mit *StepOne* Plus von Applied Biosystems durchgeführt. Ausgewertet wurde mit Hilfe der StepOne Software v2.3 mittels 2-ΔΔCt-Methode.

Tab. 26: Programmlauf des *Cycler* für die qPCR.

Temperatur (°C)	Zeit (s)	Menge
95	120	1
95	5	40
60	10	40
72	30	40
95	60	1
60	60	Schritte von 0,6 °C für jede 10 s
95	10	

3.4.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA-Proben sowie Proteinlysaten wurde mittels NanoDrop (ThermoScientific) durchgeführt. Zu Beginn wurden 1 bis 2 µl Leerprobe (jeweils H2O für Protein und RNA) auf den Messplatz pipettiert und so der Leerwert bestimmt. Anschließend wurden jeweils 1 bis 2 µl der jeweiligen Probe gemessen. Die Proteinlysate wurden in der

Einstellung Protein280, und die RNA-Proben unter Nukleinsäuren → RNA gemessen.

3.5 Immunzytochemische Methoden

3.5.1 Immunfärbung embryonaler Neurone

Die Neuronenkulturen aus embryonalem Mauskortex wurden von Jenice Linde und Julia Reichardt (Lehrstuhl Funktionelle Epigenetik im Tiermodell, Institut für Biologie II, RWTH Aachen) präpariert und kultiviert. Die Immunfärbung der Neurone erfolgte im Labor der Humangenetik. Die für 15 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixierten Neurone wurden zu Beginn in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal je 5 min in PBS/0,1% Triton-X-100 gewaschen. Als nächstes erfolgte ein 30-minütiger Blockschritt. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 in Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut 3x mit PBS/0,1% Triton-X-100 gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen für 1h mit dem sekundären Antikörper (1:1000 in Blocklösung verdünnt) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit Phalloidin-647 (1:200 in PBS) zur Färbung von Aktinfilamenten. Danach wurde für 10 min in 1x PBS gewaschen. Die Kerne wurden mit Hoechst 33258 für 5 min gefärbt, und anschließend die Deckgläschen wieder in 1x PBS 10 min gewaschen. Zum Eindeckeln der Deckgläschen auf Objektträger wurden jeweils 5 µl *Prolong Diamond* auf den Objektträger gegeben. Die Objektträger konnten über Nacht im Dunklen trocknen und wurden schließlich mit Klarlack versiegelt.

Tab. 27: Zusammensetzung der Blocklösung.

Material	**Menge**
BSA	4%
Triton-X-100	0,1%
in PBS; pH 7,4	

3.5.2 Immunfärbung transfizierter N2a-Zellen

N2a-Zellen wurden in einer 24 Well Platte auf 13mm Deckgläschen kultiviert und transfiziert. Dann wurden die Zellen 2x mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend mit je 250 µl 4% Paraformaldehyd (PFA)/Well für 15 min bei RT fixiert. Danach folgte 3x 5 min waschen mit PBS, und die Inkubation der Deckgläschen für 20-30 min in 450 µl *Quenching* Lösung. Es wurde erneut 3x mit PBS gewaschen, gefolgt von der Blockierung mit 250 µl Blocklösung für 1h bei RT. Als nächstes folgte die Beladung mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle AK). Genutzt wurde der NF200-AK in einer Verdünnung von 1:500 in Antikörper-Blocklösung. 250 µl/Well der primären AK-Lösung wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde *donkey* Anti-*mouse*-AK (1:1000) zusammen mit DAPi (1:2000) in AK-Blocklösung eingesetzt. Inkubiert wurde in 250 µl/Well für eine Stunde bei RT. Der sekundäre AK bindet spezifisch an den primären AK und ermöglicht die Fluoreszenz-basierte Detektion der Immunsignale. Danach wurde erneut 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Eingedeckelt wurden die Zellen mit einem Tropfen *Prolong Diamond* und im Dunkeln bei RT getrocknet.

Tab. 28: Zusammensetzung der *Quenching* Lösung.

Material	**Menge**
Glycin	93,84 mg
PBS	50 ml

Tab. 29: Zusammensetzung der Blocklösung.

Material	**Menge**
FCS (Fetal Calf Serum)	10%
NGS (Normal Goat Serum)	1%
PBS, pH 7,4	

Tab. 30: Zusammensetzung der Antikörper-Blocklösung.

Material	Menge
Blocklösung wie oben beschrieben	
Triton-X-100	0,05%

3.5.3 Fluoreszenz-Mikroskopie und Auswertung

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden anschließend mit einem Zeiss Observer Z.1 Mikroskop, ausgestattet mit Apotome 2 und HXP 120 Lampe, aufgenommen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden anschließend mit Hilfe von Fiji ImageJ (ImageJ Version 1.53c; Java 1.8.0_66) bearbeitet und ausgewertet. Die AlexaFluor555-markierte siRNA ist in den Abbildungen rot, DAPi-positive Zellkerne sind blau und Beta3-Tubulin-positive Neurone grün dargestellt. Für die morphometrische Auswertung wurden zunächst die einzelnen Fortsätze des Neurons gezählt. Anschließend wurde der längste Fortsatz des Neurons identifiziert und seine Länge mit dem Linien-Tool (Segmented Line) markiert und gemessen. Von diesem Fortsatz wurden zudem noch die einzelnen Verzweigungspunkte gezählt.

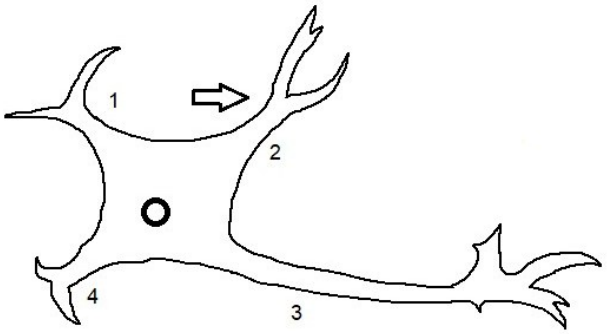


Abb. 8: Beispielhafte Auswertung eines Neurons. Eine schematisch dargestellte Nervenzelle mit beispielhafter Auswertung wie mit den transfiziertezn Neuronen geschehen. Die Zahlen verdeutlichen die Anzahl der gezählten Neuriten, der Pfeil markiert einen Verzweigungspunkt des Fortsatzes #2. Für die Längenmessung des längsten Neuriten wurde dieser von Soma-Rand bis zur Spitze seines Wachstumskegels gemessen. Hier in dem Beispiel wäre das Fortsatz #3.

3.6 Genutzte Software

Falls nicht anders beschrieben, wurden Plasmidkarten mit SnapGene (Version 5.3.2, Insightful Science, www.snapgene.com), Graphen und Statistik mit GraphPad Prism (Version 8.0, GraphPad Software, Inc.) und die Abbildungen mit PowerPoint 2016 (Microsoft Office) erstellt. Für anderweitige Auswertungen

wurde Fiji ImageJ V2.9 und StepOne Software V2.3 (Applied Biosystems) genutzt.

4. Ergebnisse

Für eine der bekannten pathogenen Varianten im *DEGS1*-Gen, p.(A280V), wurde gezeigt, dass diese die Proteinstabilität von *DEGS1* negativ beeinflusst und somit zu einer massiven Reduktion der Enzymaktivität führt (Karsai, et al., 2019). Um die Degs1-assoziierten zellulären Effekte *in vitro* in neuronalen Zellen untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene *Knockdown*-Strategien zur Reduktion der *Degs1*-Expression genutzt und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Im Gegensatz zu shRNA, welche erst in der Zelle zu einer siRNA prozessiert werden muss, dafür aber länger persistiert, wirkt die siRNA direkt und somit schneller. So können aufgrund der kürzeren Wirkdauer von siRNA eher akute Effekte eines *Knockdowns* untersucht werden. Mit shRNA-Konstrukten kann die Expression einer mRNA hingegen länger unterdrückt werden bei meist deutlich geringerer Kopienzahl von siRNA-Molekülen, sodass hier oft längerfristige *in vitro*-Effekte mit geringerer Off-Target-Rate analysiert werden können (Rao, Vorhies, Senzer, & Nemunaitis, 2009).

4.1 Klonierung und Validierung der *Knockdown*-Effizienz der shRNA in N2a-Zellen

Im Gegensatz zu siRNA eignen sich shRNA-Konstrukte aufgrund ihrer vektorbasierten Expression für eine längerfristige Genunterdrückung. Um eine größere Zeitspanne von bis zu 72h des Degs1-*Knockdowns* in Zellen zu untersuchen, wurden shRNA-Konstrukte generiert. Die mit Hilfe des *BlockIT RNAi Designer* Online-Tools (https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/) generierten und spezifisch gegen murine und humane *Degs1*-mRNA gerichteten shRNAs (s. Tabelle 2) wurden zunächst kloniert, um für einen *Knockdown in vitro* eingesetzt zu werden. In dieser Arbeit erfolgte die Validierung der gegen humane *DEGS1*-mRNA gerichteten shRNA. Bedingt durch das Fehlen eines mausspezifischen Anti-Degs1-Antikörpers konnte ihm Rahmen dieser Arbeit keine Effizienzvalidierung für shRNA 1 und 2 an endogen exprimiertem Degs1 in Mauszellen mittels Western Blot erfolgen. Es wurde zusätzlich zur shRNA ein humanes pEGFP-wt-DEGS1 Fusionsprotein in den Vektor kloniert. Ein Nachweis auf Proteinebene wurde mit Hilfe eines Western Blots durchgeführt. Durch das ekoexprimierte EGFP konnte die *Knockdown* Effizienz über einen GFP-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Zunächst erfolgte die

Validierung der gegen humanes *DEGS1* gerichteten shRNA3 für den Einsatz in humanen Zelllinien wie z.B. HEK, HeLa, iPSCs. Die Expression eines humanen EGFP-DEGS1 Fusionsproteins wurde durch die shRNA3 beeinflusst (Abb. 11). Dies konnte über den GFP-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Durch die zwei gegen Maus gerichteten shRNAs konnte gezeigt werden, dass humanes *DEGS1* von gegen Maus gerichtete shRNAs unbeeinflusst bleibt. Die shRNAs 1 und 2 sowie die scrambled-shRNA dienten hierbei als Spezifitätskontrollen. N2a-Zellen sind murine Neuroblastomzellen, welche eine neuronale Stammzellmorphologie aufweisen und sich durch spezifische Faktoren wie Retinolsäure in Neuronen-ähnliche Zellen differenzieren lassen. Wenn dies geschieht, können die N2a-Zellen Neuriten ausbilden (Martín, Ruano, Yúfera, & Daza, 2024). N2a-Zellen werden häufig genutzt, um neuronale Differenzierung zu untersuchen (G Tang, 2015). Obwohl bioinformatisch ein effizienter DEGS1-*Knockdown* vorhergesagt wurde, erfolgte eine Validierung der *Knockdown*-Effizienz der humanspezifischen shRNA in N2a-Zellen.
Für die Klonierung wurde der pRNAT Hygro H1.1 (Genscript) Vektor als Backbone genutzt. Dieser ist ein siRNA-Expressionsvektor und für die Transfektion von Säugetier-Zellen geeignet.
Es erfolgte zuerst der Restriktionsverdau des nativen Vektors mit den Restriktionsenzymen *BamHI* (Schnitt bei Nukleotid 6271) und *HindIII* (Schnitt bei Nukleotid 6289), wie im Methodenteil beschrieben (s. 3.1.4; Abb. 8a). Dadurch wurde der Vektor linearisiert und mit den entsprechenden, für den Einbau der shRNA-Oligos benötigten komplementären DNA-Überhänge versehen. Der geschnittene Vektor wurde nun aus dem Gel isoliert und für die weitere Klonierung genutzt (Abb. 8b).

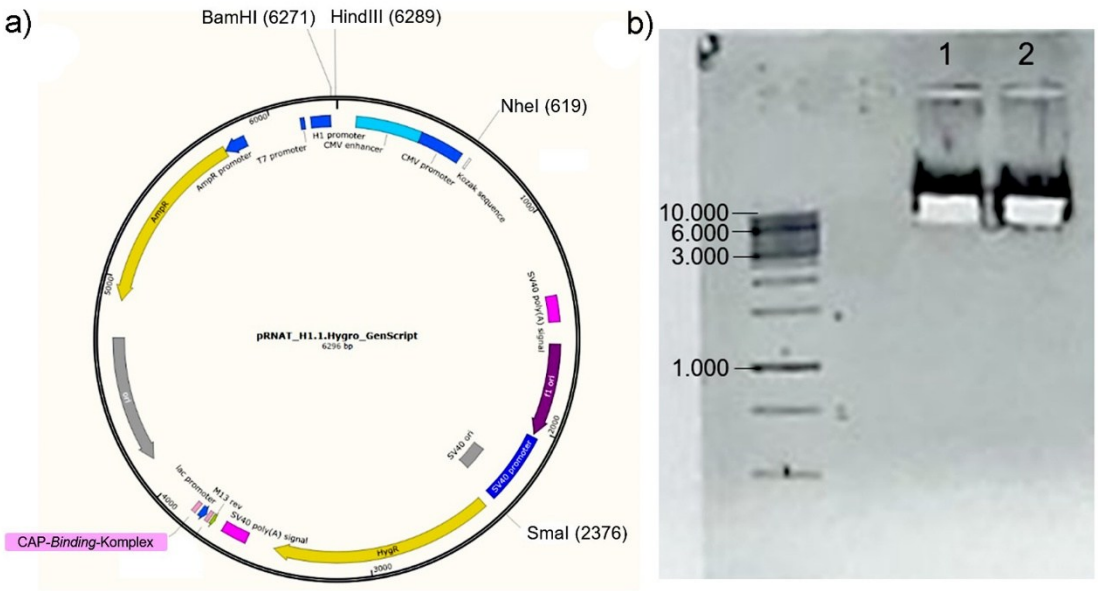


Abb. 8: Aufbau des genutzten Vektors und präparativer Restriktionsverdau des Vektors mit *BamHI* und *HindIII*. a) pRNAT H1.1 Hygro als *Backbone* für nachfolgende Klonierungsschritte. Die wichtigen Strukturen und relevanten Enzyme sind dargestellt.
b) Originalgel des Restriktionsverdaus des genutzten Vektors pRNAT H1.1 mit BamHI und HindIII in einem 1% Agarose Gel. Von links nach rechts: GeneRuler Ladder 1 kb, 1+2: pRNAT H1.1 geschnitten mit HindIII und BamHI.

Nun erfolgte die Ligationsreaktion des geschnittenen Vektors mit den zuvor annealten *Degs1*-shRNAs. Für das Annealing der Oligos wurden zwei verschiedene Ansätze genutzt, da das Annealing nach Protokoll 1 (s. 3.1.2) für shRNA1 und shRNA2 nicht erfolgreich war. Ein Nachweis auf Proteinebene war später für das Ermitteln der *Knockdown*-Effizienz erforderlich. Es wurden zwei murine *Degs1* shRNAs als Spezifitätskontrolle genutzt. Die dritte shRNA war humanspezifisch und beeinflusste die Expression des Proteins. Dies wurde mittels GFP-Antikörper im Western Blot nachgewiesen (Abb. 11). Des Weiteren wurde eine *scrambled* shRNA kloniert und in N2a-Zellen transfiziert. Die *scrambled* shRNA hat keinen Einfluss auf die Expression des *DEGS1*-Gens und diente deshalb hier als Kontrolle. Der bereits die shRNAs enthaltende pRNAT H1.1 Vektor wurde dafür geschnitten (Abb. 9 a-c) und mit dem pEGFP-wt-*DEGS1*-Fragment ligiert.
Um eine erfolgreiche Klonierung (pRNAT H1.1 + shRNA + pEGFP-wt-DEGS1) nachzuweisen, wurde ein analytischer Verdau mit BamHI durchgeführt (Schema s. Abb. 9e). Bei einer erfolgreichen Klonierung, sowie einem erfolgreichen Verdau sind Banden bei ca. 5.000 bp und 1.500 bp zu erwarten. Dies ist für die

zweite, vierte und sechste Probe in Abbildung 9d) zu erkennen. Mit diesen Proben wurde weitergearbeitet.

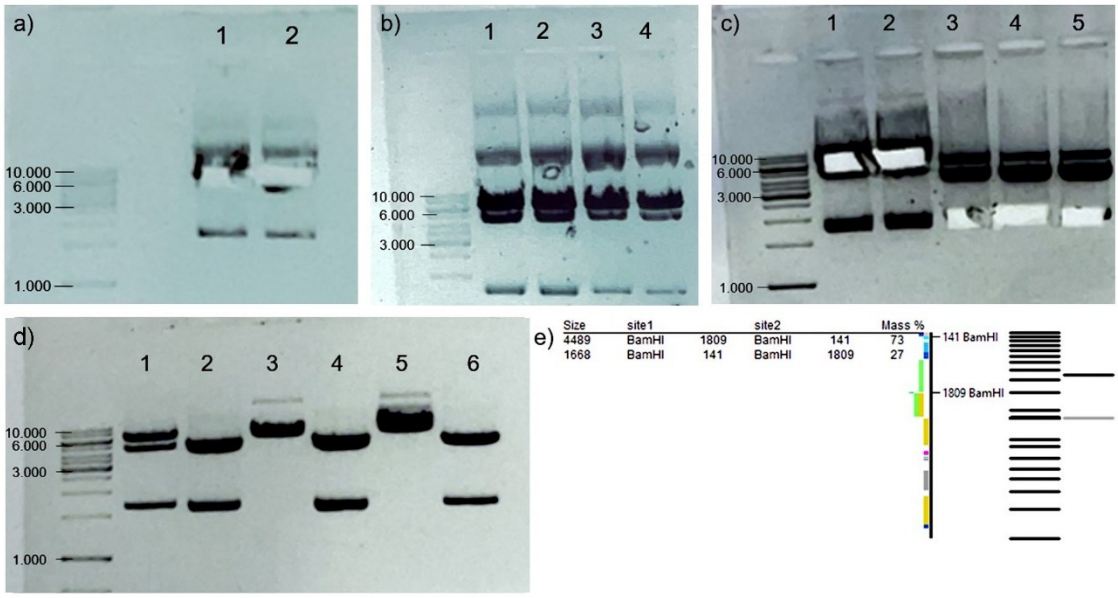


Abb.9: Klonierungsprozess der *DEGS1*-KD-shRNA-Plasmide. a) Restriktionsverdau des mit der *scrambled* shRNA klonierten Vektors mit NheI und SmaI. GeneRuler 1kb Ladder, 1+2: pRNAT H1.1 + scrambled shRNA geschnitten mit NheI und SmaI in 1% Agarose Gel.
b) Restriktionsverdau des mit der shRNA1 und shRNA2 klonierten Vektors mit NheI und SmaI. GeneRuler 1kb Ladder, 1+2: pRNAT H1.1 + shRNA1 geschnitten mit NheI und SmaI, 3+4: pRNAT H1.1 + shRNA2 geschnitten mit NheI und SmaI in 1% Agarose Gel. **c)** Restriktionsverdau des mit der shRNA3 klonierten Vektors mit NheI und SmaI, sowie des *pEGFP-wt-DEGS1* mit NheI und HincII. GeneRuler 1kb Ladder; Gelspur 1+2: pRNAT H1.1 + shRNA3 geschnitten mit NheI und SmaI, 3-5: pEGFP-wt-DEGS1 geschnitten mit NHeI und HincII in 1% Agarose Gel.
d) Analytischer Verdau des klonierten Vektors mit BamHI. Die Schnittstelle des Enzyms BamHI liegt in dem klonierten pEGFP-wt-DEGS1, daher sind bei einer erfolgreichen Klonierung zwei Banden bei ca 5.000 bp sowie 1.500 bp zu erwarten. Dies erkennt man in dem 1% Agarosegel bei der zweiten, vierten und sechsten Probe. **e)** Simulation des erfolgreichen analytischen Verdaus mit BamHI des pRNAT H1.1 mit klonierter shRNA und EGFP-DEGS. Genutztes Programm: APE Plasmid Editor.

In Abbildung 10 sieht man die sequenzierten shRNA-Konstrukte. Dabei wurden der *Sense*-Strang (rot), *Loop* (gelb) und *Antisense*-Strang (blau) markiert. Die Sequenzierung ist im Falle der shRNA1 zu früh abgebrochen. Da aber ein Bruchteil der Sequenz zu erkennen ist, wird davon ausgegangen, dass auch diese Sequenz validiert ist.

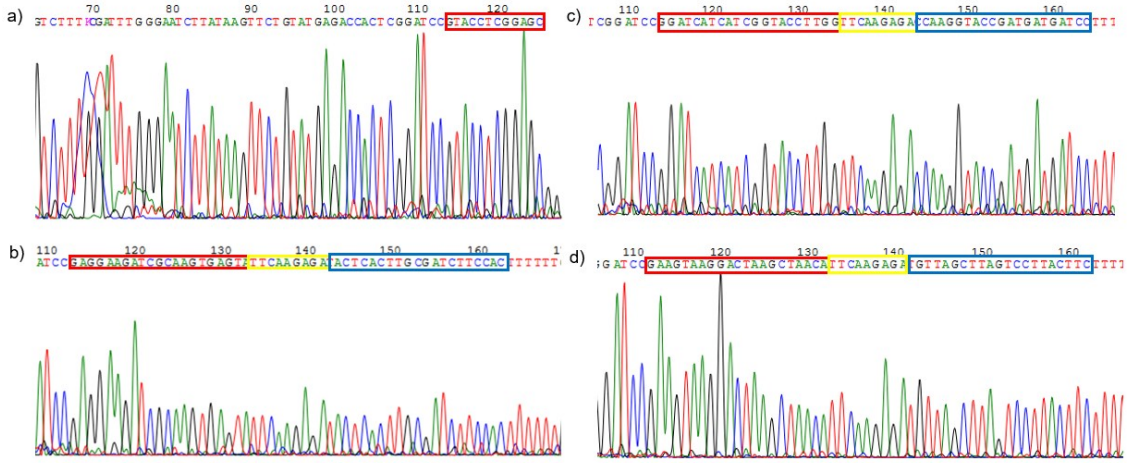


Abb. 10: Sequenzierte shRNA-Konstrukte. Abgebildet ist der *Sense*-Strang (rot), der *Loop* (gelb) und der *Antisense*-Strang (blau). a) Sequenzierte shRNA1. Hier wurde die Sequenzierung zu früh abgebrochen. Trotzdem ist durch das Vorhandensein des Sense-Stranges sehr wahrscheinlich, dass das gesamte Konstrukt erfolgreich kloniert wurde. Auch eine Wiederholung hat keine vollständigen Sequenzinformationen geliefert. Vor Einsatz des Konstrukts sollte die Sequenzierung mit anderen Seq-Primern erfolgen. **b)** Sequenzierte shRNA2. **c)** Sequenzierte shRNA3. **d)** Sequenzierte *scrambled* shRNA.

Um eine valide Aussage über die Effizienz des *Knockdowns* zu treffen, wurden zwei Zeitpunkte (24h und 48h nach Transfektion) verglichen. Außerdem wurden die Experimente zweimal unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Die Transfektion wurde mit PolyJet durchgeführt und die Transfektionseffizienz betrug in allen Experimenten ca. 20% (basierend auf Fluoreszenz der Zellen). In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass die relative DEGS1-Protein Expression nach Transfektion der shRNA1 und 2 nicht signifikant reduziert ist. Dies war zu erwarten, da humanes *Degs1* nicht von der Maus-spezifischen shRNA beeinflusst werden sollte. Bei Transfektion der shRNA3 jedoch ist zu erkennen, dass sich bereits 24h nach der Transfektion die DEGS1-Proteinexpression um 60% im Vergleich zur *scrambled* shRNA vermindert hat. Auch nach 48h bleibt die Proteinexpression um 60% vermindert, was für einen stabilen KD über mindestens 2 Tage spricht (Abb. 11). Die DEGS1-EGFP Bande stellt sich bei 67 kDa dar. EGFP hat ein Molekulargewicht von 29 kDa und DEGS1 von 38 kDa. Nach Quantifizierung der Bandenintensität mittels Fiji ImageJ wird deutlich, dass die shRNA3 einen signifikanten *Knockdown* in N2a-Zellen bewirkt. Die shRNA3 kann somit zur Modulation der DEGS1-Expression in humanen Zelllinien genutzt werden.

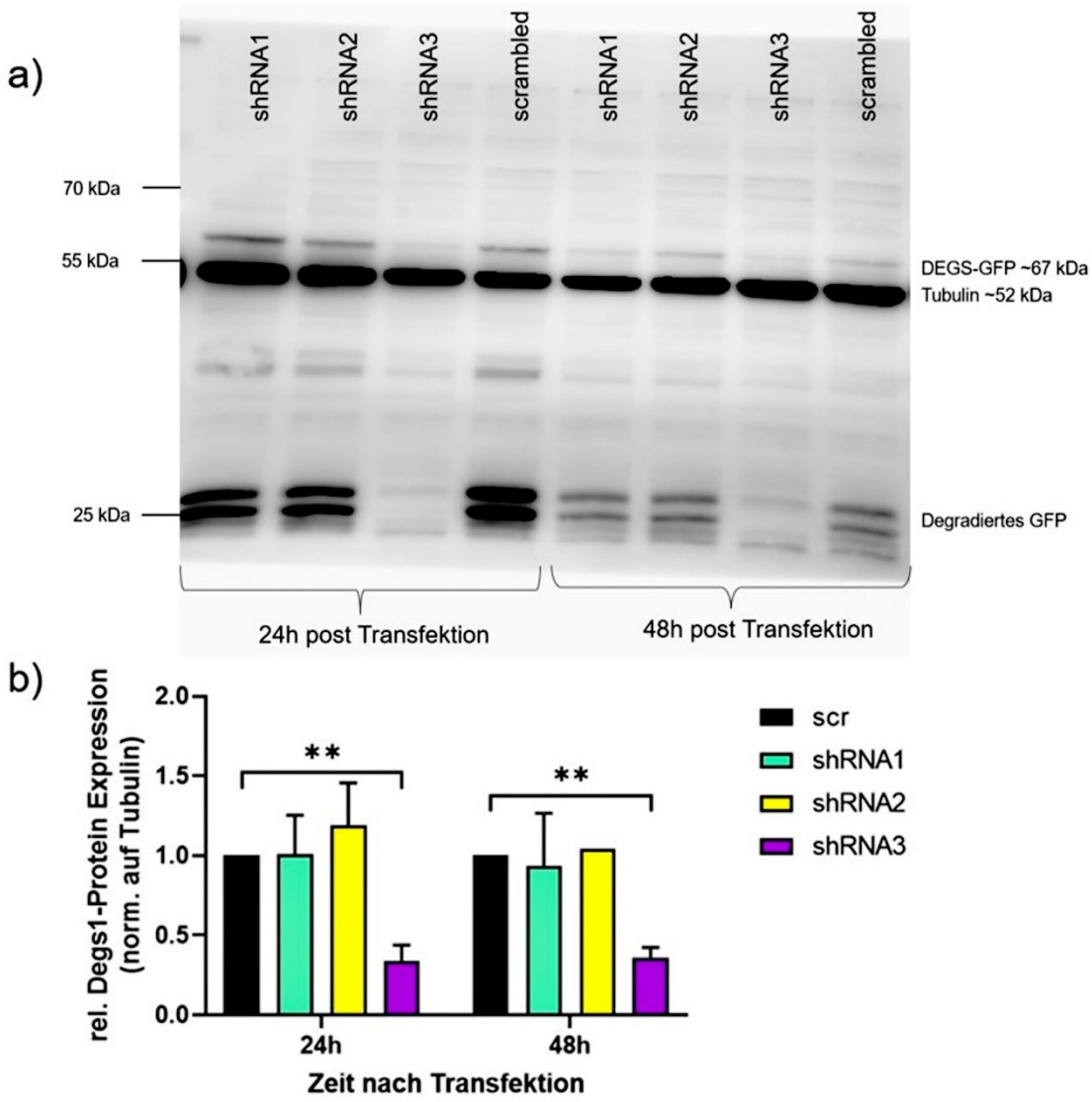


Abb. 11.: *Knockdown*-Effizienz der shRNAs in N2a-Zellen. a) Western Blot der transfizierten N2a-Zellen 24h und 48h nach der Transfektion. Von links nach rechts: 1kb Ladder, shRNA1, shRNA2, shRNA3, scrambled shRNA (nach 24h), shRNA1, shRNA2, shRNA3, scrambled shRNA (nach 48h). Als Laufkontrolle wurde Tubulin genutzt. Über der Tubulinbande lässt sich die DEGS1-EGFP Bande detektieren. Erkennbar ist hier, dass sowohl 24h als auch 48h nach der Transfektion bei der shRNA3 kaum ein DEGS1-EGFP Signal erkennbar ist. Bei den anderen Proben hingegen ist eine Bande erkennbar. Bei 25kDa zeigen sich Banden mit degradiertem GFP. **b)** Die relative DEGS1-Protein Expression wurde 24h und 48h nach der Transfektion untersucht. Man erkennt, dass die shRNA3 einen signifikanten *Knockdown* der DEGS1-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Sowohl 24h als auch 48h nach der Transfektion ist die Proteinexpression bei der shRNA3 signifikant um 60% verringert. Die ersten beiden shRNAs haben keinen signifikanten Einfluss auf die DEGS1-Protein Expression. Statistik: Daten entsprechen MW ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM); n=2 oder 3?; **P < 0.001; 1way ANOVA, Sidak's multiple comparisons-Test. Scr = scrambled.

Als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinmengen-Beladung wurde Tubulin genutzt und mit einem Anti-Tubulin-Antikörper (1:2000) detektiert. Tubulin hat ein

Molekulargewicht von 55 kDa und wurde als Auftragskontrolle für die Proben verwendet. Da kein Maus-spezifischer Degs1-Antikörper nutzbar war, wurde *DEGS1* als EGFP-Fusionsprotein in den Vektor kloniert. So konnte ein GFP-Antikörper zur Detektion genutzt werden. Dadurch ergibt sich eine Größe von ca. 105 kDa für das *DEGS1*-EGFP Fusionsprotein. Es ist daher über der Tubulinbande im Western Blot zu erwarten. Auf Höhe der 25 kDa Bande ist degradiertes GFP zu erkennen, welches ebenfalls von dem GFP-AK detektiert wird. Auch hier ist anhand der Intensität der Banden indirekt ein Degs1-*Knockdown* erkennbar. In dem Western Blot erkennt man, dass sowohl 24h als auch 48h nach Transfektion mit der shRNA3 kaum eine *DEGS1*-EGFP Bande zu detektieren ist. Im Gegensatz dazu kann man bei den anderen Proben über der Tubulinbande eine deutliche DEGS1-EGFP Bande erkennen. Nach Quantifizierung (Abb. 11b) zeigt sich ein signifikanter *Knockdown* (**P < 0.001) für shRNA3. Somit konnte ein erfolgreiches KD-Modell für humanes DEGS1 kloniert und validiert werden.

4.2 Validierung der Knockdown Effizienz von *Degs1*-siRNA mittels qPCR

Eine spezifisch gegen *Degs1*-mRNA der Maus gerichtete siRNA wurde kommerziell bezogen (Santa Cruz Biotechnology) und für den *Knockdown* von *Degs1* in der murinen Neuroblastom-Zelllinie Neuro-2a (N2a) eingesetzt. Die hier verwendete siRNA ist ein Gemisch von drei bis fünf zielsequenzspezifischen und 19-25 Nukleotiden langen siRNAs, was eine effiziente Unterdrückung der Genexpression gewährleisten soll. Obwohl kommerziell generierte siRNAs hohe *Knockdown*-Effizienzen garantieren, wurde dies vor dem Einsatz für funktionelle Studien in N2a-Zellen überprüft.

Da kein kommerziell erhältlicher Antikörper zur Verfügung steht, der spezifisch murines Degs1 erkennt (ohne auch Degs2 zu detektieren), erfolgte der Nachweis der Knockdown-Effizienz der *Degs1*-siRNA auf mRNA-Ebene mithilfe einer quantitativen PCR. Hierzu wurden die N2a-Zellen 16h und 24h nach siRNA-Transfektion geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Die Transfektionseffizienz in N2a-Zellen war mit ~80 bis 90 % der transfizierten Zellen sehr hoch (Abb. 12, rot fluoreszierende Kontroll-siRNA).

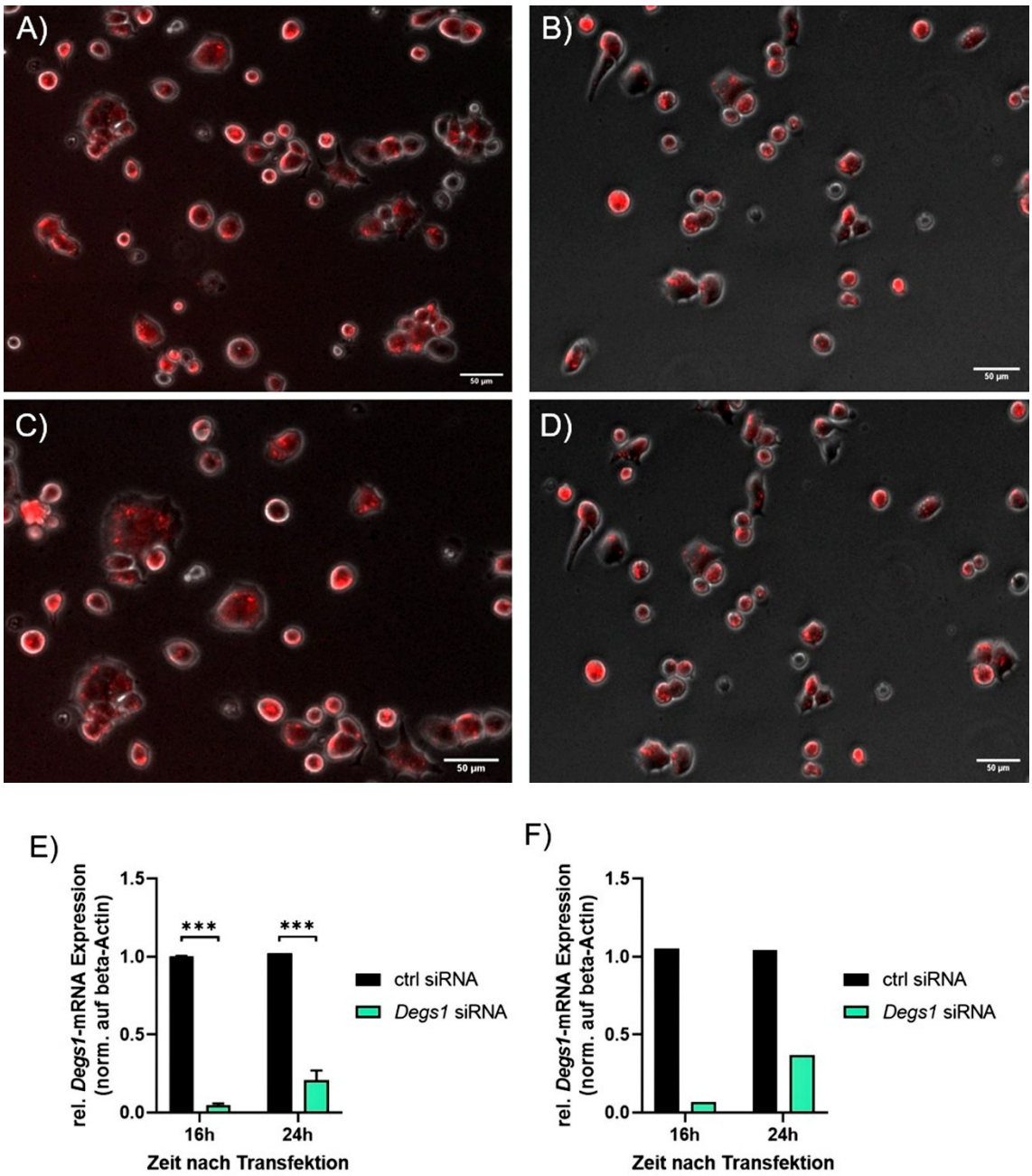


Abb. 12: Transfektionseffizienz und *Knockdown*-Effizienz der *DEGS1*-siRNA in N2a-Zellen. Die Kontroll-siRNA ist mit AlexaFluor555 markiert (rot). Die Transfektionseffizienz beträgt in beiden Protokollen rund 80-90% und ist damit optimal. **A) und C)** Das Bild zeigt die nach dem Standardprotokoll transfizierte siRNA. Von den ca. 116 dargestellten Zellen färben sich ca. 94 Zellen rot. Dies entspricht einer Transfektionseffizienz von ca. 80%. **B) und D)** Transfektionseffizienz der siRNA nach dem reduzierten Protokoll. Auf den Bildern zeigen sich ca. 90 Zellen, wovon sich ca. 82 Zellen rot färben. Dies spricht für eine erfolgreiche Transfektion, und dies entspricht somit einer Transfektionseffizienz von ca 90%. **E)** *Knockdown*-Effizienz siRNA in N2a-Zellen. Relativer *DEGS1-Knockdown* 16h und 24h nach Transfektion bezogen auf das *Housekeeping* Gen *Beta-Actin*. Die relative *Degs1*-mRNA Expression ist nach 16h um 95% und nach 24h um 75% geringer als in der Vergleichskontrolle. Statistik: Daten entsprechen MW ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM), n=2; ***P < 0.0001; 2way ANOVA, Sidak's multiple comparisons-Test. **F)** *Knockdown*-Effizienz siRNA in N2a-Zellen nach *Downscaling*. In dem

Versuch wurde ein Viertel der ursprünglichen siRNA-Menge getestet, um eine minimal-effektive siRNA Menge zu ermitteln. 16h nach Transfektion zeigte sich eine um 90% und nach 24h eine um 60% geringere *Degs1*-mRNA Expression im Vergleich zur Vergleichskontrolle. Daten entsprechen MW ± SEM (n=1).

Nach erfolgreicher Validierung des Transfektionsprotokolls wurde dies für die Co-Transfektion von *Degs1*- und ctrl-siRNA in N2a Zellen genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass die relative *Degs1*-mRNA Expression durch die *Degs1*-siRNA signifikant vermindert wurde. In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass im Vergleich zu der Kontrolle mit einer Kontroll-siRNA die *Degs1*-mRNA Expression nach 16h um 95% gesunken ist. Mit einer um 75% geringeren relativen *Degs1*-mRNA Expression als in der Kontrolle ist dieser Effekt auch 24h nach Transfektion noch persistent. Das beweist, dass mit der kommerziell bezogenen siRNA eine effektive Reduktion der *Degs1*-mRNA erreicht werden konnte.
Um ressourcenschonend (siRNA-sparend) zu arbeiten, wurde ein weiterer Ansatz des Protokolls erprobt (n=1). Dazu wurden nur 2,5 µl der KD-*Degs1*-siRNA und 1,25 µl der ctrl-siRNA im Vergleich zu ursprünglich 10 µl der KD-*Degs1*-siRNA und 5 µl der ctrl-siRNA genutzt. Das Ergebnis zeigte nach 16h einen nahezu vollständigen *Knockdown*, bei dem die *Degs1*-mRNA um ca. 90% vermindert wurde. Nach 24h zeigte sich, dass 60% weniger *Degs1*-mRNA gebildet wurde als in der Vergleichskontrolle.

4.3 Transfektion der *Degs1*-siRNA in primäre Maus-Neuronen

Nach erfolgreicher Validierung der *Degs1*-siRNA und der Vergleichskontrolle im N2a-Zellmodell folgte anschließend die Transfektion der siRNAs in kortikale Mausneuronen. Das Ziel hier war es, die Auswirkungen des *Degs1-Knockdowns* direkt in den Neuronen analysieren zu können. Dazu wurden die Zellen nach der Transfektion PFA-fixiert, mit beta-III-Tubulin (Tubb3)-Antikörpern und Phalloidin gefärbt und die Färbungen mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Der Effekt des *Degs1-Knockdowns* auf die neuronale Komplexität wurde anhand verschiedener neuromorphologischer Merkmale beurteilt. Ausgewertet wurde die Anzahl der Neuriten und die Länge des längsten Neurits. Außerdem wurden von dem längsten Neurit eines Neurons die einzelnen Verzweigungspunkte gezählt und mit der Kontrollgruppe verglichen. Insgesamt wurden 105 Neurone, welche mit der ctrl-siRNA transfiziert wurden, und 108 Neurone, welche mit der *Degs1*-siRNA transfiziert wurden, ausgewertet. Morphologisch stellt sich ein Unterschied

zwischen den Neuronen mit Kontroll-siRNA und *Degs1*-siRNA dar. In Abbildung 13 zeigt sich die transfizierte siRNA durch Markierung mit AlexaFlour555 rot. Dadurch, dass rote Fluoreszenzsignale im Soma des Neurons zu erkennen sind, ist von einer erfolgreichen Transfektion auszugehen. Die blaue Fluoreszenz (DAPi) stellt den Nucleus des Neurons dar und das grüne Fluoreszenzsignal die mittels Tubb3 markierten Zellfortsätze. In den Neuronen mit der Kontroll-siRNA (Abb. 13a und b) ist zu erkennen, dass vom Soma multiple Neuriten ausgehen, welche zudem Verzweigungspunkte bilden. Im Gegensatz dazu stehen die Neurone, welche mit der *Degs1*-siRNA (Abb. 13c und d) transfiziert wurden. Hier zeigen sich weniger Zellfortsätze, welche auch insgesamt weniger vital erscheinen. Außerdem bilden die wenigen Neuriten auch kaum oder keine Verzweigungspunkte. Weiterhin ist zu erkennen, dass der längste Neurit des Neurons in den *Knockdown*-Neuronen deutlich kürzer ausfällt als in der Vergleichsgruppe.

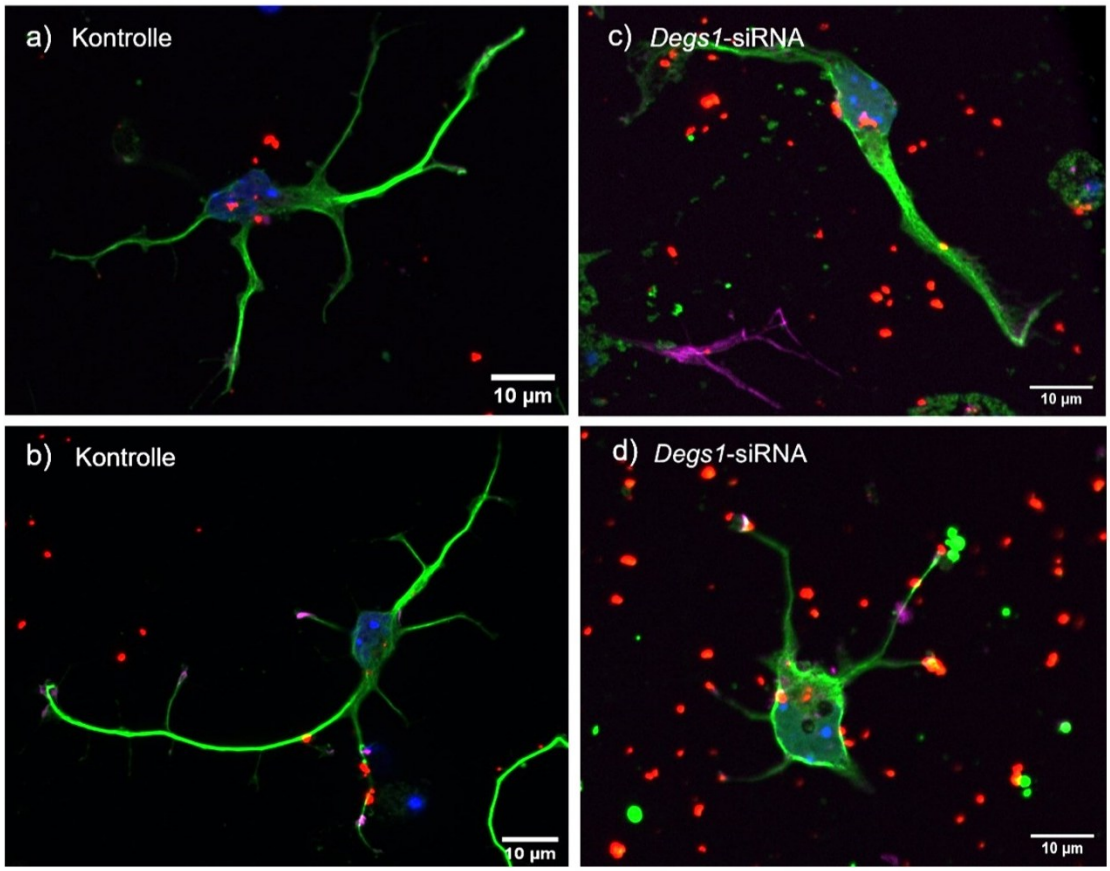


Abb. 13: Morphologie muriner Neurone nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (a und b) und Degs1-siRNA (c und d). rot = siRNA, grün = Zellfortsätze, blau = Nucleus. **(a und b)** Die Neurone, welche mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, weisen mehr Zellfortsätze ausgehend vom Soma, als auch mehr Verzweigungspunkte der Fortsätze auf. **(c und d)** Die

Neurone, welche mit der Degs1-siRNA transfiziert wurden, zeigen weniger Fortsätze und auch weniger Verzweigungspunkte.

Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 14 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Länge des längsten Neurits der Zelle unter *Degs1*-KD, im Vergleich zu der Kontrolle, um deutlich mehr als die Hälfte reduziert ist. Während der längste Neurit der Kontrolle im Mittel 85±5 µm lang war, wies der längste Neurit von mit der KD-siRNA transfizierten Neuronen nur eine Länge von 40±3 µm auf. Das Ergebnis ist mit ***P<0.0001 signifikant. Außerdem ist in Abbildung 14 zu erkennen, dass auch die Anzahl der Neuriten in der *Degs1*-siRNA-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert ist. Während die Vergleichskontrolle im Schnitt 3,2 Neuriten pro Neuron bildet, sind es bei der *Degs1*-siRNA Gruppe nur 2,75 Neuriten (**P<0.001). Diese Ergebnisse lassen Hinweise darauf zu, dass die Differenzierung der primären Neurone unter *Degs1*-Defizienz gestört sein könnte. Die Abnahme der Neuritenlänge betraf in unseren Kulturen in erster Linie die terminalen Äste, was zu einer allgemeinen Verringerung der neuronalen Komplexität durch den *Degs1-Knockdown* führte. Die Verzweigungspunkte des längsten Neuriten unterschieden sich nicht signifikant (P = 0,2159) zwischen der Kontroll-siRNA und der Degs1-siRNA (Abb. 14d).

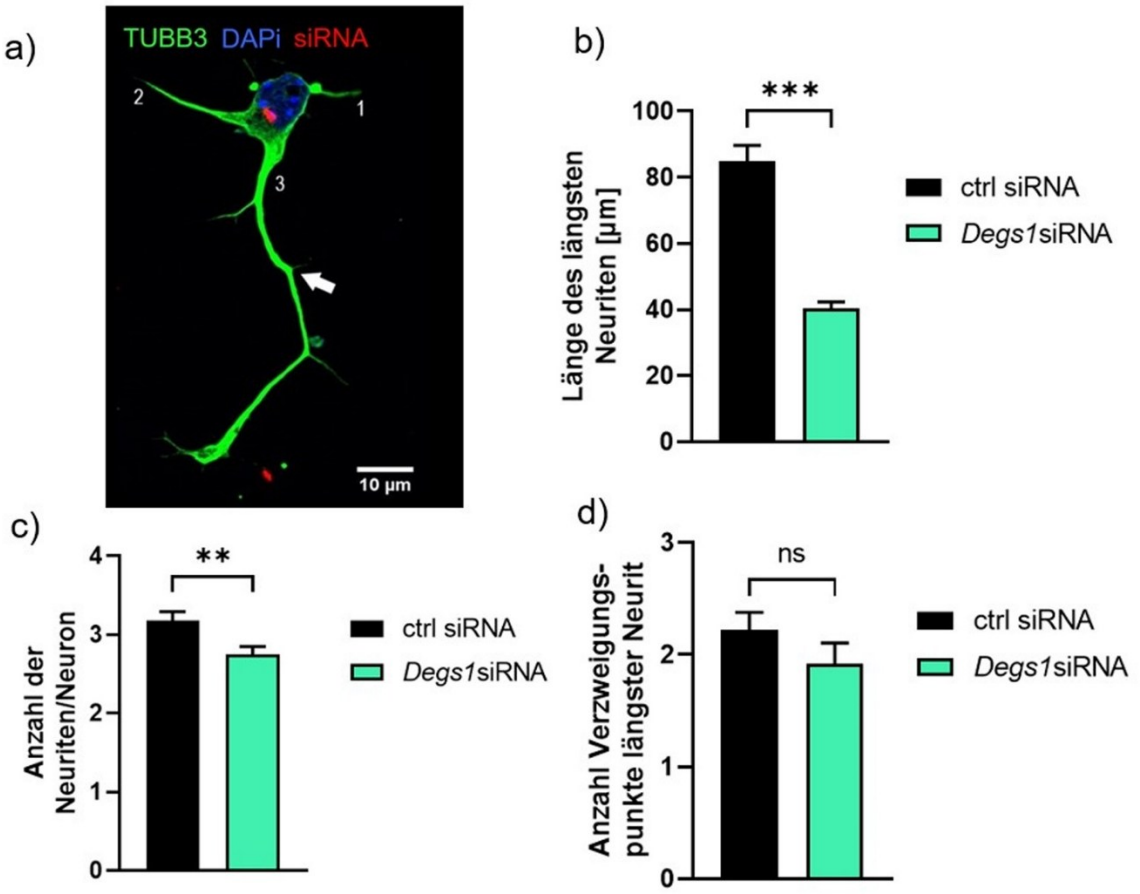


Abb. 14: Morphometrische Auswertung siRNA-transfizierter Neurone. a) Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt ein Neuron aus der siRNA-Kontrollgruppe. Die mit 1-3 markierten Positionen entsprechen den gezählten Zellfortsätzen. Der Fortsatz Nr. 3 ist hier der längste Fortsatz. Verzweigungspunkt beispielhaft markiert (weißer Pfeil). Grün: TUBB3, rot: siRNA, blau: DAPi **b)** Vergleich des längsten Neurits zwischen ctrl-siRNA und Degs1-siRNA**.** Die Abbildung vergleicht die Länge des längsten Neurits des Neurons mit der Kontroll-siRNA im Vergleich zu den Neuronen mit der KD-siRNA. Auf der Y-Achse ist die Länge in µm angegeben. Statistik: ***P-Wert <0,0001, Daten entsprechen MW ± SEM, n=105 ctrl-siRNA/108 *Degs1*-siRNA; die statistische Überprüfung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigen t-test (*unpaired t-test*) **c)** Vergleich der Anzahl der Neuriten pro Neuron zwischen ctrl-siRNA und Degs1-siRNA**.** In der Abbildung wird die Anzahl der Neuriten pro Neuron zwischen den beiden Gruppen verglichen. Man erkennt ein signifikantes Ergebnis. Während Neurone mit der ctrl-siRNA im Schnitt 3,15 Neuriten bilden, liegt die Anzahl der Neuriten mit der Degs1-siRNA nur bei 2,75. Statistik: **P-Wert <0,001, Daten entsprechen MW±SEM, n=105 ctrl-siRNA/108 *Degs1*-siRNA; die statistische Überprüfung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigen t-test (*unpaired t-test*). **d)** Vergleich der Anzahl der Verzweigungspunkte des längsten Neuriten zwischen der ctrl-siRNA und *Degs1*-siRNA**.** In der Abbildung wird die Anzahl der Verzweigungspunkte des längsten Neuriten verglichen. P = 0,2159, nicht signifikant. Daten entsprechen MW±SEM, n=105 ctrl-siRNA/108 *Degs1*-siRNA, statistische Überprüfung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigen t-test (unpaired t-test).

5. Diskussion

Leukodystrophien (LDs) sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, welche sich mit unterschiedlichen Symptomen und Pathomechanismen manifestieren können. Die in Verbindung mit DEGS1 stehende Leukodystrophie ist eine hypomyelinisierende LD, eine Unterform mit gestörter Ausbildung der Myelinscheiden. Um die Pathogenese dieser Erkrankung zu verstehen, benötigt es gute *in-vitro* und *in-vivo* Modelle. Die systemischen Konsequenzen eines Degs1-Funktionsverlustes konnten bereits in multiplen Tierversuchen (Snider, Snider, Obeid, Luberto, & Hannun, 2018) (Michel & van Echten-Deckert, 1997) untersucht werden, aber geeignete humane *in vitro*-Modelle fehlen bisher. Hier sind Zellkulturmodelle eine schnelle erste Möglichkeit, die Auswirkungen genetischer Varianten *in vitro* zu simulieren und deshalb eine relevante und wichtige experimentelle Strategie vor der Etablierung von Tiermodellen. Primäre Patienten-Fibroblasten aus Hautbiopsien werden häufig für initiale mechanistische Studien genutzt, sind aber gerade für die Untersuchung neuronaler Pathologien meistens ungeeignet, da für neuronale Funktion relevante Gene oft nicht exprimiert sind und z.B. neuronale Schaltkreise nicht existieren.

5.1 Experimentelle Ansätze zur Modellierung genetischer Erkrankungen in vitro

Seit der Entdeckung der RNA-Interferenz ist ein *Knockdown* mittels antisense-RNA ein verbreitetes Prinzip für die Ausschaltung von Genen, wobei die siRNA im Rahmen der RNAi die älteste Methode ist (Cerutti & Casas-Mollano, 2006). Sowohl siRNA als auch shRNA finden inzwischen breite Anwendung in der translationalen Forschung. Durch die Möglichkeit, gezielt die Aktivität von Genen mittels siRNA zu beeinflussen, werden vermehrt auch therapeutische Ansätze untersucht (Ngamcherdtrakul, 2019), und im Fall von Nusinersen (Spinraza®/Zolgensma®) als Gentherapie bei Spinaler Muskelatrophie (SMA) bereits erfolgreich eingesetzt. Als weiteres erfolgreiches Beispiel einer siRNA-basierten *Knockdown*-Therapie sind die Experimente von Özdas et al. zu nennen. Das Team untersuchte die funktionelle Rolle von *XPO5*, einem Gen, welches für ein Protein kodiert, das Prä-microRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert, und bei veränderter Expression kanzerogen wirken kann,

indem die Genexpression mit *XPO5-small interfering* RNA (siRNA) im *in-vitro*-Modell ausgeschaltet wurde. Durch den siRNA-*Knockdown* konnte so bewiesen werden, dass *XPO5* in den Tumoren auf mRNA- und Protein-Ebene herunterreguliert ist und somit die Tumorprogression hemmt (Özdas, 2022). Auch shRNAs wurden bereits erfolgreich in *Knockdown*-Modellen eingesetzt. Anders als bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten klassischen plasmidbasierten Experimenten besteht außerdem die Möglichkeit, shRNA mittels eines viralen Vektors in die Zelle zu bringen. Erfolgreich durchgeführt wurde dies beispielsweise von Basit et al.. Solche *Knockdown*-Methoden ermöglichen einen direkten Vergleich zwischen den Zellen mit regulärer und mit siRNA-abhängig regulierter Genexpression (Basit, 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl eine gegen murines *Degs1* gerichtete siRNA eingesetzt als auch shRNA-Expressionsplasmide kloniert, um sowohl schnelle und kurzlebige als auch mittelfristige (mehrere Tage andauernde) Effekte eines Degs1-Funktionsverlustes auf die Zelle untersuchen zu können (Rao, Vorhies, Senzer, & Nemunaitis, 2009). Diese genetischen *Tools* sind in der Forschung gut etabliert und dadurch eine geeignete Methode des Gen-*Knockdowns*. Auch in unserem Falle kann man durch die Validierung mittels Proteinexpression von einem sicher nachgewiesenen *Knockdown* ausgehen. Durch Verwendung eines DEGS1-wt-EGFP Fusionsproteins gelang ein Nachweis von DEGS1 auf Proteinebene über anti-GFP Antikörper (Abb.11). Das erfolgreiche humane DEGS1-shRNA *knockdown-Tool* kann nun z.B. in humanen Stammzellen bzw. davon abgeleiteten Neuronen und Gliazellen zum Einsatz gebracht werden. Außerdem wäre eine weitere Möglichkeit, die klonierten shRNA-Vektoren gegen murines Degs1 über die Expression eines Maus-Degs1-EGFP Fusionsproteins via Western Blot zu validieren. So werden zukünftig auch weiterführende Experimente in Mauszellen möglich. Dies war aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Fluorophor-gekoppelte siRNAs sind recht kostenintensiv, wenn sie u.a. für quantitative Assays wie z.B. Western Blot im 6-well-Fomat eingesetzt werden müssen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein mengenreduziertes siRNA-Protokoll in N2a-Zellen etabliert. Dieses erwies sich in einem ersten Versuch (Abb.12) mit vergleichbaren Ergebnissen zum Originalprotokoll als vielversprechend, sodass zukünftige Experimente deutlich kostengünstiger und ressourcenschonender durchgeführt werden können. Für eine fundierte Aussage

muss das Protokoll mit reduzierter siRNA-Menge jedoch noch repliziert und die Knockdown-Effizienzen mittels qPCR-Expressionsanalyse quantifiziert werden. Dies war aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

5.2. Gestörte neuronale Entwicklung nach *Degs1*-siRNA *Knockdown*

Das Wachstum von Neuriten ist eine Voraussetzung für den Aufbau eines funktionellen Netzwerks von Neuronen während der Entwicklung (Read & Gorman, 2009). Es ist auch entscheidend für die neuronale Plastizität (Hrvoj-Mihic, Bienvenu, Stefanacci, Muotri, & Semendeferi, 2013) sowie für neuronale Regenerationsprozesse (Schiwy, Brazda, & Müller, 2009). Durch die vorherige Validierung der *Degs1*-siRNA in N2a-Zellen konnte ein effizienter *Knockdown* von *Degs1* nachgewiesen werden. Das Ziel ist nun, die Auswirkungen eines Degs1-Funktionsverlustes via siRNA zu induzieren und dessen Effekte auf die neuronale Morphologie der kortikalen Mäuseneuronen zu analysieren. Neuronen sind stark polarisierte Zellen. Nach der Differenzierung verändern sie ihre Form und bilden zwei verschiedene Kompartimente: meistens ein Axon und mehrere, z.T. stark verzweigte Dendriten. Diese beiden Kompartimente erhalten spezifische Eigenschaften, die es Neuronen ermöglichen, elektrische Signale zu übertragen (Arimura & Kaibuchi, 2007). Dieser Prozess der neuronalen Polarisierung wird durch das Zytoskelett gesteuert. Das erste und entscheidende Ereignis während der neuronalen Polarisierung ist die Ausbildung des Axons ausgehend von einem der Neuriten durch die Dynamik und Organisation des Zytoskeletts. Die anderen Neuriten werden zu Dendriten (Stiess & Bradke, 2011). In der Arbeit wurden folgende Parameter untersucht: die Anzahl der Neuriten-Verzweigungen, die Länge des längsten Neuriten, sowie die Verzweigungen des längsten Neuriten. Diese Parameter geben Hinweise auf die Vitalität, sowie die neuronale Komplexität. Dass sowohl der längste Neurit, als auch die Neuriten-Verzweigungen in den *Degs1*-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen kürzer bzw. reduziert sind deutet daraufhin, dass Degs1 eine bedeutende Rolle in der frühen neuronalen Entwicklung für die Ausbildung einer korrekten Zellpolarität spielt. *Degs1*-defiziente Neuronen konnten *in vitro* auch weniger Verbindungen zu anderen neuronalen Zellen bilden, sodass man hier von einer reduzierten neuronalen Komplexität und Konnektivität mit möglichen Folgen für die Signalweiterleitung ausgehen könnte. Weitergehende Untersuchungen bezüglich der Verbindungen zu anderen Neuronen können

mittels Färbung von Synapsenmarkern in der Immunhistochemie erfolgen. Die bereits beschriebenen Patienten (Dolgin, et al., 2019) (Pant, et al., 2019) (Blackburn, et al., 2019) mit HLD18-Leukodystrophie weisen einen komplexen neurologischen Phänotyp auf. Es gilt jedoch zu unterscheiden, welche Varianten zu einem kompletten *Knockout* des *DEGS1*-Gens und welche lediglich zu einem *Knockdown* führen. Dei Cas et al. entwickelten ein Verfahren, um die Desaturase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener pathogener *DEGS1*-Varianten zu untersuchen. Die *in-vitro*-Desaturase-Aktivität ging bei vielen Varianten verloren, mit Ausnahme von L175Q, A280V und N255S, die eine katalytische Restaktivität von etwa 19 bis 25% des WT-Enzyms beibehielten, sowie die Varianten N113D, H132R und N189D mit einer katalytischen Aktivität von etwa 50-60% des Wildtyp-Enzyms (Dei Cas, et al., 2024). Die Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass sowohl ein *Knockout*, als auch ein *Knockdown* von *DEGS1* hohe Relevanz für den Krankheitsmechanismus haben. Die neurologischen Auffälligkeiten werden durch eine pathogene Variante im *DEGS1*-Gen verursacht, dies belegt auch diese Arbeit. Durch die Experimente ist zudem davon auszugehen, dass die Konnektivität und Integration der verschiedenen Neuronen durch die A280V-Variante im *DEGS1*-Gen so beeinflusst ist, dass eine normale neurologische Entwicklung gestört ist. Generell ist bei einem kompletten *DEGS1*-KO ein früherer Beginn der Symptome, sowie ein früheres Versterben zu erwarten als bei einer erhaltenen Restaktivität des DEGS1-Enzyms. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der klinische Symptomkomplex sind daher miteinander vereinbar. Weiterhin ist zu diskutieren, ob potentiell neurotoxische Metabolite entstehen. Dolgin et al. (2019) beschreiben, dass in Lipidomics-Analysen ein erhöhter Spiegel von Dihydroceramiden, Dihydrosphingosin, Dihydrosphingosin-1-phosphat und Dihydrosphingomyelinen bei reduzierten Spiegeln von Ceramid, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat und Monohexosylceramiden gefunden wurde, wie es bei einer Fehlfunktion der C4-Dihydroceramid-Desaturase (DEGS1) zu erwarten ist. Van Echten-Deckert et al (1997) untersuchten bereits die Auswirkungen verschiedener Dihydroceramid-Analoga auf die neuronale Entwicklung. Sie beschreiben, dass manche dhCer-Analoga das axonale Wachstum hemmen, während andere Analoga quasi keinen Einfluss auf die axonale Entwicklung zeigen. Dies lässt die Hypothese zu, dass dhCer potentiell neurotoxisch ist und somit auch zu einer gestörten neuronalen Entwicklung führen kann (Michel & van Echten-Deckert, 1997).

Interessant wäre die Untersuchung des Cer/dhCer-Verhältnis in Neuronen mit einer veränderten *DEGS1*-Expression. Auch hier könnten sich potentielle Therapiemöglichkeiten ergeben. Der in Degs1-KO HAP-Zellen identifizierte atypische SL-Metabolit 1-Deoxysphinganin könnte ebenso analog des bei HSAN1 (Hereditary sensory neuropathy Type 1) entstehenden Sphingolipid-Metaboliten (1-Deoxymethylsphinganin), welcher durch Missense-Mutationen im *SPTLC1*-Gen (Serin Palmitoyltransferase Long Chain Base Unit 1) entsteht, neurotoxisch sein (Penno , et al., 2010). Hier zeigt sich, dass die konzentrationsabhängige Akkumulation von den zwei neurotoxischen SL-Metaboliten zu einer gestörten Neuritenbildung, sowie einer Verkürzung der Neuriten führt. Grund dieser Metabolit-Akkumulation sind pathogene Varianten in den Genen SPTLC1 und SPTLC2, welche für eine Untereinheit des Enzyms SPT kodieren (Wilson, et al., 2018). Auch in der *DEGS-1*-assoziierten Leukodystrophie könnte der nachgewiesene atypische SL-Metabolit der Auslöser der neurologischen Veränderungen sein. DEGS1 wurde bereits in humanen Neuroblastom-Zellen untersucht. Kraveka et al. stellten in ihren Experimenten fest, dass der Verlust von *DEGS1* zu einem Zellzyklusarrest in Neuroblastom-Zellen führt. Sie transfizierten die Neuroblastom-Zellen mit einer *Degs1*-siRNA und einer *scrambled* siRNA und verglichen anschließend die Zellzyklusphasen miteinander. Dort zeigte sich, dass die Zellen, welche mit einer *Degs1*-siRNA transfiziert wurden, gehäuft in der G0/G1 Phase arretiert waren (Kraveka, et al., 2007). Diese Erkenntnisse belegen ebenfalls, dass Degs1 eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Neuroblastom- Zellen spielt.

Primäre Neuronenkulturen bieten in der Untersuchung Vorteile gegenüber Zellkulturen. Für die Untersuchung neuronaler Pathologien bieten sich Neuronenkulturen an, da sie neuronale Gene exprimieren und auch in der Lage sind, neuronale Schaltkreise auszubilden. Mechanistische Untersuchungen werden oft vorerst an Patienten-Fibroblasten getätigt, sind aber für neuronale Untersuchungen ungeeignet. In primären Neuronen bestätigt sich, dass der *Knockdown* von *Degs1* zu einer gestörten neuronalen Entwicklung führt. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Ausbildung der neuronalen Morphologie in embryonalen cortikalen Neuronen *in vitr*o nach *Degs1*-KD gestört war. Die Zellzyklusphasen wurden in den primären Neuronenkulturen zwar nicht direkt untersucht, es zeigten sich jedoch während der Kultivierung *in vitro* keine

Unterschiede zwischen *Degs1*- und *scrambled*-siRNA behandelten Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens. Dennoch ist anzunehmen, dass Degs1 nicht nur für eine normale Zellentwicklung, sondern gerade auch für die korrekte Entwicklung von Nervenzellen von Bedeutung ist.

Zu berücksichtigen ist, dass sich diese Ergebnisse bisher nur in Mausneuronen zeigten. Ein etabliertes humanes *in-vitro*-Modell ist jedoch bei dieser seltenen Erkrankung unverzichtbar, da es die Untersuchungs- und Therapiemöglichkeiten für die Erkrankungen am ehesten abbilden kann. Daher wäre es wichtig, zukünftig zu untersuchen, ob sich die Ergebnisse in einem menschlichen Zellmodell wie z.B. in von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) abgeleiteten Neuronen reproduzieren lassen.

5.3. Offene Fragen zur neuronalen Pathologie/Pathophysiologie bei Degs1-Dysfunktion

Im gesunden Gehirn ist die aktivitätsregulierte Myelinplastizität ein wichtiger Prozess, welcher die kognitive Hirnfunktion unterstützt. Unter Myelinplastizität versteht man eine Veränderung der Myelinstruktur als Reaktion auf neuronale Aktivität. Es kann beispielsweise zu einer *de-novo*-Myelinisierung, einem Umbau des Myelins, sowie zu einer Zu- oder Abnahme der Myelinisierung kommen (Knowles, 2022). Bei einigen Krankheiten ist die neurologische Funktion durch den Verlust dieses Prozesses eingeschränkt. Vor diesem Hintergrund wären Myelinisierungsassays mit Neuronen und Gliazellen (Oligodendrozyten bzw. Schwannzellen), die pathogene *DEGS1*-Varianten tragen, von Relevanz. Damit würde sich die Möglichkeit bieten, DEGS1-assoziierte Pathologien der Myelinisierung zu identifizieren. Eine Differenzierung zwischen einer Myelinisierungsstörung oder einem Abbau des Myelins ist relevant für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten. Ein weiteres anwendbares Modell wären hier z.B. hiPSC-abgeleitete Myelinoide (myelinisierende Organoide), welche die Möglichkeit bieten, die Myelinisierung von der Oligodendrogenese bis zur Bildung von Myelin und der Organisation der myelinisierten Axone zu untersuchen (James, et al., 2021). Dieses Modell würde eine mögliche Plattform bieten, um die Myelinisierungsstörung bei der DEGS1-assoziierten Leukodystrophie (HLD18) zu erforschen. Ein besseres Verständnis des Myelinisierungsprozesses bietet mögliche Erklärungen dafür, warum bei fast

allen Patienten mit Hypomyelinisierung nach einer langen Phase der Stabilität eine langsam fortschreitende klinische Verschlechterung zu beobachten ist (Wolf, Van der Knaap, & French-Constant, 2020).

Ein besseres Verständnis von Hypomyelinisierungsstörungen wie der DEGS1-assoziierten Leukodystrophie (HLD18) kann daher die Grundlage für künftige Behandlungsstrategien bilden, die nicht nur Myelinverluste beheben, sondern auch die Gesundheit der Axone erhalten sollen.

6. Zusammenfassung

Sphingolipide sind wichtige strukturelle Bestandteile von Zellmembranen und von großer Bedeutung für dynamische Prozesse wie z.B. Zellmigration. Ein essentieller Baustein der Sphingolipide sind die Ceramide, welche mithilfe von verschiedenen Enzymen in eine Vielzahl an Konjugaten metabolisiert werden. Durch die Sphingomyelinase wird aus Ceramid Sphingomyelin synthetisiert, ein essentieller Bestandteil der Myelinscheiden peripherer und zentraler Axone. Die Delta-4-Desaturase 1 (DEGS1) ist ein Enzym im *de-novo*-Syntheseweg von Ceramiden. Menschen mit pathogenen Varianten im *DEGS1*-Gen weisen komplexe neurologische Dysfunktionen auf, die sich als Leukodystrophie darstellen. Bei der DEGS1-assoziierten hypomyelinisierenden Leukodystrophie besteht primär ein Mangel an Myelinablagerungen im ZNS, der sich mit unterschiedlicher Symptomatik wie Bewegungsstörungen, kognitiven Störungen und psychiatrischen Auffälligkeiten darstellt. Der exakte Pathomechanismus und die neuronale Pathologie ist bisher nicht im Detail erforscht. Um den Einfluss einer *DEGS1*-Defizienz auf die neuronale Morphologie *in vitro* genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein *DEGS1*-Knockdown (KD) mittels siRNA in primären kortikalen Mausneuronen untersucht. Die Hypothese ist, dass ein Funktionsverlust des Degs1-Genproduktes zu einer eingeschränkten neuronalen Differenzierung führt. Mittels immunhistochemischer Methoden wurde die Bildung von neuronalen Fortsätzen untersucht. Die Neuronen, in denen *Degs1* herunterreguliert wurde, zeigten signifikant kürzere Neuriten sowie eine geringere Komplexität des Dendritenbaumes im Vergleich zu wildtypischen Neuronen. Dass sowohl der längste Neurit verkürzt, als auch die Verzweigungen in den *Degs1*-defizienten Neuronen geringer sind als in den Kontrollzellen deutet daraufhin, dass Degs1 bereits eine entscheidende Rolle in der frühen neuronalen Entwicklung spielt. Des Weiteren war es Ziel dieser Arbeit *small hairpin*-RNA (shRNA) Konstrukte zu klonieren und zu validieren, um die Auswirkungen eines *DEGS1-Knockdowns* zu späteren Zeitpunkten der neuronalen Entwicklung *in vitro* zu untersuchen. Dies gelang erfolgreich mit einer klonierten shRNA, die 48h nach Transfektion in einer um 60 % geringeren *DEGS1*-Proteinexpression im Vergleich zu transfizierten Kontrollzellen (N2a) resultierte. Zusammenfassend etabliert die vorliegende Arbeit erfolgreich zwei Methoden des *DEGS1-Knockdowns* und zeigt, dass Degs1 eine bedeutende Funktion in den frühen Phasen der neuronalen Entwicklung übernimmt.

Literaturverzeichnis

Agnieszka Ługowska, J. P. (2011). Population carrier rates of pathogenic ARSA gene mutations: is metachromatic leukodystrophy underdiagnosed? *PLoS One*.

Basit, A. (2016). shRNA-Induced Gene Knockdown In Vivo to Investigate Neutrophil Function. *Chemotaxis*.

Bikman, B. T., & Summers, S. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J Clin Invest*.

Blackburn, N. B., Michael, L., Meikle, P., Peralta, J., Mosior, M., McAhren, S., . . . Curran, J. (2019). Rare DEGS1 variant significantly alters de novo ceramide synthesis pathway. *J Lipid Res*.

Branka Hrvoj-Mihic, T. B. (2013). Evolution, development, and plasticity of the human brain: from molecules to bones. *Front Human Neuroscience*.

Cadena, D. L. (1997). The product of the MLD gene is a member of the membrane fatty acid desaturase family: overexpression of MLD inhibits EGF receptor biosynthesis. *Biochemistry*.

Canals, D., Salamone, S., & Hannun, Y. A. (2018). Visualizing bioactive ceramides. *Chem Phys Lipids*.

Choi J., R. H.-S. (2005). Oxidative Modifications and Aggregation of Cu,Zn-Superoxide Dismutase Associated with Alzheimer and Parkinson Diseases. *J Biol Chem*.

Clark, U. K. (2021). An iPSC model of hereditary sensory neuropathy-1 reveals L-serine-responsive deficits in neuronal ganglioside composition and axoglial interactions. *Cell Rep Med*.

Danielle E Read, A. M. (2009). Involvement of Akt in neurite outgrowth . *Cell Mol Life Science*.

Devlin, C. M. (2011). Dihydroceramide-based response to hypoxia. *J Biol Chem*.

Dolgin, V. (2019). DEGS1 variant causes neurological disorder. *Eur J Hum Genet*.

Folch, J. (1958). Studies of the chemical composition of the nervous system. *Exp Cell Ress*.

G Tang, X. D.-J.-C. (2015). A natural diarylheptanoid promotes neuronal differentiation via activating ERK and PI3K-Akt dependent pathways. *Neuroscience*.

Giussani, P. (2021). The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. *J Neurochem*.

Gordon, H. B. (2014). The leukodystrophies . *Semin Neurol*.

Hamza Bajwa, W. A. (2023). *Niemann-Pick Disease.* Treasure Island: StatPearls [Internet].

Hannun, Y. A. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*.

Hannun, Y., & Obeid, L. (2011). Many Ceramides. *J Biol Chem*.

Hernandez-Tiedra, S. (2016). Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy*.

Holland, W. B.-P. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*.

Holland, W. L. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*.

Jain, M., & Jesus, O. D. (2023). Krabbe Disease. *StatPearls [Internet]*.

James, B. T.-C. (2021). iPSC-derived myelinoids to study myelin biology of humans. *Developmental Cell*.

José A Martina, N. R. (2020). SnapShot: Lysosomal Storage Diseases. *Cell*.

Jung, W. H. (2017). Lipophagy prevents activity-dependent neurodegeneration due to dihydroceramide accumulation in vivo. *EMBO Rep*.

Karsai, G. (2019). DEGS1-associated aberrant sphingolipid metabolism impairs nervous system function in humans. *J Clin Invest*.

Kim, S. (2008). Ceramide accelerates ultraviolet-induced MMP-1 expression through JAK1/STAT-1 pathway in cultured human dermal fibroblasts. *J Lipid Res*.

Knowles, A. B. (2022). Adaptive and maladaptive myelination in health and disease. *Nature Reviews Neurology*.

L Bezman, H. W. (1998). Incidence of X-linked adrenoleukodystrophy and the relative frequency of its phenotypes . *Am J Med Genet*.

Lachkar, F. P. (2021). Dihydroceramides: their emerging physiological roles and functions in cancer and metabolic diseases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

Lesley A Stellitano, A. M. (2016). *Leukodystrophies and genetic leukoencephalopathies in childhood: a national epidemiological study.*

Mandik, F., & Vos, M. (2021). Neurodegenerative Disorders: Spotlight on Sphingolipids. *Int. J Mol Sci*.

Marjo S. van der Knaap, M. B. (2018). Leukodystrophies — much more than just diseases of myelin. *Nature Reviews Neurology*.

Martín, D., Ruano, D., Yúfera, A., & Daza, P. (2024). Electrical pulse stimulation parameters modulate N2a neuronal differentiation . *Cell Death Discov*.

Michel, C. (1997). Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*.

Mwon Ahn, S. R. (2010). Constitutive Long-Term Expression of shRNA in Liver Induces Cellular Stress. *Molecular Therapy*.

Ngamcherdtrakul, W. (2019). siRNA therapeutics for breast cancer: recent efforts in targeting metastasis, drug resistance, and immune evasion. *Trans Res*.

Nicole I. Wolf, C. f.-C. (2020). Hypomyelinating leukodystrophies — unravelling myelin biology. *Nature Reviews Neurology*.

Nora Schiwy, N. B. (2009). Enhanced regenerative axon growth of multiple fibre populations in traumatic spinal cord injury following scar-suppressing treatment. *Eur J Neurosci*.

Olsen, A. S. (2017). Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol*.

Özdas, S. (2022). Effects of Knockdown of XPO5 by siRNA on the Biological Behavior of Head and Neck Cancer Cells. *Laryngoscope*.

Pant, D. C. (2019). Loss of the sphingolipid desaturase DEGS1 causes hypomyelinating leukodystrophy. *J Clin Invest*.

Parikh, S. (2015). A clinical approach to the diagnosis of patients with leukodystrophies and genetic leukoencephelopathies. *Mol Genet Metab*.

Pavlov P.F., P. C. (2009). Mitochondrial accumulation of APP and Aβ: Significance for Alzheimer disease pathogenesis. *J Cell. Mol. Med.* .

Perry, D., & Hannun, Y. (1998). The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta*.

Philipp Ternes, S. F. (2002). Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family . *J Biol Chem*.

Planas-Serra, N. L.-P.-A.-C., Fatemi, A., Ferrer, I., Portero-Otin, M., Area-Gómez, E., & Pujol, A. (2023). Sphingolipid desaturase DEGS1 is essential for mitochondria-associated membrane integrity. *J Clin Invest*.

Pralhada Rao, R. (2013). Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J Lipids*.

Rao, D. D. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*.

Rosa Rademakers, M. B.-O.-H. (2011). Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nature genetics*.

Schwarz, D. S. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*.

Siddique, M. M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V., & Summers, S. (2015). Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *J Biol Chem*.

Snider, J. (2018). Probing de novo sphingolipid metabolism in mammalian cells utilizing mass spectrometry. *J Lipid Res*.

Tzou, F. Y. (2021). Dihydroceramide desaturase regulates the compartmentalization of Rac1 for neuronal oxidative stress. *Cell Rep*.

van Echten-Deckert, A. G. (1998). 1-Methylthiodihydroceramide, a Novel Analog of Dihydroceramide, Stimulates Sphinganine Degradation Resulting in Decreased de Novo Sphingolipid Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*.

Wu, J.-G. J.-S.-H.-W.-A.-S.-C.-C.-Y. (2021). Dihydroceramide desaturase promotes the formation of intraluminal vesicles and inhibits autophagy to increase exosome production. *iScience*.

Zimmer, J. R. (2011). Bidirectional ephrinB3/EphA4 signaling mediates the segregation of medial ganglionic eminence- and preoptic area-derived interneurons in the deep and superficial migratory stream. *J Neurosci*.

Zöller, I. M. (2008). Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *J Neurosci*.

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um meinen aufrichtigen Dank an alle Personen auszudrücken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Kurth für die Möglichkeit dieser Dissertation danken. Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Natja Haag. Ihre fachliche Expertise, ihre unermüdliche Anleitung und ihre Geduld haben meine Forschung entscheidend geprägt und mir geholfen, mich in diesem komplexen Feld weiterzuentwickeln. Ich bin zutiefst dankbar für Ihre wertvollen Ratschläge, Ihr offenes Ohr und Ihre Unterstützung während der gesamten Forschungsarbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen am Zentrum für Humangenetik und Genommedizin. Der Austausch und die Ratschläge bei verschiedenen Problemen haben mir geholfen, neue Perspektiven zu gewinnen und meine Arbeit zu verbessern. Ich bin dankbar für die inspirierende Atmosphäre und das harmonische Arbeitsumfeld, in dem ich arbeiten durfte. Mein besonderer Dank gilt hier auch nochmals Sebastian Gießelmann und Lars Buschmann, die mir in meiner Zeit im Labor immer für Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Zimmer-Bensch für die experimentelle Unterstützung zur Durchführung der Versuche an primären Mausneuronen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Eure ständige Unterstützung hat mir die Kraft gegeben, meine Ziele zu verfolgen und Schwierigkeiten zu überwinden. Ihr habt meine Höhen und Tiefen geteilt und mir geholfen, den Fokus zu bewahren. Eure Ermutigungen und euer Verständnis in Zeiten intensiver Arbeit haben mir viel bedeutet und mich motiviert, weiterzumachen.

Ohne Hilfe und Unterstützung hätte ich diese Doktorarbeit nicht erfolgreich abschließen können. Nochmals vielen Dank an alle, die einen Beitrag dazu geleistet haben, dass meine Forschungsarbeit ein Erfolg wurde.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

bei meiner praktischen Betreuerin, ***Dr. rer. nat. Natja Haag, Institut für Humangenetik und Genommedizin***, des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Gina Marie Wünsch** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Untersuchung der funktionellen Konsequenzen eines siRNA-vermittelten Degs1-Knockdowns in primären kortikalen Neuronen in vitro**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe: siehe Tabelle

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Gina Marie Wünsch	Natja Haag	Lars Buschmann	Geraldine Zimmer-Bensch	Sebastian Gießelmann	Ingo Kurth	Summe (%)
Studienüberwachung		80				20	100
Studiendesign/ Konzeption	20	70				10	100
Datenerhebung	90		10				100
Datenauswertung	80	10	10				100
Durchführung der Experimente	90			10			100
Bereitstellung primärer Neuronen				100			100
Klonierungen	80		15		5		100
Biochemische Methoden (WB)	90				10		100
Statistische Auswertung	90	5	5				100
Bereitstellung von Materialien		70		15		15	100
Interpretation der Datenauswertung	75	20	5				100
Verfassen der Arbeit	100						100

_____

Unterschrift der Doktorandin – Gina Marie Wünsch

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Gina Marie Wünsch

_____

Unterschrift des Doktorvaters – Prof. Dr. med. Ingo Kurth