

Entwicklung einer Gentherapie für die Behandlung der retinalen Dystrophie bei der CLN1 Erkrankung, einer fatalen lysosomalen Speichererkrankung des Kindesalters.

Christoph Spartalis und Udo Bartsch

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zusammenfassung

Mit dem Begriff „Neuronale Ceroid-Lipofuszinose“ (NCL) wird eine Gruppe von seltenen neurodegenerativen lysosomalen Speichererkrankungen zusammengefasst, die vornehmlich im Kindesalter auftreten [15, 20, 23]. Obwohl es sich um seltene Erkrankungen handelt, ist die NCL die häufigste neurodegenerative Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Verschiedene Arbeitsgruppen im UKE beschäftigen sich daher seit Jahren intensiv und interdisziplinär mit diesen fatalen neurodegenerativen Erkrankungen. Die verschiedenen NCL Formen werden entsprechend des betroffenen Gens in CLN1-CLN8 und CLN10-CLN14 klassifiziert [20, 23]. Alle NCL Erkrankungen sind durch eine intrazelluläre Akkumulation von Speicherematerial als Folge einer lysosomalen Dysfunktion, eine progrediente Neurodegeneration und einen vorzeitigen Tod der betroffenen Patienten charakterisiert. Eine Erblindung als Folge einer retinalen Degeneration ist ein weiteres charakteristisches Merkmal bei fast allen NCL Patienten [20, 23].

Bei NCL Formen, die durch Dysfunktionen von lysosomalen Enzymen verursacht werden, stellt das Einschleusen von funktionellen Varianten der dysfunktionalen Enzyme (Enzymersatztherapie) eine vielversprechende Therapieoption dar [2, 20, 23]. Zu diesen Erkrankungen gehört die CLN1 Erkrankung, die durch Dysfunktionen des lysosomalen Enzyms Palmitoyl-Protein Thioesterase-1 (PPT1) verursacht wird. Die Effektivität von Enzymersatzstrategien beruht darauf, dass die Mannose-6-Phosphat (M6P) modifizierten funktionalen lysosomalen Enzyme von den erkrankten Zellen über eine M6P Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und anschließend zu den Lysosomen transportiert werden, wo sie die lysosomale Dysfunktion korrigieren [9, 23, 30, 32]. Bei lysosomalen Speichererkrankungen mit überwiegend neurologischen Symptomen sind systemische Applikationen von funktionellen Enzymen in das erkrankte Nervengewebe aufgrund der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Retina-Schranke nicht möglich. Vielmehr müssen die Enzyme lokal appliziert werden. Dieses Ziel kann durch (i) wiederholte Injektionen rekombinant hergestellter Enzyme („klassische Enzymersatztherapie“), (ii) einen Virus-vermittelten Gentransfer oder (iii) Transplantationen von Zellen mit einer Überexpression des jeweiligen Enzyms erreicht werden [2, 20, 23]. Tatsächlich konnte in präklinischen Studien an Tiermodellen für die CLN1, die CLN2 oder die CLN10 Erkrankung beeindruckende Therapieerfolge mit Enzymersatzstrategien am Gehirn erzielt werden [9, 23, 32]. Bemerkenswerterweise konnte außerdem eine kürzlich publizierte klinische Studie unter maßgeblicher Beteiligung des UKE zeigen, dass wiederholte intracerebroventrikuläre Injektionen von rekombinant hergestelltem TPP1 das Fortschreiten der Erkrankung bei CLN2 Patienten signifikant verzögern [37]. Allerdings konnte durch die Enzymersatzstrategien am Gehirn der verschiedenen Tiermodelle oder der CLN2 Patienten die fortschreitende Degeneration der Netzhaut und die damit verbundene Erblindung nicht verzögert werden [38, 44, 45]. Angesichts der Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten am Gehirn, die zwar das Fortschreiten der neurologischen Symptome bei NCL Patienten deutlich verzögern - eine Erblindung der Patienten allerdings nicht verhindern - ist es nun dringend erforderlich, effektive Therapiemöglichkeiten spezifisch für die Netzhaut zu entwickeln.

Stand der Forschung

Die CLN1 Erkrankung wird durch Mutationen in einem Gen verursacht, das für das lysosomale Enzym Palmitoyl-Protein Thioesterase-1 (PPT1) kodiert [41]. Klinisch ist die CLN1 Erkrankung durch eine früh einsetzende und schnell fortschreitende cerebrale Atrophie und einem Verlust der kognitiven und motorischen Fähigkeiten charakterisiert [31, 34, 36]. Außerdem sind CLN1 Patienten von einem früh einsetzenden Verlust der Sehfähigkeit als Folge einer schnell fortschreitenden retinalen Degeneration betroffen [5, 34, 35, 42]. Histologische Untersuchungen von *post mortem* Netzhäuten konnten einen massiven Verlust von Photorezeptoren, von retinalen Interneuronen und von retinalen Ganglienzellen nachweisen [43]. Pathologische Veränderungen der Morphologie und Funktion der Netzhäute wurden auch bei Patienten mit Mutationen im *CLN1* Gen beschrieben, die einen späteren und milderen Krankheitsverlauf verursachen („late-infantile disease-onset“ oder „adult disease-onset“), ein Hinweis darauf, dass die Netzhaut besonders empfindlich auf lysosomale Dysfunktionen reagiert [21, 27, 28].

Für die CLN1 Erkrankung existieren mehrere transgene Mausmodelle [6, 14, 17, 29]. Diese Mausmutanten weisen einen Phänotyp mit zahlreichen Parallelitäten zum klinischen Bild von CLN1 Patienten auf. So wurde für diese Tiere eine Akkumulation von Speichermaterial, eine schnell fortschreitende Neurodegeneration im Gehirn, ein Verlust der motorischen Fähigkeiten und ein vorzeitiger Tod beschrieben [6, 14, 17, 29]. Analog zu den Patienten kommt es auch in der Netzhaut der transgenen Mäuse zu einer fortschreitenden Degeneration verschiedener Nervenzelltypen und zu einem Verlust der retinalen Funktion in Elektroretinogramm-Ableitungen [1, 6, 11, 13, 17, 24]. An den Gehirnen der CLN1 Mausmodelle wurde die Effektivität einer klassischen Enzymersatztherapie sowie von Zell- und Gentherapie-basierten Enzymersatzstrategien mit zum Teil beeindruckenden Ergebnissen untersucht. So konnte die Neurodegeneration im Gehirn deutlich verzögert, Defizite im Verhalten abgeschwächt, und die Lebenserwartung der Tiere verlängert werden [10, 12, 16, 25, 33, 39, 40]. Bisherige Therapieversuche an der Netzhaut der *Ppt1* ko Maus konnten nur eine moderate Verbesserung der retinalen Funktion in Elektroretinogramm-Ableitungen, nicht aber eine Verzögerung der retinalen Degeneration zeigen [11].

Vorarbeiten

Unsere Arbeitsgruppe hat in den letzten Jahren die retinale Degeneration in Mausmodellen für die CLN6 Erkrankung [3], CLN7 Erkrankung [8, 18] und die CLN10 Erkrankung [4] mit biochemischen und morphologischen Methoden detailliert untersucht. Das Labor verfügt zudem über die *Ppt1* ko Maus und hat auch hier die retinale Dystrophie eingehend untersucht [1]. Auf Basis dieser Phänotypisierungen haben wir mit der Entwicklung und Evaluierung Retina-spezifischer Therapiestrategien begonnen, wie z.B. einem Stammzell-basierten neuroprotektiven Ansatz an der CLN6 Mutante [19] oder einer klassischen Enzymersatztherapie an der CLN10 Mutante [26].

Der retinale Phänotyp eines Mausmodells für die CLN1 Erkrankung

Die retinale Dystrophie in dem für das beantragte Projekt relevanten Mausmodell für die CLN1 Erkrankung (*Ppt1* ko Maus) wurde uns detailliert untersucht [1]. Zu den wichtigen Ergebnissen dieser Arbeit gehört u.a.: eine früh einsetzende Akkumulation von Speichermaterial, eine früh beginnende Dysregulation verschiedener lysosomaler Proteine (LAMP1, LAMP2, CTSD, CTSZ), eine extralysosomale Akkumulation des Autophagiemarkers SQSTM1/p62 und eine früh einsetzende reaktive Mikrogliose und Astrogliose. Diese pathologischen Veränderungen sind mit einer fortschreitenden

Degeneration der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren, Zapfen- und Stäbchen-Bipolarzellen und Ganglienzellen assoziiert [1]. Über Elektroretinogramm-Ableitungen konnten wir außerdem einen früh einsetzenden Verlust der retinalen Funktion nachweisen (unveröffentlichte Ergebnisse). Insgesamt weist die retinale Dystrophie dieser Mausmutante damit zahlreiche Ähnlichkeiten zu der retinalen Dystrophie bei CLN1 Patienten auf. Die *Ppt1* ko Maus stellt damit ein geeignetes Tiermodell dar, um Therapieansätze für die Behandlung der retinalen Dystrophie bei der CLN1 Erkrankung zu entwickeln.

Projektziele

Aufbauend auf den beschriebenen Vorarbeiten soll in dem vorgeschlagenen Projekt an der *Ppt1* ko Maus untersucht werden, ob über einen Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektorvermittelten Gentransfer einer funktionalen Variante des PPT1 Enzyms die Struktur und Funktion der Netzhaut bei einer CLN1 Erkrankung erhalten werden kann. Dazu werden die Therapieeffekte des Genterapieansatzes auf die biochemischen Veränderungen, die fortschreitende Degeneration verschiedener retinaler Zelltypen und die Funktion der dystrophen Netzhäute von *Ppt1* ko Mäusen analysiert.

Arbeitsprogramme

Adeno-assoziiertes Virus (AAV) Vektor vermittelter Gentransfer von PPT1 in die PPT1-defiziente Netzhaut

Für die Expression einer funktionalen Variante des PPT1 Enzyms in der *Ppt1* ko Retina wurde bereits ein „self-complementary“ (sc) AAV Vektor kloniert, in dem murines PPT1 unter Kontrolle des CMV Promoters exprimiert wird. Für die Genterapie-Experimente werden AAV Partikel vom Serotyp shH10 eingesetzt (scAAVshH10-CMV- PPT1). Publierte Daten [7, 22] und unsere noch unveröffentlichten Arbeiten an einem anderen Mausmodell für eine retinal Dystrophie zeigen, dass über intravitreale Injektionen dieses AAV Serotyps retinale Zellen effektiv infiziert werden können. Über den Einsatz eines „self-complementary“ AAVs werden Transgene zudem sehr schnell und effektiv exprimiert. Schließlich bietet der Einsatz eines shH10 Serotyps den Vorteil, dass ausschließlich retinale Gliazellen (Astrozyten und Müllerzellen) sowie retinale Pigmentepithelzellen (RPE Zellen), nicht aber retinale Nervenzellen genetisch modifiziert werden. In Vorversuchen wird zunächst überprüft, ob mit dem für PPT1 kodierenden AAV Vektor das Enzym in den dystrophen Netzhäuten erfolgreich exprimiert werden kann. Dazu werden die viralen Partikel am postnatalen Tag 7 (P7) intravitreal in *Ppt1* ko Mäuse injiziert, und die PPT1 Expression 14 Tage später über Immunhistochemie und Western Blot Analysen analysiert. Bei diesen Experimenten wird ein geeigneter AAV Titer für alle weiteren Experimente definiert. Eine Genehmigung zur Durchführung der Tierversuche liegt vor.

Analyse von Therapieeffekten: Akkumulation von Speichermaterial und Dysregulation von lysosomalen Proteinen

Die Degeneration retinaler Nervenzellen und der Verlust der retinalen Funktion verläuft in der *Ppt1* ko Maus relativ langsam. So ist ein deutlicher Verlust verschiedener Nervenzelltypen erst an P240 nachweisbar [1]. Um möglichst schnell zu überprüfen, ob mit dem eingesetzten AAV Titer therapeutisch relevante Effekte erzielt werden können, werden zunächst Vorversuche durchgeführt, in denen die Auswirkungen der Behandlung auf die Akkumulation von Speichermaterial, die Dysregulation verschiedener lysosomaler Proteine und die Ausprägung der reaktiven Mikroglie und Astroglie untersucht. Diese pathologischen Veränderungen sind in der *Ppt1* ko Netzhaut bereits an P45 nachweisbar [1]. Durch eine

vergleichende Analyse von behandelten Netzhäuten und kontralateralen Kontroll-Netzhäuten mittels Immunhistochemie und quantitativen Western Blot Analysen wird ein AAV Titer definiert, mit dem eine signifikante Korrektur der oben skizzierten pathologischen Veränderungen erreicht werden kann.

Mit den in den Vorversuchen definierten Bedingungen wird schließlich das therapeutische Potential der Gentherapie für die Behandlung der retinalen Dystrophie analysiert. Dazu werden behandelte (intravitreale Injektionen von scAAVshH10-CMV-PPT1) und kontralaterale Kontroll-Netzhäute (intravitreale Injektionen von AAVshH10-CMV-GFP) an zwei Altersstufen untersucht: an P112, wenn der morphologische und funktionelle Phänotyp nur moderat ausgeprägt ist und an P240, wenn der morphologische und funktionelle Phänotyp stark ausgeprägt ist. Zunächst wird an beiden Zeitpunkten über Immunhistochemie und quantitative Western Blot Analysen die Expression, Lokalisation und Menge des transgenen PPT1 Enzyms analysiert. Damit wird geprüft, ob ein Teil des von den Gliazellen exprimierten PPT1 sezerniert wird, dann von retinalen Nervenzellen aufgenommen wird, zu den Lysosomen transportiert wird und schließlich zu einer enzymatisch aktiven Form prozessiert wird. Dazu wird außerdem die enzymatische Aktivität von PPT1 in den behandelten Netzhäuten gemessen und mit der enzymatischen Aktivität in unbehandelten gesunden Wildtyp-Netzhäuten verglichen.

Analyse von Therapieeffekten: Erhalt der retinalen Morphologie und Funktion

Die Effekte der gentherapeutischen Behandlung auf die Morphologie und Funktion der dystrophen Netzhäute werden ebenfalls an P112 und P240 analysiert. Zunächst wird die Ausprägung der reaktiven Mikrogliose und Astrogliose in behandelten Augen und Kontroll-Augen über Immunhistochemie und quantitative Western Blot Analysen verglichen. Um die Überlebensraten von retinalen Nervenzellen zu analysieren, werden die behandelten Netzhäute und die Kontroll-Netzhäute mit Antikörpern gegen Zelltyp-spezifische Antigene angefärbt, und die Zelldichten von Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren, Zapfen- und Stäbchen-Bipolarzellen und retinalen Ganglienzellen über ein Computer-gestütztes Analyseprogramm bestimmt. Die retinale Funktion wird zu beiden Altersstadien über skotopische und photopische Elektroretinogramm-Ableitungen analysiert. Alle Experimente und Analysen werden parallel an unbehandelten Wildtypmäusen durchgeführt, um die Morphologie und Funktion der gentherapeutisch behandelten *Ppt1* ko Netzhäute nicht nur mit den kontralateralen Kontroll-Netzhäuten, sondern auch mit normalen gesunden Netzhäuten vergleichen zu können.

Insgesamt stehen uns sämtliche Materialien, Geräte und Methoden (z.B. *Ppt1* ko Mauslinie; scAAVshH10-CMV-PPT1 und scAAVshH10-CMV-GFP; Antikörper gegen Komponenten von Speichermaterial, verschiedene lysosomale Proteine und sämtliche retinale Zelltypen; hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop; quantitative Western Blot Analysen; Morphometrie; Ableitung von Elektroretinogrammen etc.) zur Verfügung, um das geplante Projekt durchzuführen. An einem anderen NCL Mausmodell konnten wir über einen ähnlichen Therapieansatz die Akkumulation von Speichermaterial, die Dysregulation verschiedener lysosomaler Proteine, die Neuroinflammation und die schnell fortschreitende retinale Degeneration in einem erheblichen Umfang verzögern (Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht). Aufgrund dieser Daten erwarten wir, dass das vorgeschlagene Projekt zielgerichtet und erfolgreich realisiert werden kann.

Beantragte Mittel

allgemeine Chemikalien	3.500,-€
primäre Antikörper (Immunhistochemie und Western Blots)	8.500,-€
sekundäre Antikörper (Immunhistochemie und Western Blots)	3.500,-€
Materialien für Biochemie	3.500,-€
Materialien für Molekularbiologie	4.000,-€
Materialien für Immunhistochemie	2.500,-€
Materialien für Zellkultur	3.500,-€
Produktion von scAAVshH10-PPT1 und scAAVshH10-GFP	2.000,-€
Enzymaktivitäts-assay	2.500,-€
Gerätekosten (Elektroden für Elektoretinogramme; Fluoreszenzmikroskop etc)	2.000,-€
Präparierbesteck (Mikroscheren, Pinzetten etc)	1.500,-€
Versuchstiere	7.500,-€
Reisekosten (Kongresse, Kooperationspartner)	3.500,-€
Publikationskosten	2.000,-€
gesamt	50.000,-€

Voraussichtliche Dauer

24 Monate

Literaturverzeichnis

- [1] Y. Atiskova, S. Bartsch, T. Danyukova, E. Becker, C. Hagel, S. Storch, U. Bartsch, Mice deficient in the lysosomal enzyme palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1) display a complex retinal phenotype, *Scientific reports*, 9 (2019) 14185.
- [2] S. Bartsch, J. Liu, M. Bassal, W. Jankowiak, M.S. Spitzer, U. Bartsch, [Experimental therapeutic approaches for the treatment of retinal dystrophy in neuronal ceroid lipofuscinosis], *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 118 (2021) 106-112.
- [3] U. Bartsch, G. Galliciotti, G.F. Jofre, W. Jankowiak, C. Hagel, T. Bräulke, Apoptotic photoreceptor loss and altered expression of lysosomal proteins in the *nclf* mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis, *Investigative ophthalmology & visual science*, 54 (2013) 6952-6959.
- [4] M. Bassal, J. Liu, W. Jankowiak, P. Saftig, U. Bartsch, Rapid and progressive loss of multiple retinal cell types in cathepsin D-deficient mice, an animal model of CLN10 disease, *Cells*, in press (2021).
- [5] D.G. Birch, Retinal degeneration in retinitis pigmentosa and neuronal ceroid lipofuscinosis: An overview, *Mol Genet Metab*, 66 (1999) 356-366.
- [6] A. Bouchelion, Z. Zhang, Y. Li, H. Qian, A.B. Mukherjee, Mice homozygous for c.451C>T mutation in *Cln1* gene recapitulate INCL phenotype, *Ann Clin Transl Neurol*, 1 (2014) 1006-1023.
- [7] D. Dalkara, K.D. Kolstad, K.I. Guerin, N.V. Hoffmann, M. Visel, R.R. Klimczak, D.V. Schaffer, J.G. Flannery, AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 19 (2011) 1602-1608.
- [8] M. Damme, L. Brandenstein, S. Fehr, W. Jankowiak, U. Bartsch, M. Schweizer, I. Hermans-Borgmeyer, S. Storch, Gene disruption of *Mfsd8* in mice provides the first animal model for CLN7 disease, *Neurobiology of disease*, 65 (2014) 12-24.
- [9] R.D. Geraets, S. Koh, M.L. Hastings, T. Kielian, D.A. Pearce, J.M. Weimer, Moving towards effective therapeutic strategies for Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, *Orphanet journal of rare diseases*, 11 (2016) 40.
- [10] M. Griffey, E. Bible, C. Vogler, B. Levy, P. Gupta, J. Cooper, M.S. Sands, Adeno-associated virus 2-mediated gene therapy decreases autofluorescent storage material and increases brain mass in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Neurobiol Dis*, 16 (2004) 360-369.
- [11] M. Griffey, S.L. Macauley, J.M. Ogilvie, M.S. Sands, AAV2-mediated ocular gene therapy for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Mol Ther*, 12 (2005) 413-421.
- [12] M.A. Griffey, D. Wozniak, M. Wong, E. Bible, K. Johnson, S.M. Rothman, A.E. Wentz, J.D. Cooper, M.S. Sands, CNS-directed AAV2-mediated gene therapy ameliorates functional deficits in a murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Mol Ther*, 13 (2006) 538-547.
- [13] J. Groh, T.G. Kuhl, C.W. Ip, H.R. Nelvagal, S. Sri, S. Duckett, M. Mirza, T. Langmann, J.D. Cooper, R. Martini, Immune cells perturb axons and impair neuronal survival in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Brain*, 136 (2013) 1083-1101.
- [14] P. Gupta, A.A. Soyombo, A. Atashband, K.E. Wisniewski, J.M. Shelton, J.A. Richardson, R.E. Hammer, S.L. Hofmann, Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (2001) 13566-13571.
- [15] M. Haltia, The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present, *Biochimica et biophysica acta*, 1762 (2006) 850-856.
- [16] J. Hu, J.Y. Lu, A.M. Wong, L.S. Hynan, S.G. Birnbaum, D.S. Yilmaz, B.M. Streit, E.M. Lenartowicz, T.C. Thompson, J.D. Cooper, S.L. Hofmann, Intravenous high-dose enzyme replacement therapy with recombinant palmitoyl-protein thioesterase reduces visceral lysosomal storage and modestly prolongs survival in a preclinical mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Mol Genet Metab*, 107 (2012) 213-221.

- [17] A. Jalanko, J. Vesa, T. Manninen, C. von Schantz, H. Minye, A.L. Fabritius, T. Salonen, J. Rapola, M. Gentile, O. Kopra, L. Peltonen, Mice with Ppt1Deltaex4 mutation replicate the INCL phenotype and show an inflammation-associated loss of interneurons, *Neurobiol Dis*, 18 (2005) 226-241.
- [18] W. Jankowiak, L. Brandenstein, S. Dulz, C. Hagel, S. Storch, U. Bartsch, Retinal Degeneration in Mice Deficient in the Lysosomal Membrane Protein CLN7, *Investigative ophthalmology & visual science*, 57 (2016) 4989-4998.
- [19] W. Jankowiak, K. Kruszewski, K. Flachsbarth, C. Skevas, G. Richard, K. Ruther, T. Braulke, U. Bartsch, Sustained Neural Stem Cell-Based Intraocular Delivery of CNTF Attenuates Photoreceptor Loss in the nclf Mouse Model of Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, *PLoS one*, 10 (2015) e0127204.
- [20] T.B. Johnson, J.T. Cain, K.A. White, D. Ramirez-Montealegre, D.A. Pearce, J.M. Weimer, Therapeutic landscape for Batten disease: current treatments and future prospects, *Nature reviews. Neurology*, 15 (2019) 161-178.
- [21] R. Kalviainen, K. Eriksson, M. Losekoot, I. Sorri, I. Harvima, P. Santavuori, I. Jarvela, T. Autti, R. Vanninen, T. Salmenpera, O.P. van Diggelen, Juvenile-onset neuronal ceroid lipofuscinosis with infantile CLN1 mutation and palmitoyl-protein thioesterase deficiency, *European journal of neurology*, 14 (2007) 369-372.
- [22] R.R. Klimczak, J.T. Koerber, D. Dalkara, J.G. Flannery, D.V. Schaffer, A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells, *PLoS one*, 4 (2009) e7467.
- [23] A. Kohlschutter, A. Schulz, U. Bartsch, S. Storch, Current and Emerging Treatment Strategies for Neuronal Ceroid Lipofuscinoses, *CNS drugs*, 33 (2019) 315-325.
- [24] B. Lei, G.E. Tullis, M.D. Kirk, K. Zhang, M.L. Katz, Ocular phenotype in a mouse gene knockout model for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *J Neurosci Res*, 84 (2006) 1139-1149.
- [25] S.L. Macauley, M.S. Roberts, A.M. Wong, F. McSloy, A.S. Reddy, J.D. Cooper, M.S. Sands, Synergistic effects of central nervous system-directed gene therapy and bone marrow transplantation in the murine model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Annals of neurology*, 71 (2012) 797-804.
- [26] A.R.A. Marques, A. Di Spiezio, N. Thiessen, L. Schmidt, J. Grotzinger, R. Lullmann-Rauch, M. Damme, S.E. Storck, C.U. Pietrzik, J. Fogh, J. Bar, M. Mikhaylova, M. Glatzel, M. Bassal, U. Bartsch, P. Saftig, Enzyme replacement therapy with recombinant pro-CTSD (cathepsin D) corrects defective proteolysis and autophagy in neuronal ceroid lipofuscinosis, *Autophagy*, 16 (2020) 811-825.
- [27] R. Mazzei, F.L. Conforti, A. Magariello, C. Bravaccio, R. Militerni, A.L. Gabriele, S. Sampaolo, A. Patitucci, G. Di Iorio, M. Muglia, A. Quattrone, A novel mutation in the CLN1 gene in a patient with juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Journal of neurology*, 249 (2002) 1398-1400.
- [28] T.I. Metelitsina, D.J. Waggoner, M.A. Grassi, Batten Disease Caused by a Novel Mutation in the Ppt1 Gene, *Retinal cases & brief reports*, 10 (2016) 211-213.
- [29] J.N. Miller, A.D. Kovacs, D.A. Pearce, The novel Cln1(R151X) mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL) for testing nonsense suppression therapy, *Hum Mol Genet*, 24 (2015) 185-196.
- [30] S.E. Mole, G. Anderson, H.A. Band, S.F. Berkovic, J.D. Cooper, S.M. Kleine Holthaus, T.R. McKay, D.L. Medina, A.A. Rahim, A. Schulz, A.J. Smith, Clinical challenges and future therapeutic approaches for neuronal ceroid lipofuscinosis, *The Lancet. Neurology*, 18 (2019) 107-116.
- [31] S.E. Mole, R.E. Williams, H.H. Goebel, Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses, *Neurogenetics*, 6 (2005) 107-126.
- [32] N.J. Neverman, H.L. Best, S.L. Hofmann, S.M. Hughes, Experimental therapies in the neuronal ceroid lipofuscinoses, *Biochimica et biophysica acta*, 1852 (2015) 2292-2300.
- [33] M.S. Roberts, S.L. Macauley, A.M. Wong, D. Yilmaz, S. Hohm, J.D. Cooper, M.S. Sands, Combination small molecule PPT1 mimetic and CNS-directed gene therapy as a

- treatment for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Journal of inherited metabolic disease*, 35 (2012) 847-857.
- [34] P. Santavuori, M. Haltia, J. Rapola, C. Raitta, Infantile type of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. 1. A clinical study of 15 patients, *Journal of the neurological sciences*, 18 (1973) 257-267.
- [35] P. Santavuori, L. Lauronen, E. Kirveskari, L. Aberg, K. Sainio, T. Autti, Neuronal ceroid lipofuscinoses in childhood, *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 21 (2000) S35-41.
- [36] P. Santavuori, L. Lauronen, K. Kirveskari, L. Aberg, K. Sainio, Neuronal ceroid lipofuscinoses in childhood, *Supplements to Clinical neurophysiology*, 53 (2000) 443-451.
- [37] A. Schulz, T. Ajayi, N. Specchio, E. de Los Reyes, P. Gissen, D. Ballon, J.P. Dyke, H. Cahan, P. Slasor, D. Jacoby, A. Kohlschutter, C.L.N.S. Group, Study of Intraventricular Cerliponase Alfa for CLN2 Disease, *The New England journal of medicine*, 378 (2018) 1898-1907.
- [38] Z. Shevtsova, M. Garrido, J. Weishaupt, P. Saftig, M. Bahr, F. Luhder, S. Kugler, CNS-expressed cathepsin D prevents lymphopenia in a murine model of congenital neuronal ceroid lipofuscinosis, *The American journal of pathology*, 177 (2010) 271-279.
- [39] C. Shyng, H.R. Nelvagal, J.T. Dearborn, J. Tyynela, R.E. Schmidt, M.S. Sands, J.D. Cooper, Synergistic effects of treating the spinal cord and brain in CLN1 disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 (2017) E5920-E5929.
- [40] S.J. Tamaki, Y. Jacobs, M. Dohse, A. Capela, J.D. Cooper, M. Reitsma, D. He, R. Tushinski, P.V. Belichenko, A. Salehi, W. Mobley, F.H. Gage, S. Huhn, A.S. Tsukamoto, I.L. Weissman, N. Uchida, Neuroprotection of host cells by human central nervous system stem cells in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Cell stem cell*, 5 (2009) 310-319.
- [41] J. Vesa, E. Hellsten, L.A. Verkruyse, L.A. Camp, J. Rapola, P. Santavuori, S.L. Hofmann, L. Peltonen, Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Nature*, 376 (1995) 584-587.
- [42] R.G. Weleber, The dystrophic retina in multisystem disorders: the electroretinogram in neuronal ceroid lipofuscinoses, *Eye*, 12 (Pt 3b) (1998) 580-590.
- [43] R.G. Weleber, N. Gupta, K.M. Trzupek, M.S. Wepner, D.E. Kurz, A.H. Milam, Electroretinographic and clinicopathologic correlations of retinal dysfunction in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (infantile Batten disease), *Mol Genet Metab*, 83 (2004) 128-137.
- [44] R.E. Whiting, K. Narfstrom, G. Yao, J.W. Pearce, J.R. Coates, L.J. Castaner, C.A. Jensen, B.N. Dougherty, B.R. Vuilleminot, D. Kennedy, C.A. O'Neill, M.L. Katz, Enzyme replacement therapy delays pupillary light reflex deficits in a canine model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, *Experimental eye research*, 125 (2014) 164-172.
- [45] R.E.H. Whiting, G. Robinson Kick, J. Ota-Kuroki, S. Lim, L.J. Castaner, C.A. Jensen, J. Kowal, A. Nguyen, C. Corado, C.A. O'Neill, M.L. Katz, Intravitreal enzyme replacement inhibits progression of retinal degeneration in canine CLN2 neuronal ceroid lipofuscinosis, *Experimental eye research*, 198 (2020) 108135.