

Charakterisierung von
Aspartylglucosaminidase-Varianten und
Erprobung von personalisierten Therapien
in vitro

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Voll, Leonie
aus Gießen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biochemisches Institut des Fachbereichs Medizin

Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: Prof. Dr. Alexander Oksche

Tag der Disputation: 21.01.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lysosomen	1
1.1.1	Transport von lysosomalen Proteinen	1
1.1.2	Lysosomale Speicherkrankheiten	3
1.2	Aspartylglucosaminidase (AGA)	4
1.2.1	cDNA von AGA und Genstruktur	4
1.2.2	Prozessierung und autokatalytische Aktivierung von AGA	5
1.2.3	Struktur von AGA	7
1.2.4	Reaktionsmechanismus von AGA	7
1.3	Aspartylglucosaminurie (AGU)	7
1.3.1	Pathogenese und Symptome	8
1.3.2	AGU _{Fin} Varianten	8
1.3.3	Weitere AGU-Varianten	9
1.3.4	Diagnostik	9
1.3.5	Therapien für AGU	10
1.4	Ziele der Arbeit	10
2	Material	12
2.1	Materialien und Geräte	12
2.2	Chemikalien und Puffer	13
2.3	Kits und Säulen	17
2.4	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	18
2.5	Plasmide	19
2.6	Primer	19
2.7	Humane Zelllinien und Bakterienstämme	20
3	Methoden	21
3.1	Zellbiologische Standardmethoden	21
3.1.1	Kultivierung von HEK293T- und HeLa-Zellen	21

3.1.2	Passagieren von HEK293T- und HeLa-Zellen	21
3.1.3	Transiente Transfektion von HEK293T- und HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA	21
3.1.4	Stabile Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmid-DNA	22
3.1.5	Auftauen und Einfrieren der Zellen	22
3.1.6	Anfärbung von Lysosomen	22
3.2	Molekularbiologische Standardmethoden	23
3.2.1	Mutagenese	23
3.2.2	DNA-Fällung	23
3.2.3	Restriktionsverdau	24
3.2.4	Transformation	24
3.2.5	Plasmidpräparation (Mini)	24
3.2.6	Plasmidpräparation (Midi)	25
3.2.7	Zellysatherstellung aus HEK293T- und HeLa-Zellen	25
3.2.8	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	26
3.2.9	SDS-PAGE	26
3.2.10	Western Blot	26
3.2.11	Immundetektion	27
3.2.12	Strippen	27
3.2.13	Fluorimetrische AGA-Aktivitätsmessung ((Banning et al. 2016; Voznyi YaV et al. 1993))	27
3.3	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	PCR-Mutagenese von AGA-C179R und AGA-G302R in pcDNA3- und pEXPR-IBA103-Vektoren	29
4.2	Expression von AGA-C179R und AGA-G302R in unterschiedlichen Zellen	30
4.2.1	Expression von AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 in transient transfizierten HEK293T-Zellen	30
4.2.2	Expression von AGA-C179R-pcDNA3 und AGA-G302R-pcDNA3 in transient transfizierten HEK293T-Zellen	31

4.2.3	Expression von AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGAG302R-pEXPR-IBA103 in transient transfizierten HeLa-Zellen	32
4.2.4	Expression von AGA-C179R-pcDNA3 und AGA-G302R-pcDNA3 in transient transfizierten HeLa-Zellen	33
4.3	Aktivität der AGA- Varianten C179R und G302R	34
4.3.1	AGA-Aktivitätsmessung in HEK293T-Zellen	34
4.3.2	AGA-Aktivitätsmessungen in HeLa-Zellen	35
4.4	Lokalisation von AGA-C179R und AGA-G302R	36
4.5	Koexpression von AGA-WT mit den AGA-Varianten C179R und G302R	37
4.5.1	Expression der Varianten C179R und G302R bei Koexpression von AGA-WT in HEK293T-Zellen	38
4.5.2	AGA-Aktivitätsmessung bei Koexpression des Wildtyps in HEK293T-Zellen	39
4.5.3	Expression der Varianten C179R und G302R bei Koexpression mit AGA-WT in HeLa-Zellen	40
4.5.4	AGA Aktivitätsmessung bei Koexpression des Wildtyps in HeLa-Zellen	41
4.6	Chaperonbehandlung von stabil transfizierten HEK293T-Zellen	42
4.6.1	Expression der C179R-Variante nach Behandlung mit Chaperonen	42
4.6.2	AGA-Aktivität der C179R-Variante nach Behandlung mit Chaperonen	43
4.6.3	Expression der G302R-Variante nach Behandlung mit Chaperonen	45
4.6.4	Aktivität der G302R Variante nach Behandlung mit Chaperonen	46
5	Diskussion	47
5.1	Gegenüberstellung der AGA C179R-Variante mit bekannten Varianten	47
5.2	Gegenüberstellung AGA G302R-Variante mit bekannten Varianten	49
5.3	Bekannte Therapieansätze bei Aspartylglucosaminurie	50
5.4	Behandlung der AGA Varianten C179R und G302R mit Glycin und Betain	52
5.5	Einfluss der Kotransfektion von AGA Wildtyp in die AGA Varianten C179R und G302R	52
5.6	Fazit	53
5.7	Ausblick	54

6	Zusammenfassung	55
7	Summary	56
8	Abkürzungsverzeichnis	57
9	Abbildungsverzeichnis	59
10	Tabellenverzeichnis	61
11	Literaturverzeichnis	62
12	Erklärung zur Dissertation	69
13	Danksagung	70

1 Einleitung

1.1 Lysosomen

Lysosomen sind Zellorganellen, die mit ihren ungefähr 60 sauren Hydrolasen, wie zum Beispiel Glykosidasen, Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen und Sulfatasen, am Abbau von zelleigenen und zellfremden Makromolekülen beteiligt sind (Bainton 1981). Lysosomen wurden bereits 1955 von de Duve entdeckt, da sie sich durch ihre Zentrifugationseigenschaften von Mitochondrien abgrenzen ließen (De Duve et al. 1955). Lysosomen kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und können von Endosomen abgegrenzt werden, da sie zum Beispiel keine Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PR) besitzen (Luzio et al. 2007). Sie sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben und besitzen einen sauren pH von ungefähr 4,8, in welchem ihre Enzyme am besten arbeiten (Coffey und De Duve 1968). Dieses saure Milieu wird energieaufwändig durch die H⁺-ATPase vom V-Typ aufrecht erhalten. Im Zytosol herrscht ein pH-Wert von ungefähr 7. Das pH-Optimum der meisten lysosomalen Enzyme liegt bei etwa pH 5, sodass sie bei einer eventuellen Freisetzung in das Zytosol oder dem extrazellulären Milieu nur wenig aktiv sind. Dies stellt einen Schutz gegen Selbstverdauung der Zelle dar (Mindell 2012).

Lysosomen stellen das terminale Kompartiment bei der Endozytose dar, weil hier der Abbau von endozytierten Makromolekülen stattfindet. Der Start dieses Weges beginnt an der Plasmamembran, und von hier kommen die Moleküle zuerst in frühe Endosomen, wo Moleküle in unterschiedlichen Richtungen sortiert werden. Ein Großteil wird von dort wieder zurück zur Plasmamembran transportiert. Moleküle, die abgebaut werden sollen, gelangen über späte Endosomen zu den Lysosomen, wo dann ein Abbau der Makromoleküle stattfindet (Appelqvist et al. 2013). Nach dem Abbau von Proteinen, Kohlenhydraten, Nukleinsäuren, Lipiden und vielen weiteren Makromolekülen werden die Kataboliten wieder in das Zytosol der Zelle geschleust und stehen dem zellulären Metabolismus wieder zur Verfügung (Sagné und Gasnier 2008).

1.1.1 Transport von lysosomalen Proteinen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie lysosomale Proteine in die Lysosomen gelangen. Eine Möglichkeit ist über die Endozytose (Braun et al. 1989). Hierbei erfolgt zunächst ein Transport der endozytierten lysosomalen Proteine in Endosomen.

Von diesen erfolgt ein Austausch von Vesikeln oder über sogenannte Kiss-and-Run Kontakte mit den Lysosomen (Bright et al. 2005).

Die meisten lysosomalen Hydrolasen gelangen direkt nach der Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) in die Lysosomen. Die Hydrolasen werden im Golgi Komplex an Mannose-Resten phosphoryliert und so im trans-Golgi von M6PR erkannt (Kaplan et al. 1977). Diese Modifikation findet in zwei Stufen statt, bei denen eine Phosphotransferase und eine Phosphoglykosidase beteiligt sind. Zuerst werden im cis-Golgi N-Acetylglucosaminyl (GlcNAc)-1-phosphat Gruppen an die terminalen Mannosereste in den N-Glykanen der löslichen lysosomalen Proteine angehängt. Danach gelangen die modifizierten lysosomalen Proteine ins trans-Golgi Netzwerk, wo durch Phosphoglykosidase das GlcNAc entfernt wird und somit die terminalen Mannose-6-Phosphat Reste der N-Glykane entstehen (Pohl und Hasilik 2015).

Im trans-Golgi Netzwerk binden die markierten Proteine an M6PR. Diese Rezeptoren besitzen unter anderem Sequenzmotive für die Bindung der Adapterproteinkomplexe. Mit Hilfe der Bindung des M6PR an die Adapterproteinkomplexe werden die lysosomalen Proteine in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt und zu Endosomen transportiert (Braulke und Bonifacio 2009). Durch Einwirkung von den ESCRT (Endosomal sorting Complex Required for Transport)-Proteinkomplexen findet eine Reifung dieser Endosomen zu späten Endosomen statt, was mit einem Abfall des pH in späten Endosomen einhergeht (Huotari und Helenius 2011). Hier findet aufgrund des niedrigen pH-Wertes (unter pH 5) eine Dissoziation des Proteins vom M6PR statt. Es erfolgt der Rücktransport des M6PR zum trans-Golgi Netzwerk und dort steht er neuen Transportzyklen zur Verfügung (siehe Abbildung 1). Die Hydrolasen gelangen von den Endosomen zu den Lysosomen (Bonifacio und Rojas 2006).

Es gibt zwei verschiedene Arten von M6PR: einen 300 kDa großen Mannose-Phosphatrezeptor (MPR300) und einen 46 kDa großen Rezeptor (MPR46). Beide Rezeptoren haben sehr ähnliche extrazelluläre Domänen, jedoch unterscheiden sie sich in ihren zytoplasmatischen Domänen (Dahms et al. 1987; Lobel et al. 1988). Eine Rolle bei der Endozytose von lysosomalen Enzymen spielt nur der MPR300, da der MPR46 in den meisten Zelltypen nicht in der Plasmamembran vorkommt (Storch und Braulke 2001). Es gibt jedoch auch Mannose-6-Phosphat unabhängige Transportwege. Sortilin spielt eine Rolle in der Sortierung zwischen dem Endosom und dem Trans-Golgi-Netzwerk verschiedener lysosomaler Proteine, unter anderem von Sphingolipid-Aktivator-Proteinen (Lefrancois 2003). Ein weiteres Protein ist LIMP-2. Dieses bindet β -Glucocerebrosidase und bringt das gebundene Enzym pH-abhängig zu Lysosomen. Im Gegensatz zu anderen Transportwegen findet die Interaktion im ER und nicht im Trans-Golgi-Netzwerk statt (Reczek et al. 2007).

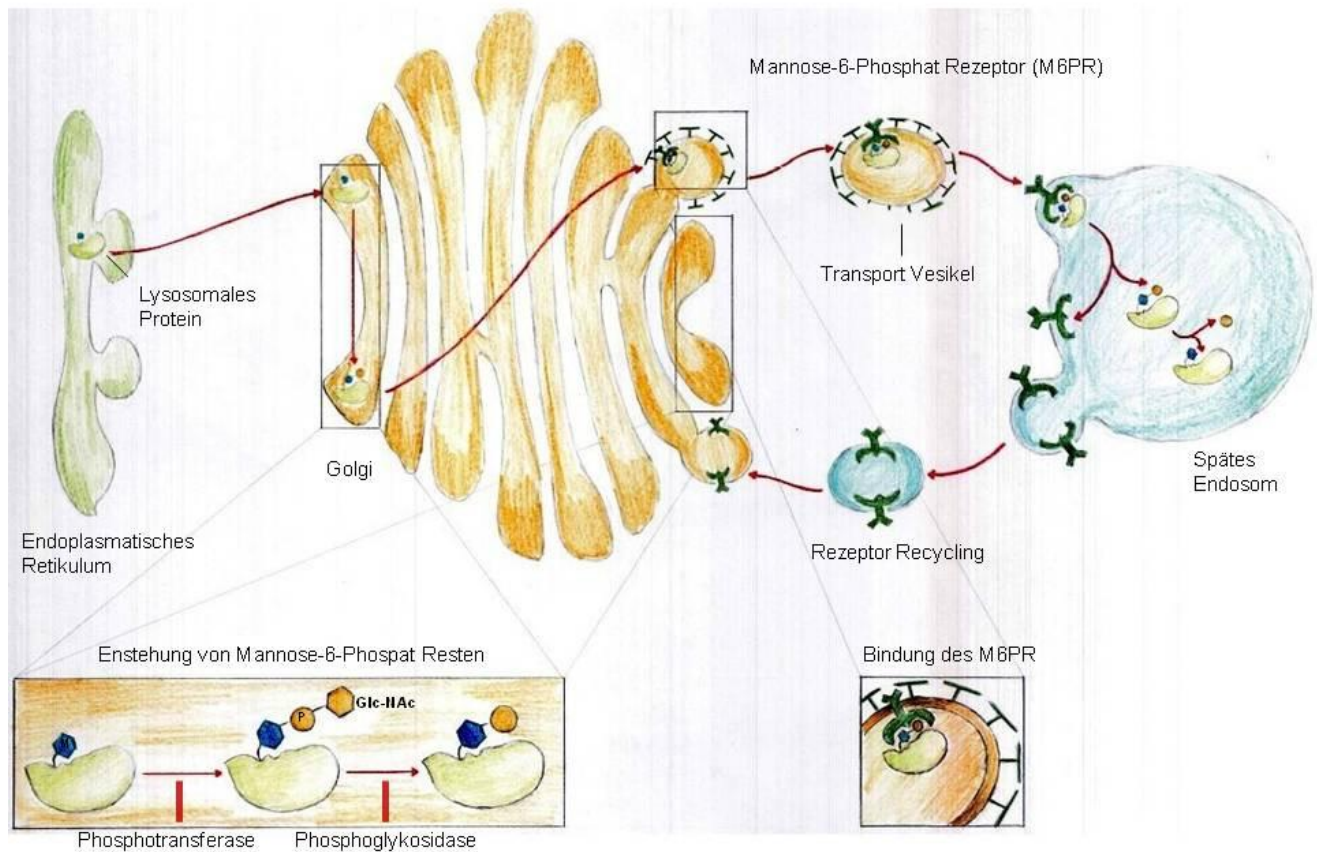


Abbildung 1: Transport von neu hergestellten löslichen lysosomalen Proteinen über den Mannose-6-Phosphat Weg, modifiziert nach (Coutinho et al. 2012) Die lysosomalen Proteine werden im ER gebildet und gelangen von dort in den Golgi-Apparat, wo in zwei Schritten die Mannose-6-Phosphat Reste angehängt werden. Hierbei gelangt im ersten Schritt das GlcNAc-Phosphat an die C6 Position einer ausgewählten Mannose mit Hilfe der Phosphotransferase. Im nächsten Schritt erfolgt die Abspaltung des GlcNAc-Restes mit Hilfe der Phosphoglykosidase. Danach erfolgt eine Erkennung durch Mannose-6-Phosphatrezeptoren und der Transport in Clathrin-umhüllten Vesikeln zu den Endosomen.

1.1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten

Lysosomale Speicherkrankheiten sind angeborene Erkrankungen, die durch eine Anhäufung des abzubauenen Substrates in der Zelle gekennzeichnet sind. Die Krankheiten werden rezessiv vererbt und sind monogen, wovon nur ein geringer Anteil X-chromosomal vererbt wird. (Bellettato und Scarpa 2010). Einzeln für sich gesehen handelt es sich bei den verschiedenen Unterarten um seltene Erkrankungen. In Zusammenschau der verschiedenen Formen der lysosomalen Speicherkrankheiten zeigt sich jedoch eine Häufigkeit von ungefähr 1:8000 Lebendgeburten (Poupetová et al. 2010). Über zwei Drittel der lysosomalen Speicherkrankheiten betreffen das

zentralnervöse System, was zu Symptomen, wie fortschreitenden motorischen und kognitiven Verfall, führt. Viele lysosomale Speicherkrankheiten sind durch die herabgesetzte Wirkung einer einzelnen löslichen sauren Hydrolase gekennzeichnet. Diese ist an einer katabolischen Kaskade beteiligt, die für den Substanzabbau notwendig ist. Ungefähr zwei Drittel der lysosomalen Speicherkrankheiten beruhen auf solch einer Hydrolaseninsuffizienz (Ballabio und Gieselmann 2009).

Es gibt jedoch auch Erkrankungen, welche ihren Ursprung in der posttranslationalen Modifikation haben. Hier geht es hauptsächlich um die fehlende Ausbildung von Mannose-6-Phosphat Resten. Bei diesen Erkrankungen kommt es durch den fehlenden Transport in die Lysosomen zum Anstieg der lysosomalen Enzyme im Extrazellulärraum und in Körperflüssigkeiten. Hierzu zählen die Mukopolipidosen und der Multiple Sulfatasemangel (Dierks et al. 2009).

Klassifiziert werden können lysosomale Speicherkrankheiten klassischerweise nach dem anfallenden Substrat. Somit gibt es beispielsweise Mucopolysaccharidosen, Lipidosen und Oligosaccharidosen,. Die Aspartylglucosaminurie gehört zur Gruppe der Glykoproteinosen.

Durch ein großes Spektrum von Symptomen kommt es oft zum späten Entdecken der Erkrankung (Wilcox 2004). Der Phänotyp der Erkrankung ist dabei jedoch abhängig von der Art des anfallenden Substrats und von dem Zelltyp, der von der Akkumulation betroffen ist. Hierbei kann auch beobachtet werden, dass sich gewisse Störungen organspezifisch bemerkbar machen. So kommt es beispielsweise beim Vorliegen von Mucopolysaccharidosen am ehesten zu Problemen in Knorpeln und Knochen (Platt et al. 2012).

1.2 Aspartylglucosaminidase (AGA)

Aspartylglucosaminidase [AGA, N(4)-(β-N-Acetylglucosaminy)-L-Asparaginase, EC 3.5.1.26] ist eine lysosomale Hydrolase, die für die letzten Schritte des Abbaus von N-glykosylierten Proteinen verantwortlich ist. Sie katalysiert die Spaltung des Asparagins von N-Acetylglucosamin-Bindungen nach dem Abbau der Polypeptidkette (Makino et al. 1966).

1.2.1 cDNA von AGA und Genstruktur

Die AGA cDNA enthält 2100 Basenpaare. Hiervon kodieren 1041 Basenpaare der cDNA für 346 Aminosäuren, wovon 23 Aminosäuren das Signalpeptid ausmachen (Ikonen et al., 1991). Das Gen für AGA ist auf der Chromosomenregion 4q32-q33

lokalisiert (Morris et al. 1992). Es ist ungefähr 13 Kilobasenpaare lang und besitzt 9 Exons, die von Introns getrennt sind, die der GT/AG Spleißregel folgen (Park et al. 1991). Die 5'- und 3'-nicht-translatierten Regionen (UTR) sind nicht von Introns unterbrochen. Exon 1 kodiert für die 5'-UTR und die ersten 46 Aminosäuren. Exon 9 kodiert für die letzten 33 Aminosäuren und enthält Basen der 3'-UTR. Die Promotorregion zeigt, typisch für Haushaltsgene und andere saure Hydrolasen, GC-reiche Inseln (Uusitalo et al. 1997).

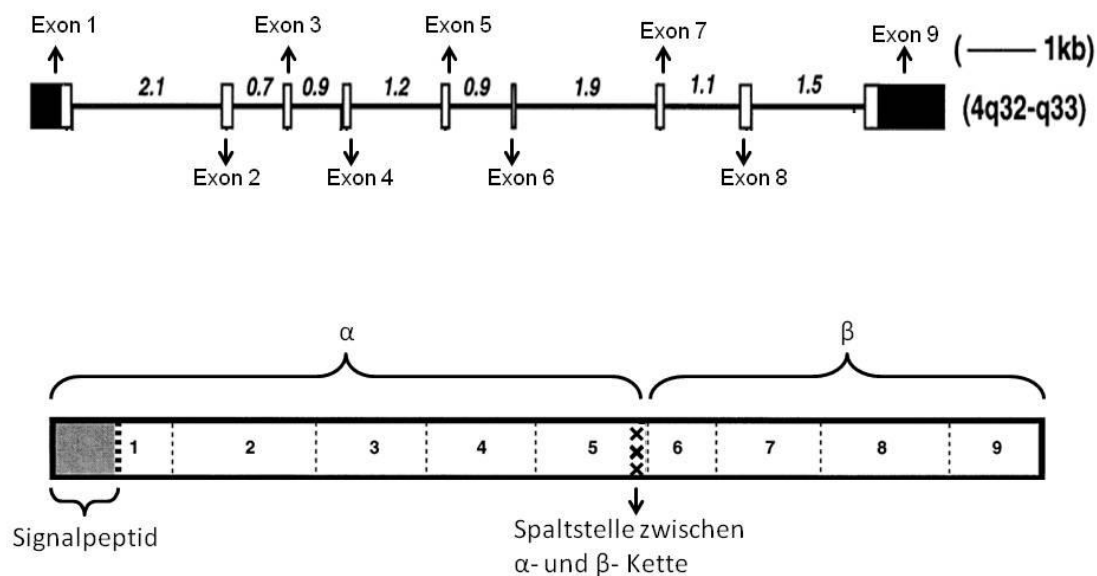


Abbildung 2: Strukturen des humanen AGA-Gens und – Proteins, modifiziert nach (Aronson 1999) : Das Gen ist etwa 13 kb groß und auf Chromosom 4q32-q33 lokalisiert. Die 9 Exons sind durch Introns getrennt, deren Größe kursiv geschrieben ist. Die schwarzen Kästen in Exon 1 und 9 zeigen die nicht-translatierten Regionen.

1.2.2 Prozessierung und autokatalytische Aktivierung von AGA

Die Prozessierung von AGA findet hauptsächlich im ER statt. Das Vorläuferpeptid besitzt ungefähr eine Masse von 42 kDa. Als erstes wird das Signalpeptid vom Vorläuferpeptid zwischen Cys23 und Ser24 abgespalten. Als nächstes findet im ER die Spaltung in zwei Polypeptide statt. Dieser Schritt ist wichtig für die Aktivierung des Enzyms. So entsteht eine pro- α -Untereinheit, welche 27 kDa groß ist und eine β -Untereinheit, welche 17 kDa groß ist. Die Schnittstelle befindet sich hier zwischen Asn205 und Thr206. Danach findet der Transport der Proteine über den

Mannose-6-Phosphatweg in die Lysosomen statt (Tikkanen et al. 1995; Tikkanen et al. 1997). Hier werden von der pro- α -Einheit erneut 10 Aminosäuren abgespalten, sodass eine 24 kDa große α -Untereinheit entsteht (Ikonen et al. 1993). Im Lysosom kommt es zum Trimmen durch Proteasen am C-terminalen Ende. So entsteht eine β '-Untereinheit, die 15 kDa groß ist (Tikkanen et al. 1996b). Aufgrund der heterogenen Glykosylierung zeigt sich im Western Blot ein Muster von vier Polypeptiden. Hierbei hat die α -Untereinheit eine Größe von 24 und 25 kDa und die β -Untereinheit eine Größe von 17 und 18 kDa (Halila et al. 1991; Tollersrud und Aronson 1989).

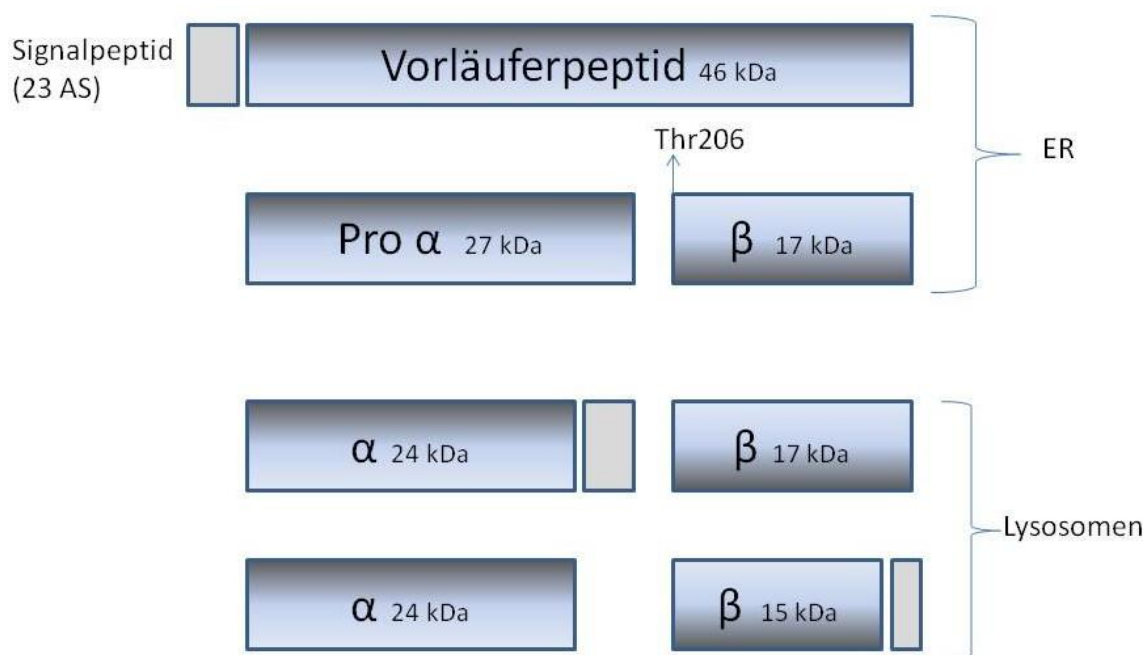


Abbildung 3: Prozessierung von AGA, abgewandelt nach (Ikonen et al. 1993): AGA wird als Vorläufermolekül synthetisiert. Zuerst wird von diesem Vorläufermolekül das Signalpeptid entfernt. Im darauffolgenden Schritt findet die Prozessierung in eine pro- α -Untereinheit und eine β -Untereinheit statt. Hiernach erfolgt der Transport vom ER in die Lysosomen. In den Lysosomen erfolgt das C-terminale Trimmen und es entstehen die 24 kDa große α -Untereinheit und die 15 kDa große β -Untereinheit.

1.2.3 Struktur von AGA

AGA ist ein Heterotetramer, welches aus einem $\alpha\beta\alpha$ - Sandwich besteht (Oinonen et al. 1995). Der Kern des Moleküls besteht aus zwei antiparallel angeordneten β -Faltblättern, die von α -Helices eingerahmt sind. Außerhalb des Kerns liegen zwei Helices, die aus dem C-terminalen Ende der α -Untereinheiten bestehen. In dem Molekül befinden sich 4 Disulfidbrücken: zwei in der α -Untereinheit zwischen Cys64 und Cys69 und zwischen Cys163 und Cys179. Zwei weitere finden sich in der β -Untereinheit zwischen Cys286 und Cys306 und zwischen Cys317 und Cys345 (Riikonen et al. 1996). Das aktive Zentrum hat die Form einer trichterförmigen Spalte und die erste Aminosäure der β -Untereinheit, Thr206, spielt eine entscheidende Rolle bei der katalytischen Aktivität (Riikonen et al. 1995; Tikkanen et al. 1996a).

1.2.4 Reaktionsmechanismus von AGA

Der Abbau von Glykoproteinen mit Asparagin-verknüpften Glykanen erfolgt in zwei Hauptschritten. Durch Exoglykosidasen werden die Kohlenhydratketten von ihrem nicht reduzierenden Ende her abgebaut. Als nächstes erfolgt der Abbau der Proteinkomponente durch Endo- und Exopeptidasen (Winchester 2005). Nun muss die verbleibende Bindungsstelle zwischen den N-gebundenen Oligosacchariden und dem Asparaginrest gespalten werden.

Hierfür wird AGA benötigt, denn diese hydrolysiert die Amidbindung zwischen Asparagin und der Oligosaccharidkette (Makino et al. 1966). Damit diese Reaktion stattfinden kann, benötigt AGA eine freie α -Aminogruppe und eine freie α -Carboxylgruppe am Asparagin-Substrat. Dies bedeutet, dass die Peptidkette auf beiden Seiten des Asparagins zuerst von Proteasen, wie den Cathepsinen, abgebaut werden muss, bevor AGA wirken kann. Des Weiteren müssen alle Fucosen in dem Glykanteil entfernt werden, da diese die Glykosylasparaginase-Aktivität behindern (Aronson 1999).

1.3 Aspartylglucosaminurie (AGU)

Aspartylglucosaminurie (AGU, OMIM 208400) ist eine Erkrankung, die durch fehlende Aktivität des AGA-Enzyms gekennzeichnet ist. Sie wurde zum ersten Mal 1967 beschrieben, als zwei Kinder mit einer erhöhten Urinausscheidung von Aspartylglucosamin und geistiger Retardierung auffielen (Pollitt et al. 1968). Die Erkrankung tritt gehäuft in der finnischen Bevölkerung auf (Arvio et al. 2002). AGU

gehört zum Kreis der über 30 rezessiv vererbten finnischen Erkrankungen. Diese sind bedingt durch die Entstehung der finnischen Bevölkerung, die von einer relativ kleinen Bevölkerungsgruppe gegründet worden ist. Durch ein rasches Wachstum und eine lange Isolation der finnischen Bevölkerung kam es vermehrt zur Schließung von blutsverwandten Ehen. Es kam somit zu einer Anreicherung von Genen, die für die finnischen Erbkrankheiten verantwortlich sind (Peltonen 1997; Peltonen et al. 1999). In letzter Zeit gibt es jedoch eine steigende Anzahl von Neuerkrankungen weltweit, was die Annahme zulässt, dass AGU außerhalb von Finnland zuvor häufig unerkannt blieb (Arvio und Mononen 2016).

1.3.1 Pathogenese und Symptome

AGU ist gekennzeichnet durch eine Anreicherung von Aspartylglucosamin und anderen Glykoasparaginen im Gewebe und in Körperflüssigkeiten. Bei der Geburt erscheinen die Patienten in der Regel gesund. Doch bereits im Kindesalter kommt es zur Verzögerung im Erlernen der Sprache und zu einer schlechten motorischen Entwicklung (Arvio et al. 1993a). Ungefähr ein Drittel der Patienten leidet an Epilepsie (Arvio et al. 1993b). Zusätzlich zeigt sich bei den Patienten eine erhöhte Prävalenz für chronische Arthritis (Arvio et al. 1998). Phänotypisch fallen die Patienten beispielsweise durch ausgeprägte Wangenknochen, Hypertelorismus, kurze und breite Nasen und kleine Ohren auf. Zusätzlich zeigt sich eine verfrühte Alterung, was sich an der Haut durch frühe Faltenbildung zeigt (Arvio et al. 2004).

Die Lebenserwartung liegt höher als bei vielen anderen lysosomalen Speicherkrankheiten, ist jedoch immer noch herabgesetzt. Die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei finnischen weiblichen Patientinnen mit AGU bei ca. 50 Jahren, bei finnischen männlichen Patienten mit AGU bei ca. 45 Jahren, und die älteste bekannte Patientin lebte bis zu einem Alter von 69 Jahren (Arvio und Mononen 2016).

1.3.2 AGU_{Fin} Varianten

In finnischen Patienten wurde eine Homozygotie für zwei Punktmutationen, die stets zusammen auf demselben Allel auftreten, entdeckt (Ikonen et al. 1991b; Mononen et al. 1991). Die erste Punktmutation führt dazu, dass ein Glutamin ein Arginin ersetzt (R161Q) und die zweite, dass ein Serin ein Cystein ersetzt (C163S). Hierbei ist nur die zweite Mutation ausschlaggebend für die fehlerhafte AGA-Enzymaktivität (Ikonen et al. 1991b). Es zeigte sich, dass der Austausch C163S mit einer erniedrigten Enzymaktivität einhergeht und der AGA-Vorläufer nicht prozessiert wird (Fisher und

Aronson 1991). Diese Punktmutation wurde in 98% der finnischen AGU-Allele gefunden und trägt deshalb den Namen AGU_{Fin-major} (Syvänen et al. 1992). Ungefähr 1,5% der Patienten trägt neben der AGU_{Fin-major}-Variante eine weitere Variante, diese wird als AGU_{Fin-minor} beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Deletion von 2 Basen in Exon 2, das zu einem Stoppcodon und zu einer reduzierten Transkriptmenge führt, da die RNA instabil wird (Isoniemi et al. 1995).

1.3.3 Weitere AGU-Varianten

Die Human Gene Mutation Database (HGMD) (Stenson et al. 2014) zählt aktuell mehr als 30 verschiedene AGU-Varianten, wobei über die Hälfte Missense-Varianten sind. Der Rest beinhaltet Nonsense-Varianten, kleine Deletionen, Insertionen und Spleißvarianten. Die Varianten betreffen in der Regel nicht das aktive Zentrum, behindern jedoch häufig durch eine Konformationsänderung die korrekte Faltung und Prozessierung des Enzyms (Ikonen et al. 1991b). Außerhalb von Finnland gibt es verschiedene familienspezifische Varianten, von denen zwei in meiner Arbeit näher untersucht werden.

1.3.4 Diagnostik

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, AGU zu diagnostizieren. Wichtig sind hierbei Urinproben, in denen die Menge an Aspartylglucosamin und anderen Glykoasparaginen bestimmt werden kann (Mononen et al. 1986). Bei Erhöhung dieser Parameter sollte die AGA-Enzymaktivität im Serum, in Fibroblasten oder in Leukozyten bestimmt werden (Mononen et al. 1994). Histologisch zeigen sich hypertrophe Lymphozyten im peripheren Blut. Des Weiteren ist es möglich, pränataldiagnostisch durch Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie Untersuchungsmaterial zu gewinnen. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, humangenetische Tests durchzuführen. Diese sind für die AGU_{Fin}-Varianten verfügbar. Mit Hilfe dieser Tests können auch Träger der Erkrankung über Bluttests identifiziert werden (Hietala et al. 1996; Mononen 2016). Vor allem bei Varianten, die außerhalb der finnischen Bevölkerung auftreten, ist eine DNA-Sequenzanalyse unerlässlich, um die genaue Art der Variante zu identifizieren. Hier gab es in den letzten Jahren viele Entwicklungen, beispielsweise die Verbesserung der technischen Durchführung und die Weiterentwicklung der bioinformatischen Möglichkeiten (Gilissen et al. 2012).

1.3.5 Therapien für AGU

Aktuell ist keine kurative Therapie für AGU verfügbar. Knochenmarkstransplantationen zeigten keinen ausreichenden Nutzen, der die Nebenwirkungen eines solchen Eingriffes rechtfertigt (Arvio et al. 2001). Es gibt jedoch weitere Ansätze, die sich zum großen Teil aktuell noch in der präklinischen Phase befinden. Hierzu gehört unter anderem die Enzyersatztherapie (Kelo et al. 2005; Mononen et al. 1995). Auch experimentelle Arbeiten zur Gentherapie zeigten erste positive Ergebnisse (Chen et al. 2021; Virta et al. 2006). Eine vielversprechende Option ist die Therapie mit Chaperonen. Bei der Synthese von vielen Arten von Proteinen spielen Chaperone eine wichtige Rolle, da diese die Faltung der Proteine und somit die richtige Anordnung von dreidimensionalen Strukturen katalysieren (Fedorov und Baldwin 1997). Bei Chaperonen kann zwischen verschiedenen Arten unterschieden werden. Molekulare Chaperone haben einen indirekten Einfluss auf die Faltung der Proteine. Beispielsweise verhindern sie die Aggregation der ungefalteten Proteine vor allem bei zellulärem Stress (Ellis 1995). Zur Gruppe der molekularen Chaperone gehören die Hitzeschockproteine. Eine Gruppe der am besten untersuchten Hitzeschockproteine sind die 60 kDa großen Hitzeschockproteine (Hartl 1994).

Chemische Chaperone wiederum sind keine zelleigenen Komponenten. Sie können mit Hilfe einer veränderten Osmolarität unspezifisch bei der Proteinfaltung helfen. Die benötigte Osmolarität *in vivo* ist jedoch häufig toxisch (Bai et al. 1998). Pharmakologische Chaperone sind kleine Moleküle, die durch Bindung an das Zielprotein helfen, die biologische Aktivität zu verbessern, und die schon in geringen Konzentrationen wirksam sind (Arakawa et al. 2006; Morello et al. 2000). Pharmakologische Chaperone von Enzymen haben häufig eine ähnliche Struktur wie die Substrate oder können Inhibitoren des Enzyms sein. So konnte in der AG Tikkanen nachgewiesen werden, dass vor allem Betain (Trimethylglycin) einen positiven Effekt auf die AGU_{Fin-major}-Variante hat und als pharmakologisches Chaperon betrachtet werden kann (Banning et al. 2016). Deshalb wurde vor kurzem in Finnland eine klinische Studie mit dem Wirkstoff, der als Cystadane bekannt ist, durchgeführt (EudraCT Nr. 2017-000645-48).

1.4 Ziele der Arbeit

Eine neue Variante, c.535 T>C wurde im 5. Exon des AGA-Gens bei einem italienischen Geschwisterpaar ermittelt. Diese führt auf Proteinebene zur Substitution C179R. Eine weitere Variante c.904G>A wurde im 8. Exon bei 2 Patienten türkischer

Abstammung des Universitätsklinikums Gießen und Marburg ermittelt. Diese Variante wurde schon in den 90er Jahren bei einem türkischen Patienten charakterisiert (Ikonen et al. 1991a). Auf Proteinebene führt dies zur Aminosäuresubstitution G302R.

Ziel meiner Arbeit war es, zum einen die Auswirkungen beider Varianten auf die Enzymfunktion genauer zu untersuchen. Hierbei wurden die Auswirkungen auf die Prozessierung von AGA und die Enzymaktivität untersucht.

Zum anderen sollte ein möglicher Effekt von Chaperonen auf beide Varianten untersucht werden. Hierzu wurden zwei Chaperone, Glycin und Betain verwendet, die bei anderen Varianten einen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität gezeigt haben (Banning et al. 2016).

2 Material

2.1 Materialien und Geräte

In der Doktorarbeit verwendete Materialien und Geräte mit dazugehörigen Herstellern sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller
CryoPure Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Deckgläschen (15 mm Durchmesser)	Menzel, Braunschweig (DE)
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)
Filterpapier	Whatman, Dassel (DE)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Glaskolben	Schott-AG, Mainz (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Inkubator	Sanyo, München (DE)
Laser-Scanning Mikroskop Zeiss LSM 710 Meta	Zeiss Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (DE)
Neubauer-Zählkammer	Optik-Labor, Bad Homburg (DE)
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Dassel (DE)
Objektträger	Roth, Karlsruhe (DE)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Brampton (Kanada)
Pipettierhilfe accu jet®	Brand, Wertheim (DE)
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl, 5, 10 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)

Reaktionsgefäße (0,5 ,1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Schüttler (KS-15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spannungsquelle (Elektrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spektralphotometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf (DE)
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St.Leon-Rot (DE)
Tecan infinite M 200	Tecan, Crailsheim (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen (DE)
Waage Toledo PB602- S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
Western-Blotsystem Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zellkultur-Flaschen	TPP, Trasdingen (CH)
Zellkultur-Platten (10 cm)	TPP, Trasdingen (CH)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (DE)
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich, Kirchlingern (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlingern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	15 ml von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, (DE)

2.2 Chemikalien und Puffer

Die in der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen sind mit deren Herstellern und den dazugehörigen Niederlassungen bzw. deren Zusammensetzung in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller
7-Amino-4-Methylcoumarin	Sigma Aldrich, Darmstadt (DE)
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
APS (Ammoniumpersulfat)	Applichem, Darmstadt (DE)
Asp-AMC, L-Aspartic acid β – (7-amido-4-methylcoumarin)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA, Cölbe (DE)
Cut-Smart Puffer 10 x	New England Biolabs, Ipswich (USA)
dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphat) (10 mM)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Digitonin	Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)
Dpn I	New England Biolabs, Ipswich (USA)
DTT (Dithiothreitol)	Applichem, Darmstadt (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (DE)
Kaliumchlorid	Applichem, Darmstadt (DE)
LB (Luria/Miller)-Medium	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Lysotracker	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Macsfectin	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt (DE)
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
PCR(Polymerasekettenreaktion)Puffer	Stratagene, San Diego (USA)

10x	
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe (DE)
Pfu Turbo Polymerase	Agilent, Santa Clara (USA)
Ponceau S	Applichem, Darmstadt (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
Roti Mount Fluor Care DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Sterilium classic pure	Dode, Hamburg (DE)
TEMED (Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% MeOH
DMEM++	DMEM 10% Fötale Kälberserum 1% Penicillin / Streptomycin
ECL Lösung (verstärkte Chemielumineszenz Lösung)	100 mM Tris HCl (pH 8,5) 1,25 mM Luminol 0,2 mM Cumarinsäure
Fixierungspuffer (4% PFA)	80 mM Pipes15 (pH 6,8) 2 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA (pH 8) 4% PFA
Glycerol-Stock-Puffer	65% Glycerol 0,1 M MgSO ₄

	25 mM Tris-HCl (pH 8)
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB-Agar	15 g Agar-Pulver 1 l LB-Medium
LB (Luria/Miller)-Medium	20 g LB broth 1 l dd H ₂ O
Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 0,15 M NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Mcllvain's Phospat-Citrat Puffer pH 4,5 100 ml	18,16 ml 0,5 M Na ₂ PO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) 5,46 ml 1 M Zitronensäure 9,08 M Na ₂ PO ₄ 5,46 M Zitronensäure
Mcllvain's Phospat-Citrat Puffer pH 6,5 100 ml	28,4 ml 0,5 M Na ₂ PO ₄ 2,9 ml 1 M Zitronensäure
PBS 1x (Phosphat gepufferte Salzlösung)	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄
Ponceau-Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure
Proteinladepuffer (4x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 10% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 100 mM DTT 20% β-Mercaptoethanol
SDS-Polyacrylamidgel 1 mm: Sammelgel (4%)	2,55 ml Acrylamid 30% 0,075 ml APS 10% 11,7 ml dest. Wasser 0,075 ml SDS 20% 0,0225 ml TEMED 0,624 ml Tris pH 6,8 (3 M)
Trenngel (15%)	20,09 ml Acrylamid 30%

	0,4 ml APS 10% 14,25 ml dest. Wasser 0,2 ml SDS 20% 0,064 ml TEMED 5 ml Tris pH 8,8 (3 M)
SOC Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Magnesiumsulfat 0,5 g/l Natriumchlorid 0,186 g/l Kaliumchlorid pH 7,0 20 mM Glucose
Strip-Puffer alkalisch	0,1 M NaOH (pH 12,7)
TBST (Tris gepufferte Salzlösung + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% Tween
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris (pH 8) 1 mM EDTA

2.3 Kits und Säulen

In Tabelle 4 sind die in der Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen N.V., Venlo (NL)
NucleoBond Xtra Midi EF	Macherey Nagel GmbH & Co, Düren (DE)

2.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

In den Tabellen 5 und 6 sind die, in der Doktorarbeit für die Immunfluoreszenz und Western Blot eingesetzten, Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt. In Tabelle 7 sind die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primärantikörper, den jeweiligen Verdünnungen und deren Hersteller

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung WB	Hersteller
Anti-AGA	Kaninchen	1:5000	von Prof. Dr. Tikkanen zur Verfügung gestellt (Tikkanen et al. 1995)
Anti-GAPDH	Maus	1:10 000	Abcam via Biozol, Eching, (DE)

Tabelle 6: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung WB	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:10 000	Dako, Hamburg, (DE)
Anti Maus-HRP	Ziege	1:10 000	Dako, Hamburg, (DE)

Tabelle 7: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
DAPI	1:1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lysotracker Red -DND-99, 1 mM in DMSO	1:400	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, (DE)

2.5 Plasmide

Die eingesetzten Plasmide bzw. Konstrukte sind in der Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Hersteller

Konstrukt	Resistenz	Referenz
pTer+	Zeocin	(van de Wetering et al. 2003)
AGA WT pEXPR-IBA103	Ampicillin/ Neomycin	(Banning et al. 2016)
AGA WT pcDNA3	Ampicillin/ Neomycin	(Banning et al. 2016)

2.6 Primer

Die eingesetzten Mutagenese-Primer und ihre Sequenzen sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primer und ihrer Sequenzen, sowie deren Punktmutation unterstrichen

Primer	Sequenz
AGA - C179R fwd	5'TACCAGATCCCTCAAATAC <u>C</u> GCGGACCCTACA AACCACCT 3'
AGA - C179R rev	5'AGGTGGTTTGTAGGGTCCGC <u>G</u> GTATTTTGAGGG ATCTGGTA 3'
AGA - G302R fwd	5'AGCATTTTCCAGAATTCTTT <u>A</u> GGGCTGTTATATG TGCCAAT 3'
AGA - G302R rev	5'ATTGGCACATATAACAGCCCT <u>T</u> AAAGAATTCTGGA AAATGCT 3'

2.7 Humane Zelllinien und Bakterienstämme

In Tabelle 10 sind die verwendeten Zelllinien sowie der eingesetzte Bakterienstamm mit weiterführenden Informationen aufgelistet.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien und des Bakterienstamms sowie deren Hersteller.

Bezeichnung	Informationen	Quelle
HeLa-Zellen	Humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen	ATCC, Teddington (U.K.)
HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney)	Humane, embryonale Nierenzellen	ATCC, Teddington (U.K.)
XL1-Blue E.Coli (Escherichia coli)	Zur Vermehrung der Plasmidkonstrukte	Agilent/ Stratagene, La Jolla (USA)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Standardmethoden

3.1.1 Kultivierung von HEK293T- und HeLa-Zellen

Die verwendeten Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in T25-Zellkulturflaschen. Als Medium wurde DMEM verwendet, welchem 10% Fötale Kälberserum und 1% Penicillin/ Streptomycin zugesetzt wurde.

3.1.2 Passagieren von HEK293T- und HeLa-Zellen

Bei einer hohen Konfluenz wurden Zellen passagiert. Hierzu wurde zuerst das Medium abgesaugt und anschließend mit 1,5 ml PBS gewaschen. Auch diese Lösung wurde abgesaugt und anschließend 300 µl Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach 5 Minuten haben sich die Zellen in der Regel ausreichend von den Zellkulturflaschen gelöst, und die Reaktion wurde mit Kulturmedium abgestoppt. Um eine Separierung der einzelnen Zellen zu erreichen, wurde mit der Pipette resuspendiert. Für die Erhaltungskulturen wurden meistens 300 µl Zellsuspension behalten und 5 ml Kulturmedium hinzugefügt. Andere Zellen wurden für Versuche ausgesät und der Rest verworfen.

3.1.3 Transiente Transfektion von HEK293T- und HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA

Um die Expression eines bestimmten Proteins zu erreichen wurde die entsprechende Plasmid-DNA in die Zelle transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von Lipofektion durch die kationische Lipidlösung Macsfectin. Diese besitzt die Möglichkeit, die Plasmid-DNA zu umhüllen, und somit können die Vesikel mit Lipiddoppelschicht gut in die Zelle gelangen. Hierzu wurden HEK293T und HeLa-Zellen in 12 Well Platten verwendet, die eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen und kurz vor der Transfektion neues Medium erhalten hatten. Zuerst wurde je 1,6 µl Macsfectin mit 200 µl OptiMEM vermischt und je 400 ng Plasmid DNA mit 200 µl OptiMEM vermischt. Diese Lösungen wurden vereint und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach 20 Minuten wurde die Lösung in das Medium der Zellen gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte das Umsetzen in 6 Well Platten und nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert.

3.1.4 Stabile Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmid-DNA

Bei einer transienten Transfektion wurde die eingebrachte DNA nach einigen Tagen abgebaut, oder aus den Zellen geschleust. Damit eine langfristige Expression des Proteins erzielt werden konnte war es notwendig, dass HEK293T-Zellen positiv mit Zeozin (100 µg/ml) selektiert wurden.

3.1.5 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert und die Trypsin-vermittelte Zelldissoziation danach mit Kulturmedium abgestoppt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten. Danach wurde das überschüssige Medium abgesaugt und auf das entstandene Zellpellet wurde ca. 1,5 ml FCS, welches mit 10 % DMSO versetzt wurde, gegeben. Diese Suspension wurde im nächsten Schritt in Cryoröhrchen überführt und bei -150°C eingefroren.

Wenn eingefrorene Zellen benötigt wurden, wurden diese wie nachstehend aufgeführt aufgetaut. Zuerst wurden die Zellen angetaut und anschließend in 15 ml Falconröhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten. Die Zellen wurden so als Pellet abzentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit dem benötigten Kulturmedium resuspendiert und in T25-Zellkulturflaschen überführt.

3.1.6 Anfärbung von Lysosomen

Lysosomen lassen sich mit Hilfe bestimmter Farbstoffe sichtbar machen. Hierzu wurden HEK293T-Zellen auf, mit Poly-L-Lysin behandelten, Deckgläschen kultiviert. Hierzu wurde je ein Deckgläschen in ein Well einer 12 Well Platte gegeben und dieses mit 1 ml Poly-L-Lysin für ca. 30 Sekunden beschichtet. Danach wurde das Deckgläschen aus der Lösung genommen und getrocknet. Anschließend wurden die Deckgläschen zusammen mit dem nötigen Nährmedium in eine 12 Well Platte gegeben und darauf die HEK293T Zellen ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 80% erfolgte die Färbung.

Für die Markierung von sauren Zellorganellen kann ein LysoTracker-Farbstoff verwendet werden. Der 5,5 µM LysoTracker-Farbstoff wurde für 30 Minuten auf die lebenden Zellen gegeben und zusammen mit 250 µl frischem Kulturmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als nächstes erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit 1x PBS und eine Fixierung mit 4 %-igem PFA für 10 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte nach kurzem Eintauchen der Deckgläschen in

destilliertem Wasser die Einbettung und gleichzeitige Färbung der Zellkerne mit DAPI mittels RotiMount Fluor Care mit DAPI auf Objektträger.

Die Auswertung erfolgte am Laser-Scanningmikroskop. Hierbei wurden Bilder mit verschiedenen Wellenlängen angefertigt. Die verwendeten Wellenlängen waren:

Anregung 633 nm (rot, LysoTracker Emission 647 nm), Anregung 405 nm (blau, DAPI Emission 457 nm).

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1 Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese benötigt zwei Primer, jeweils einen in *forward* und *reverse* Richtung, diese beinhalten beide die gleiche Basensubstitution, die zu einem Aminosäureaustausch führt. Zur Mutagenese wurde die cDNA des AGA Wildtyps (Banning et al. 2016) benötigt und eine Langzyklus-PCR durchgeführt. Verwendet wurden ein 50 µl Ansatz mit 40,5 µl DEPC H₂O, 0,5 µl Plasmid DNA (1000 ng/µl), 5 µl 10 x PCR Puffer, 1 µl Primer fwd (10 µM), 1 µl Primer rev (10 µM), 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Pfu-Turbo Polymerase. Nach einer einmaligen Denaturierung der Template-DNA bei 98°C erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für eine Minute, gefolgt von einem Hybridisierungsschritt bei 65°C für eine Minute und dem Syntheseschritt bei 68°C für 12 Minuten. Dieser Zyklus wurde 19-mal wiederholt.

3.2.2 DNA-Fällung

Die DNA-Fällung dient dem Aufreinigen und Konzentrieren der DNA. Hierzu wurde zum gesamten PCR-Ansatz (50 µl) zuerst 5 µl 3 M Natriumacetatlösung hinzugegeben und dies durch vortexen gut vermischt. Anschließend wurden 110 µl Ethanol 100% hinzugegeben und erneut gut vermischt. Nach einer Fällung bei -20°C für 30 Minuten erfolgte eine zehnmündige Zentrifugation bei 4°C und 15000 rpm. Der Überstand wurde abpipettiert und anschließend 200 µl Ethanol 70% hinzugegeben. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm für 5 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das entstandene Pellet wurde für ungefähr 15 Minuten kopfüber getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mit 22,5 µl DEPC Wasser versetzt und gut gelöst

3.2.3 Restriktionsverdau

Die aufgereinigte DNA aus der Mutagenese wurde im nächsten Schritt mithilfe von 2,5 µl 10x CutSmart-Puffer und 1 µl DpnI über eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend kam es durch eine Erhöhung der Temperatur auf 80°C zur Hitzeinaktivierung des Enzyms und zum Abstoppen des Verdauens. Bei diesem Verdau wurde speziell die methylierte DNA abgebaut. Somit wurde die ursprüngliche Plasmid-DNA abgebaut und das mutierte, in der PCR amplifizierte Plasmid blieb erhalten.

3.2.4 Transformation

Zu Beginn der Transformation wurden 100 µl der kompetenten E. coli Zellen zusammen mit 10 µl des Restriktionsverdauens für 30 Minuten auf Eis gemischt. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei einer Temperatur von 42°C. Anschließend erfolgte wiederum eine Lagerung auf Eis für 2 Minuten. Nun wurde zu dem Transformationsansatz 500 µl SOC Medium hinzugegeben. Diese Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der transformierten Bakterien auf antibiotikahaltige Agarplatten und eine Inkubation über Nacht bei 37°C.

3.2.5 Plasmidpräparation (Mini)

Es wurden Einzelkolonien von den jeweiligen Agarplatten gepickt und in 15 ml Röhren mit je 5 ml LB-Medium und Ampicillin (250 µg/ml) versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator.

Am nächsten Tag erfolgte eine Isolation der Plasmid-DNA. Hierzu wurde das Qiaprep Spin Miniprep Kit verwendet. Als erstes wurden 2 ml der Bakteriensuspension in je 2 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen.

Anschließend wurden auf die Zellpellets 250 µl Resuspensionspuffer (P1 = enthält 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) gegeben und diese resuspendiert bis keine Klumpen mehr sichtbar waren. Danach wurden 250 µl Lysepuffer (P2 = enthält 200 mM Natriumacetat, 1% SDS) hinzugefügt, und diese Lösung wurde vorsichtig durch sechsmaliges Umdrehen der Eppendorfgefäße vermischt.

Als nächstes wurde 350 µl Neutralisationspuffer (N3=enthält 4,2 M Guanidiniumchlorid, 0,9 M Kaliumacetat pH 4,8) hinzugegeben, und die Lösung

erneut durch sechsmaliges Umdrehen der EppendorfgeläÙe vermischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten.

800 µl von dem Überstand wurden auf die Qiaprep 2.0 Spinsäule pipettiert und für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, und es wurde 0,5 ml Bindungspuffer (PB= enthält 5 M Guanidinhydrochlorid, 30 % Isopropanol) auf die Säulen gegeben und erneut eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut entfernt und 0,75 ml Waschpuffer (PE = enthält 10 mM Tris-Hydrochlorid pH 7,5, 80 % Ethanol) auf die Säulen gegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation von 1 Minute bei 10000 rpm, gefolgt von einer erneuten einminütigen Zentrifugation bei 10000 rpm nach Entfernen des Überstands, um eine vollständige Entfernung des Waschpuffers zu gewährleisten. Danach wurden die Säulen in neue 1,5 ml EppendorfgeläÙe gesetzt und 50 µl Elutionspuffer (EB = enthält 10 mM Tris-Hydrochlorid, pH 8,5) hinzugefügt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 Minute.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde zum Sequenzieren zu Eurofins Genomics GmbH geschickt, um die Mutagenese durch die Sequenzierungsergebnisse zu bestätigen.

3.2.6 Plasmidpräparation (Midi)

Nach Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese erfolgte zur Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA zuerst eine Übernackkultur. Hierzu wurden 100 ml LB Medium mit Ampicillin (250µg/ml) versetzt und die E. coli Bakterien, welche die Mutation tragen hinzugegeben und bei 37°C und 225 rpm geschüttelt.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA nach dem Protokoll Nucleobond Extra EF plasmid purification der Firma Macherey Nagel.

3.2.7 Zelllysatherstellung aus HEK293T- und HeLa-Zellen

Um die Proteine aus den Zellen extrahieren zu können und weiter zu untersuchen, wurde eine Lyse durchgeführt. Hierbei wurde auf Eis gearbeitet. Zuerst wurden die Wells mit 1 ml PBS gewaschen und dieses danach abgesaugt. Im nächsten Schritt wurde je 200 µl Lysepuffer mit Proteinaseinhibitoren (Verhältnis 1:100) auf die Wells gegeben. Danach wurden die Platten 10 Minuten auf Eis geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und mit Hilfe einer Pipette in 1,5 ml EppendorfgeläÙe überführt. Es erfolgte nach einer zehnminütigen Wartezeit eine Zentrifugation bei 15000 rpm für 10 Minuten bei 4°C, um die unlöslichen

Zellbestandteile zu separieren. Anschließend wurde der Überstand in neue EppendorfgeläÙe überführt.

3.2.8 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Da die Lysate unterschiedliche Proteinkonzentrationen aufwiesen, wurden die genauen Proteinkonzentrationen bestimmt um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Dies erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Absorption von 595 nm. Die Proben wurden meist mit dem Faktor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und jeweils Tripplets mit je 10 µl in eine 96 Well Platte pipettiert und je Well wurde 200 µl Bioradreagenz hinzugeben. Zur Quantifizierung diente eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des Proteins Albumin.

3.2.9 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine binden SDS und erhalten hierdurch eine negative Ladung, die proportional zur molaren Masse ist. Es wurde die Methode nach Lämmli verwendet, bei der die Proben in einem Sammelgel konzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt werden. Die Proteinproben wurden vor dem Beladen auf das Gel mit 4 x Ladepuffer versetzt, welcher auch DTT enthält, und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurde das Sammelgel beladen. Nach dem Beladen wurde bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel gestartet. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel hochgestellt und ungefähr 1 cm bevor die Proben das Ende des Gels erreicht hatten, wurde der Strom abgestellt.

3.2.10 Western Blot

Um die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, erfolgt der eigentliche Western Blot. Hierbei wird ein senkrecht zum Polyacrylamid Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Zum Transfer wurde das Gel zusammen mit der Membran in eine mit 1x Blotsalz gefüllten Blotkammer eingesetzt und eine Stromstärke von 400 mA für 1 Stunde angelegt. Um zu überprüfen, ob der Transfer gut funktioniert hat, wurde die Membran mit Ponceaurot angefärbt, um so die transferierten Proteinbanden sichtbar zu machen.

3.2.11 Immundetektion

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran müssen zuerst freie Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da sonst die verwendeten Antikörper unspezifisch binden und somit kein spezifischer Antigennachweis möglich ist. Dazu wurden die Membranen in eine 5 %-ige Milchlösung in 1 x TBST gelegt und für 30 Minuten geschwenkt. Danach erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers bei 4°C über Nacht in TBST. Nach drei Waschsritten am darauffolgenden Tag mit 1 x TBST jeweils für 10 Minuten, erfolgte die Inkubation des mit HRP gekoppelten sekundären Antikörpers für 1 Stunde. Die Meerrettichperoxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol, und die daraus resultierende Lumineszenz kann detektiert werden.

Danach erfolgten wiederum 3 Waschschriffe mit 1 x TBST jeweils für 10 Minuten. Nach diesen Waschschriffen wurden die Membranen vorsichtig trockengetupft bevor die Peroxidasereaktion mittels ECL-Lösung und je 1 µl 10 %-igen Wasserstoffperoxid je 1 ml ECL gestartet wurde. Diese Lösung wurde nach 2 Minuten durch vorsichtiges Abtupfen entfernt und die Membran danach in eine Röntgenkassette geklebt. Je nachdem wie stark das Signal war, wurde der Film bis zu 10 Minuten in der Kassette belassen.

3.2.12 Strippen

Für weitere Immundetektionen können die bindenden Antikörper durch Strippen der Blots entfernt werden. Hierzu wurden die Membranen für 5 Minuten in 0,1 M NaOH-Lösung gegeben. Nach einem Waschschriff mit destilliertem Wasser und 1x TBST wurden die Membranen erneut so behandelt, wie bei der ersten Immundetektion.

3.2.13 Fluorimetrische AGA-Aktivitätsmessung (Banning et al. 2016; Voznyi YaV et al. 1993)

Die Zellen wurden lysiert und bei -20°C gelagert. Zu Beginn wurden 10 µl Lysat, beziehungsweise 10 µl Lysepuffer als Referenzprobe mit 20 µl Asp-AMC (50 µM in McIlvains Puffer pH 6,5) vermischt und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde 200 µl McIlvains Puffer pH 4,5 hinzugefügt. Danach wurde die Messung durchgeführt. Hierzu wurde eine Anregungswellenlänge von 355 nm verwendet und die Emission bei 460 nm bestimmt. Eine Standardkurve bestehend aus 10 µl AMC mit aufsteigender Konzentration von 0-20 µM AMC, zusammen mit 20 µl Asp-AMC (50 µM in McIlvains Puffer pH 6,5) und 200 µl McIlvain's Puffer pH 4,5 wurde

parallel bestimmt. Es erfolgte die Berechnung der Aktivitäten und die Angabe in μmol umgesetztes Substrat/ μg Protein.

3.3 Statistik

Die Experimente dieser Doktorarbeit wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind jeweils dargestellt.

Statistische Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software (Version 5, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 PCR-Mutagenese von AGA-C179R und AGA-G302R in pcDNA3- und pEXPR-IBA103-Vektoren

In meiner Arbeit wurden zwei AGU-Varianten untersucht. Bei der ersten Variante c.535 T>C, welche im 5. Exon des AGA-Gens lokalisiert ist, führt dies auf Proteinebene zur Substitution von Cystein 179 zu Arginin (C179R). Eine weitere Variante c.904G>A, welche im 8. Exon des AGA-Gens liegt, führt auf Proteinebene zur Aminosäuresubstitution von Glycin 302 zu Arginin (G302R). Um die Auswirkungen der AGU-Varianten zu untersuchen, war es nötig DNA-Konstrukte mit den Varianten herzustellen. Plasmidvektoren pcDNA3 und pEXPR-IBA103 mit dem Wildtyp (WT)-AGA wurden von der AG Tikkanen zur Verfügung gestellt (Banning et al. 2016). Der pExpr-IBA103 Vektor besitzt ein Twin-Strep-Tag, der Vektor pcDNA3 besitzt kein Tag. Die zur Verfügung gestellten Vektoren dienten als Grundlage zur Mutagenese der Punktmutationen. Die gesamte kodierende Sequenz von AGA wurde sequenziert und anhand der Sequenzierungsergebnisse wurde die erfolgreiche Mutagenese bestätigt (

Abbildung 4).

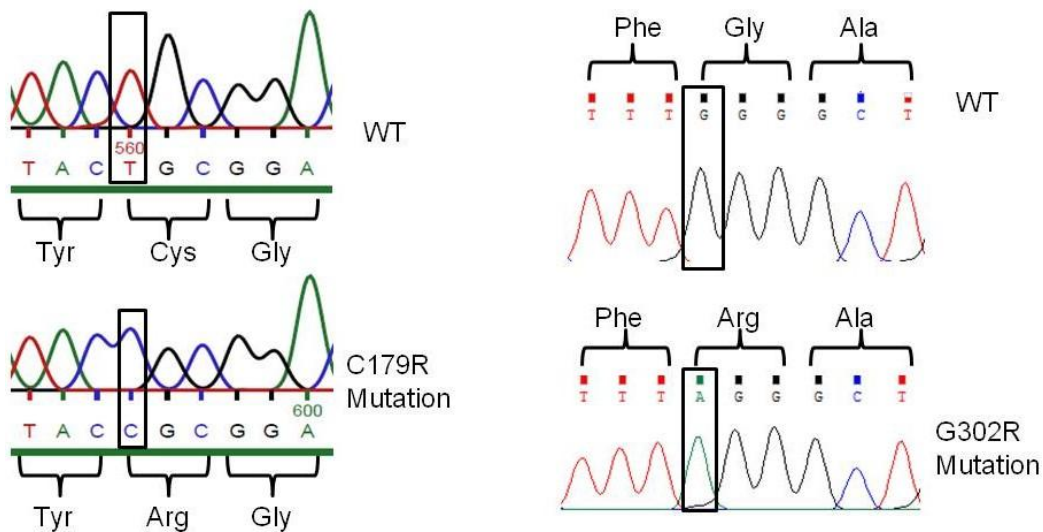


Abbildung 4: DNA-Sequenzen von AGA-WT, AGA-C179R (links) und AGA-G302R Variante (rechts): Bei der C179R Variante ist der Basenaustausch von Thymin zu Cytosin zu sehen (Schwarze Box). Bei der G302R Variante ist der Austausch von Guanin zu Adenin zu sehen.

4.2 Expression von AGA-C179R und AGA-G302R in unterschiedlichen Zellen

4.2.1 Expression von AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 in transient transfizierten HEK293T-Zellen

Zunächst sollten die Auswirkungen der C179R- und G302R-Varianten auf die Prozessierung des AGA-Enzyms untersucht werden, um zu klären, ob und inwieweit die AGA-C179R und die AGA-G302R Vorläufer prozessiert werden. Als Referenz diente AGA-WT. Hierzu wurden die Expressionsplasmide in HeLa und HEK293T-Zellen transfiziert, und die Zellen wurden nach 3 Tagen lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot untersucht. Die Proteine wurden optisch auf einem Röntgenfilm nach Antikörperdetektion dargestellt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH detektiert.

Der Vektor pEXPIR-IBA 103 enthält zusätzlich eine kodierende Sequenz, mit welcher ein Polypeptid an das C-terminale Ende des Vorläufers und der β -Untereinheit gehängt wird. Es gibt einen gezielten Antikörper gegen Strep-tag. In Abbildung 5 ist zu sehen, dass der AGA-Vorläufer aus dem Vektor pEXPR-IBA103 größer ist, als das Vorläuferpeptid ohne Tag, da er den Twin-Strep-Tag am C-Terminus trägt. Zu erwarten wäre das Vorläuferpeptid mit Tag bei 47 kDa. Das gleiche gilt für die β -Untereinheit mit Twin-Strep-Tag, die hier 25 kDa groß ist. Die β '-Untereinheit entsteht durch weitere Prozessierung und durch das Trimmen am C-terminalen Ende geht der Twin-Strep-Tag verloren. Die β '-Untereinheit liegt bei 15 kDa. Bei der Detektion des Twin-Strep-Tags fällt auf, dass der WT prozessiert wird, und ein deutliches Signal bei ungefähr 25 kDa zu sehen ist. Bei AGA-C179R erkennt man ein stärkeres Signal beim Vorläufer mit Twin-Strep-Tag und im Verhältnis ein schwächeres Signal bei der β -Untereinheit, was die Vermutung nahelegt, dass hier eine verminderte Prozessierung stattfindet und der Vorläufer akkumuliert. Bei AGA-G302R zeigt sich keine Prozessierung des AGA-Vorläufers, der im Vergleich zum AG-WT und AGA-C179R nur schwach zu sehen ist.

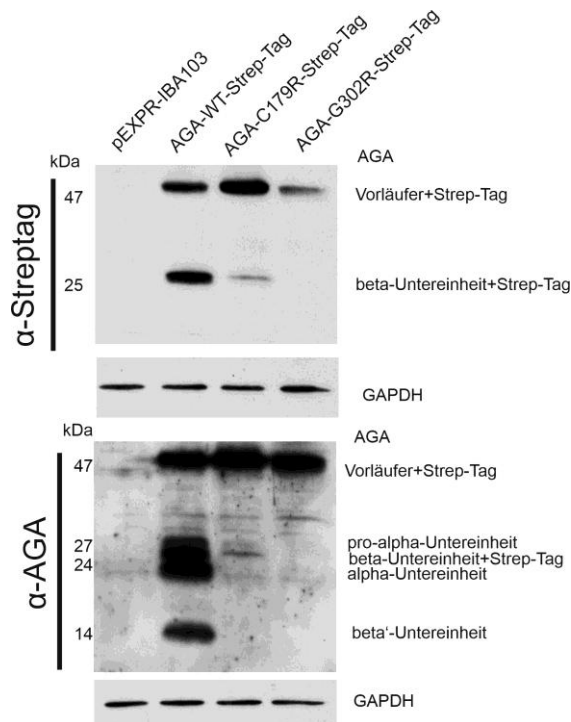


Abbildung 5: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 in HEK293T-Zellen: Es erfolgte die Transfektion der verschiedenen Plasmide in HEK293T-Zellen. Nach 3 Tagen wurden Zellysate hergestellt. Im Anschluss wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen und mittels SDS-PAGE getrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem anti-AGA-Antikörper, anti-Strep-Tag-Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle diente der leere pEXPR-IBA103-Vektor und als Positivkontrolle der AGA-WT-pEXPR-IBA103. Beim Wildtyp-AGA zeigt sich die Prozessierung deutlich. Durch die Transfektion wird viel AGA produziert und somit häuft sich hier auch das Vorläuferpeptid an. In den Western Blots kann mit Hilfe des AGA-Antiserums jedoch nur das transfizierte AGA detektiert werden, da der Antikörper nicht sensitiv genug ist, um endogenes AGA in den Zellen zu detektieren. Bei der Variante C179R zeigt sich im pEXPR-IBA103-Vektor ein deutliches Signal bei 47 kDa und ein schwaches Signal bei 25 kDa. Dies entspricht dem Vorläuferpeptid mit Twin-Strep-Tag und der beta-Untereinheit mit Twin-Strep-Tag. Bei der Variante G302R zeigt sich nur ein schwaches Signal bei 47 kDa, das keine erkennbare Prozessierung aufweist. n=5.

4.2.2 Expression von AGA-C179R-pcDNA3 und AGA-G302R-pcDNA3 in transient transfizierten HEK293T-Zellen

Die erhaltenen DNA-Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transfiziert, und nach Kultivierung wurden Lysate, wie oben beschrieben, hergestellt. Bei dem DNA-Konstrukt ohne Twin-Strep-Tag ist das Vorläuferpeptid bei ca. 42 kDa, die pro- α - Einheit bei ca. 27 kDa, die α -Einheit bei 24 kDa und die β -Einheit bei ca. 17 kDa zu erwarten. Abbildung 6 zeigt, dass bei AGA-C179R keine Prozessierung stattfindet. Bei G302R-pcDNA3 zeigt sich erneut, dass keine Prozessierung stattfindet. Es kann jedoch sein, dass eine sehr geringe Prozessierung, die unter der Nachweisgrenze des Antikörpers liegt, stattfindet.

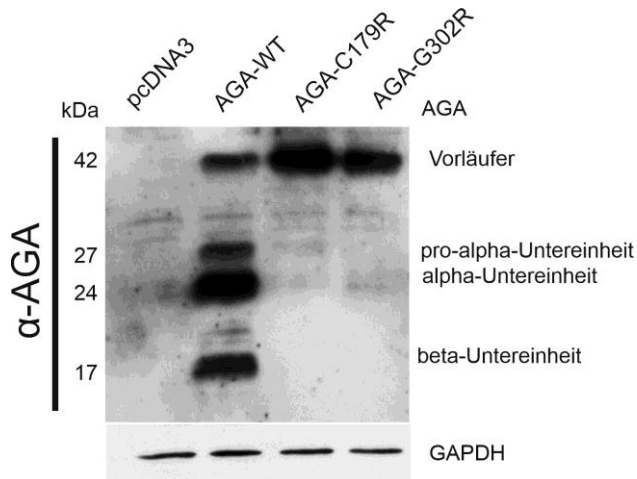


Abbildung 6: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R und AGA-G302R in HEK293T-Zellen: Es erfolgte eine Transfektion der verschiedenen Konstrukte in HEK293T-Zellen und es wurden nach 3 Tagen Lysate hergestellt. Gleiche Mengen der Proteine wurden mittels SDS Page aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem anti-AGA-Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle dient der pcDNA3-Vektor und als Positivkontrolle AGA-WT-pcDNA3. Bei 42 kDa wird hier das Vorläuferpeptid detektiert. Bei 27 kDa liegt die pro- α - Untereinheit und bei 24 kDa die α -Untereinheit. Bei 17 kDa liegt die β -Untereinheit. In der Variante C179R zeigt sich im pcDNA3 Plasmid nur ein Signal bei 42 kDa. Dieses Signal ist jedoch etwas stärker als bei der Variante G302R. n=5.

4.2.3 Expression von AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 in transient transfizierten HeLa-Zellen

Nach Transfektion der DNA-Konstrukte in HEK293T-Zellen erfolgte die Transfektion in HeLa-Zellen. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Art der verwendeten Zellen einen Einfluss auf die Prozessierung des AGA-Enzyms und seiner beiden Varianten hat. Jedoch wurden in HeLa-Zellen ähnliche Ergebnisse, wie in HEK293T-Zellen erzielt (Abbildung 7). Auch hier wird deutlich, dass C179R mit Twin-Strep-Tag teilweise prozessiert wird. Bei G302R mit Twin-Strep-Tag findet keine Prozessierung statt. In HeLa-Zellen zeigt sich deutlicher, dass bei dieser Variante das unprozessierte AGA möglicherweise instabil ist und somit nicht gut detektiert werden kann.

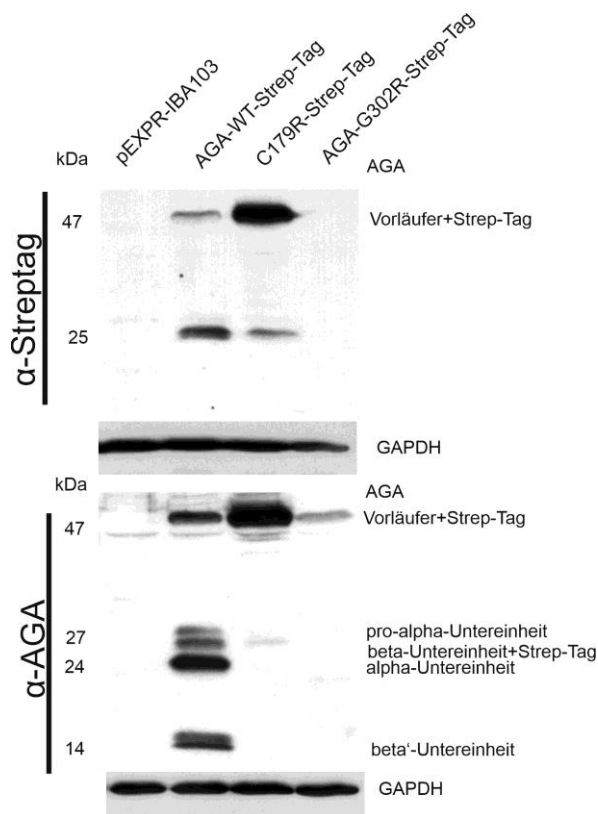


Abbildung 7: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R–Strep-Tag und AGA-G302R-Strep-Tag in HeLa Zellen: Nach Transfektion der DNA-Konstrukte in HeLa-Zellen erfolgte nach 3 Tagen die Zellysatherstellung. Gleiche Mengen der Proteine wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit anti-AGA-Antikörper, anti-Strep-Tag Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle diente der pEXPR-IBA103-Vektor und als Positivkontrolle der AGA-WT-Strep-Tag. Es zeigte sich eine teilweise Prozessierung der C179R Variante, sowie eine fehlende Prozessierung und Vorhandensein des Vorläuferpeptids bei Vorliegen der G302R Variante. n=7.

4.2.4 Expression von AGA-C179R-pcDNA3 und AGA-G302R-pcDNA3 in transient transfizierten HeLa-Zellen

In einem weiteren Versuch erfolgte die Transfektion der beiden AGA-Varianten im pcDNA3-Vektor in HeLa-Zellen. Es erfolgte erneut nach 3 Tagen das Herstellen der Lysate und ein Auftrennen mittels SDS PAGE und zum Schluss die Immundetektion. Auch hier ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Durchführung mit HEK293T-Zellen. Es ist jedoch bei beiden Varianten keine Prozessierung erkennbar (Abbildung 8).

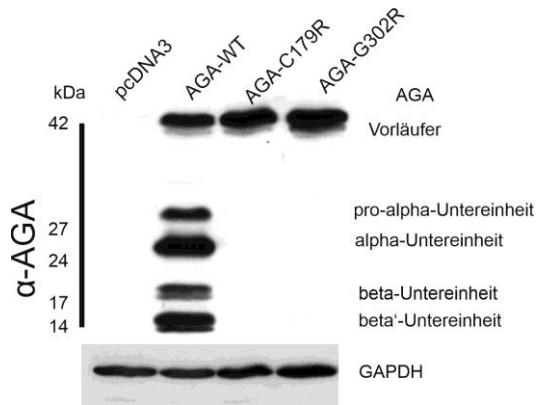


Abbildung 8: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R und AGA-G302R in HeLa Zellen: Es erfolgte die transiente Transfektion der DNA Konstrukte in HeLa-Zellen. Nach 3 Tagen wurden Zellysate hergestellt. Nach Auftrennen mittels SDS PAGE und Western Blot erfolgte die Immundetektion. Die Immundetektion erfolgte mit anti-AGA-Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Als Negativkontrolle wurde hier der pcDNA3-Vektor verwendet und als Positivkontrolle der Wildtyp. Man erkennt die Prozessierung des Wildtypes, während bei den beiden AGA-Varianten keine Prozessierung erkennbar ist. n=7.

4.3 Aktivität der AGA- Varianten C179R und G302R

Nach Herstellung von Lysaten der mit den jeweiligen DNA-Konstrukten transfizierten HeLa- und HEK293T-Zellen wurden diese für die Messungen der enzymatischen AGA-Aktivität mittels fluorimetrischem AGA-Assay vorbereitet. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden in Relation zur Proteinmenge gesetzt. Hierbei entspricht die Aktivität in den mit Leervektoren transfizierten Zellen jeweils der endogenen AGA Aktivität in HeLa- bzw. HEK293T-Zellen.

4.3.1 AGA-Aktivitätsmessung in HEK293T-Zellen

Die Aktivitätsmessung der Lysate zeigt eine Restaktivität der C179R Variante, die über der endogenen AGA-Aktivität der HEK293T-Zellen liegt. Bei dem pEXPR-IBA103-Vektor ist dieser Unterschied zur Aktivität des Leervektors signifikant (Abbildung 9). Im pEXPR-IBA103-Vektor ist die Aktivität 10% (SD 4,7%) und im pcDNA3 Vektor ist die Aktivität 7,8% (SD 2,7%). Die G302R-Variante zeigt keine Restaktivität, da die Aktivität ungefähr auf Niveau der endogenen AGA-Aktivität der HEK293T-Zellen liegt. Die endogene Aktivität ist im pEXPR-IBA103-Vektor 4,8% (SD 2,7%) und im pcDNA3 Vektor 4,6% (SD 1,9%).

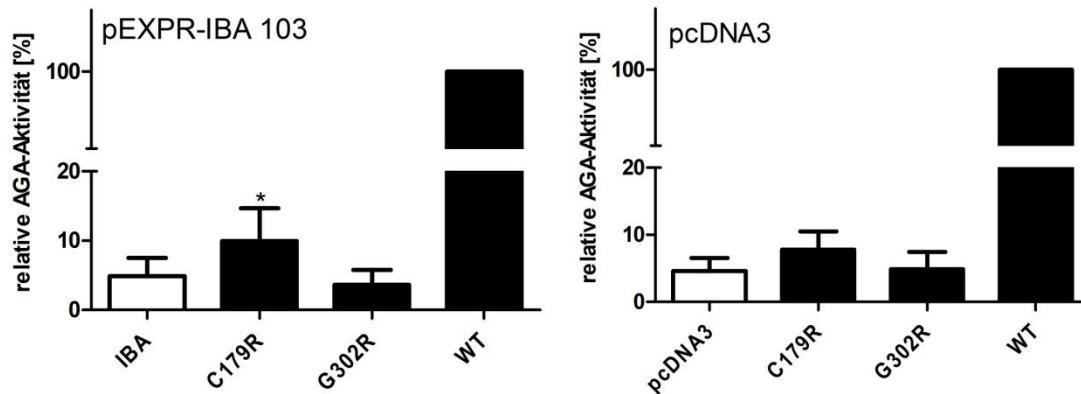


Abbildung 9: Relative AGA-Aktivität in HEK293T-Zellen der untersuchten AGA-Varianten in pEXPR-IBA103 und pcDNA3: Nach Herstellung der Lysate wurde die Messung der Aktivität durchgeführt. Hierzu wurden die Lysate bei 37°C mit Asp-AMC (50 µM in Mcllvains Puffer pH 6,5) inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion erfolgte die fluorimetrische Messung. In den Graphen wurde die Wildtypaktivität jeweils als 100% gesetzt, und beide Varianten wurden mit dem jeweiligen Leervektor verglichen. Es zeigt sich, dass die C179R-Variante in beiden DNA-Konstrukten eine geringe aber messbare Aktivität hat, die oberhalb der endogenen AGA-Aktivität der Zellen liegt. Bei den mit pEXPR-IBA103 transfizierten Proben ist der Unterschied zum Leervektor signifikant (1way ANOVA, * $p < 0,05$). $n=5$.

4.3.2 AGA-Aktivitätsmessungen in HeLa-Zellen

Die Aktivitätsmessungen der Lysate von HeLa-Zellen zeigen ähnliche Ergebnisse, wie in den HEK293T-Zellen (Abbildung 10). Bei der C179R-Variante zeigt sich in beiden Konstrukten eine moderate Restaktivität. Dieser Unterschied in der Aktivität im Vergleich zum Leervektor ist signifikant. Die Aktivität der C179R-Variante ist im pEXPR-IBA103-Vektor 5,9% (SD 4,2%) und im pcDNA3 Vektor 9,6% (SD 8,1%). Bei der G302R Variante zeigt sich in beiden Konstrukten wiederum eine Aktivität, die mit der endogenen Aktivität des Leervektors vergleichbar ist. Die endogene Aktivität ist im pEXPR-IBA103-Vektor 2,4% (SD 1,1%) und im pcDNA3 Vektor 2,5% (SD 1,7%).

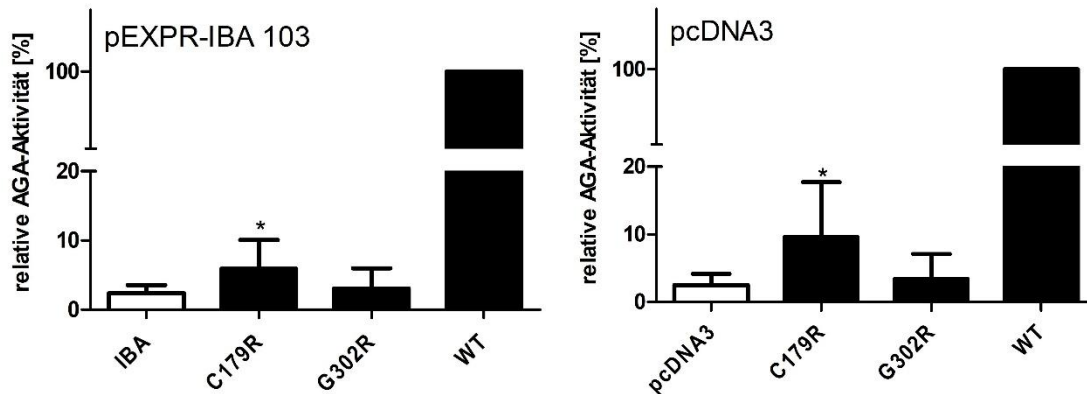


Abbildung 10: Relative AGA-Aktivität in HeLa-Zellen der beiden AGA-Varianten in pEXPR-IBA103 und pcDNA3: Zur Aktivitätsmessung wurden Zellysate hergestellt. Diese wurden mit Asp-AMC (50 μ M in Mcllvains Puffer pH 6,5) bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die fluorimetrische Aktivitätsmessung. Die Aktivität des Wildtyps wurde als 100% gesetzt. Im linken Graphen ist die Aktivität der beiden Varianten im Vektor pEXBR-IBA103 zu sehen. Im rechten Graphen sieht man die Aktivität im pcDNA3-Vektor. Die Aktivitäten der Varianten wurden mit dem Leervektor als Negativkontrolle verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Restaktivität der C179R in beiden Vektoren. Zusätzlich zeigt sich, dass die G302R-Variante keine Aktivität hat, denn diese ist vergleichbar mit der Aktivität des Leervektors, der die endogene AGA-Aktivität in HeLa-Zellen darstellt (1 way ANOVA, * $p < 0,05$). $n = 7$.

4.4 Lokalisation von AGA-C179R und AGA-G302R

Bei der Variante C179R zeigte sich im Western Blot eine teilweise Prozessierung, während die Variante G302R keine nennenswerte Prozessierung aufwies. In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob die Varianten einen Einfluss auf die Struktur der Lysosomen haben. Um die Auswirkungen auf die Lysosomenstruktur genauer zu untersuchen, erfolgte die Anfärbung der Lysosomen in stabil transfizierten HEK293T-Zellen. Als Negativkontrolle wurden AGA-Knockout-Zellen verwendet, welche aus der AG Tikkanen stammen und kein AGA produzieren (Kapahnke et al. 2016). Hierzu wurden die Zellen auf Poly L-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% erfolgte die Anfärbung der Lysosomen mittels LysoTracker. Bei den Zellen ohne AGA-Expression zeigte sich eine Vergrößerung und Verklumpung der Lysosomen. Dies zeigt sich auch in den mit den beiden vorliegenden Varianten transfizierten Zellen (Abbildung 11).

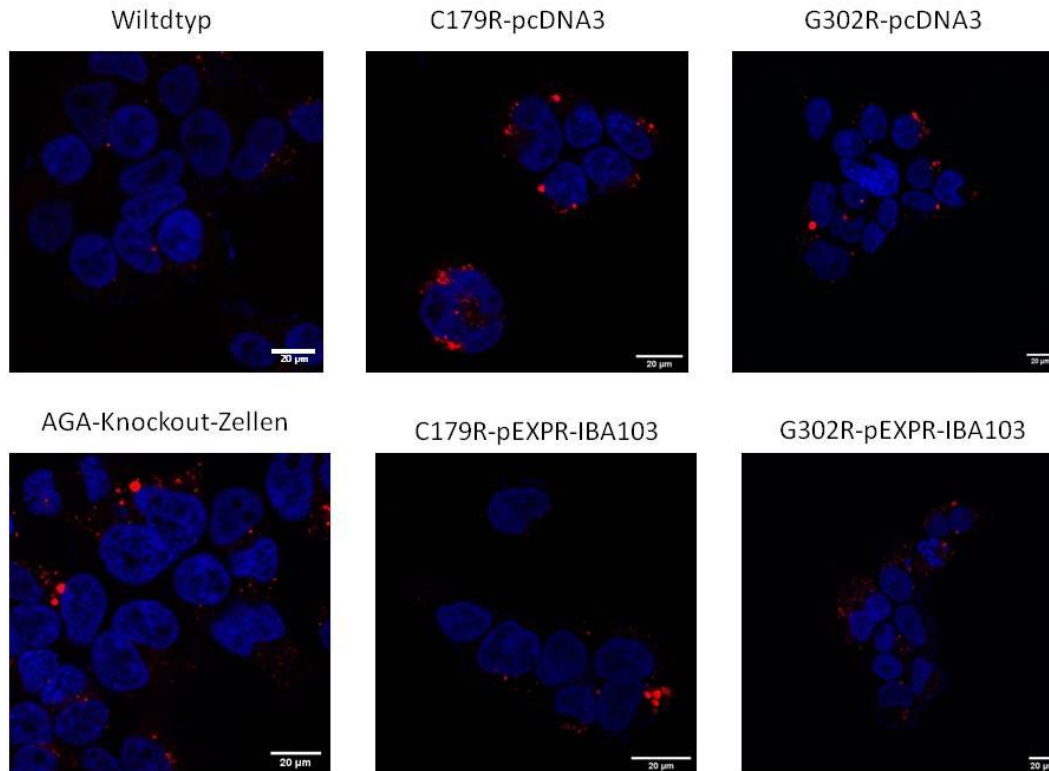


Abbildung 11: Färbungen von Lysosomen in AGA-WT, AGA-Knockout-Zellen, sowie Zellen mit Überexpression der AGA-C179R- und AGA-G302R-Variante in verschiedenen Vektoren: Für die Färbung wurden die HEK293T-Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von ungefähr 80 Prozent erfolgte die Markierung der Lysosomen mittels Lysotracker (rot), welcher saure Organellen anfärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Mit PFA erfolgte anschließend eine Fixierung der Zellen.

4.5 Koexpression von AGA-WT mit den AGA-Varianten C179R und G302R

Um zu untersuchen, ob die Prozessierung der Vorläuferpeptide der Varianten durch die Koexpression von AGA-WT positiv beeinflusst werden kann, wurden mehrere Koexpressionsexperimente durchgeführt. Zwei AGA-Vorläuferpeptide bilden ein Dimer. Dies ist wichtig für die weitere Prozessierung des Enzyms, da nur korrekt gefaltete Vorläuferpeptide prozessiert werden. Dieser Versuch wurde in der AG Tikkanen bereits im Vorfeld bei drei anderen Varianten durchgeführt. Hierbei handelte es sich jeweils um Missense-Varianten $AGU_{\text{Fin-major}}$, T122K und R116W. Es zeigte sich, dass bei den Varianten $AGU_{\text{Fin-major}}$ und T122K eine vermehrte Prozessierung durch Koexpression mit dem AGA-WT stattfand (Banning et al. 2016). Um diesen Effekt bei den von mir charakterisierten Varianten zu untersuchen, erfolgte die Kotransfektion von jeweils 200 ng der Plasmid-DNA einer der beiden Varianten mit 200 ng Plasmid DNA des

AGA-WT oder 200 ng des Leervektors. Hierbei wurden einmal die Varianten mit Twin-Strep-Tag und der Wildtyp ohne Twin-Strep-Tag kotransfiziert und ebenso die Varianten ohne Twin-Strep-Tag und der Wildtyp mit Twin-Strep-Tag. Des Weiteren erfolgte die Expression in HEK293T-Zellen und HeLa-Zellen. Als Negativkontrolle wurden beide Leervektoren, und als Positivkontrolle die AGA-WT-Plasmide mit und ohne Twin-Strep-Tag kotransfiziert.

4.5.1 Expression der Varianten C179R und G302R bei Koexpression von AGA-WT in HEK293T-Zellen

Es wurden jeweils die Varianten mit Twin-Strep-Tag und AGA-WT ohne Twin-Strep-Tag kotransfiziert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend nach Antikörperdetektion auf dem Röntgenfilm optisch dargestellt. Es zeigt sich, dass nach Kotransfektion bei beiden Varianten keine nennenswerte Änderung der Prozessierung auftritt (Abbildung 12). In der Abbildung sieht man die Kotransfektion der getaggten Varianten mit ungetagtem AGA-WT, da man durch Detektion des Twin-Strep-Tags sehen kann, ob sich eine Veränderung der Prozessierung der getaggten AGA-Proteine ergibt. Dies war bei den durchgeführten Versuchen nicht zu beobachten. Hieraus lässt sich schließen, dass es keine Verbesserung der Prozessierung der Varianten durch eine Koexpression mit AGA-WT gibt.

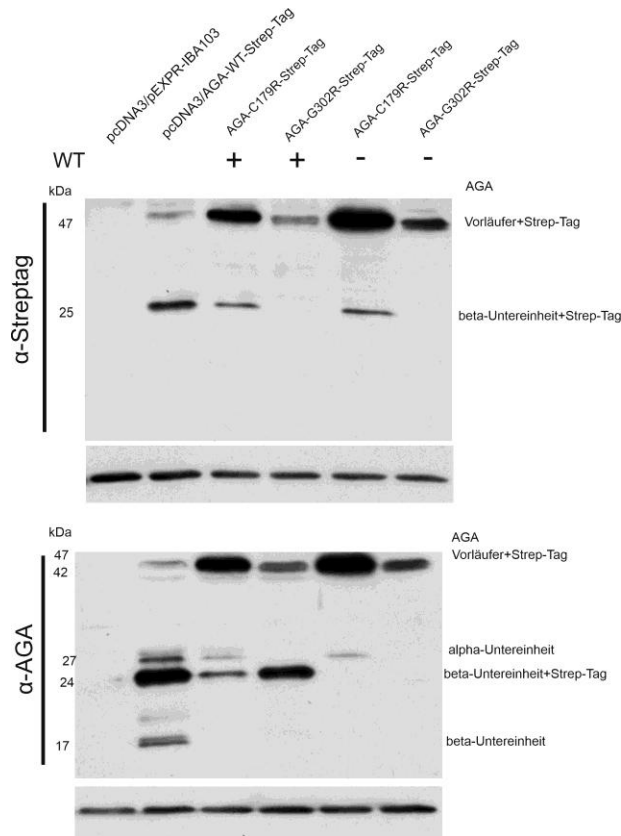


Abbildung 12: Koexpression von AGA-WT mit jeweils einer der AGA-Varianten (C179R oder G302R) in HEK293T-Zellen: Es erfolgte die Kotransfektion der DNA-Konstrukte in HEK293T-Zellen. Nach 3 Tagen wurden Zelllysate hergestellt. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Western Blot erfolgte die Immundetektion mit anti-AGA-Antikörper, anti-Strep-Tag Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Hier wird die Prozessierung mit und ohne Koexpression von AGA-WT-pcDNA3 mit AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 gezeigt, jeweils mit der Detektion des Twin-Strep-Tag (oben) und von AGA (unten). n=3.

4.5.2 AGA-Aktivitätsmessung bei Koexpression des Wildtyps in HEK293T-Zellen

Nach Herstellen von Lysaten der jeweiligen kotransfizierten Zellen wurden diese für die fluorimetrische AGA-Aktivitätsmessung vorbereitet. Die AGA-Aktivität wurde erneut in Relation zur Proteinmenge gesetzt. Bei der Koexpression mit dem Wildtyp zeigt sich keine nennenswerte Änderung der AGA-Enzymaktivität von beiden Varianten (Abbildung 13). Wir nehmen an, dass die Aktivität des AGA-WT bei Kotransfektion mit 50% der Aktivität des reinen Wildtyps gleichzusetzen ist, da wir die halbe Menge der Plasmid DNA des Wildtyps transfiziert haben. Beide Varianten haben eine relative Aktivität, die ungefähr bei 50% des Wildtyps liegt. Es zeigt sich kein sprunghafter Anstieg der Aktivität bei Koexpression von AGA-WT. Die Abweichungen um die 50% können aus nicht immer exakt gleich aufgenommenener transfizierter DNA resultieren.

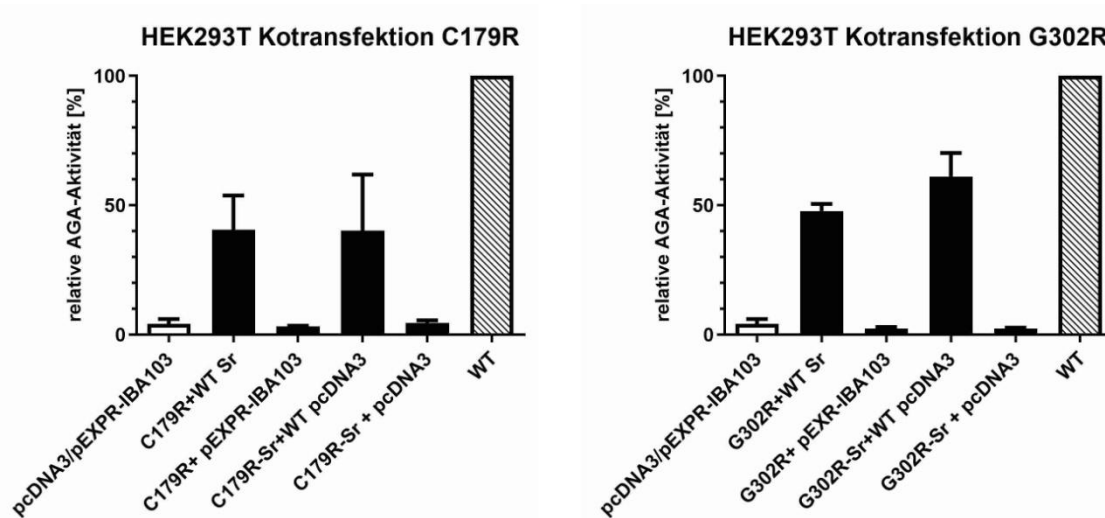


Abbildung 13: relative Aktivität der Koexpression beider Varianten (C179R und G302R) mit AGA-WT in HEK293T-Zellen: Nach Herstellung der Zellysate wurde die Messung der AGA-Aktivität durchgeführt. Hierzu wurden die Lysate bei 37°C mit Asp-AMC inkubiert. Die fluorimetrische Messung erfolgte nach dem Stoppen der Reaktion. Es wurden jeweils beide Leervektoren als Negativkontrolle kotransfiziert und beide WT DNA-Konstrukte als Referenz. Links ist die Aktivität von der C179R-Variante gezeigt und rechts die Aktivität der G302R Variante. n=3.

4.5.3 Expression der Varianten C179R und G302R bei Koexpression mit AGA-WT in HeLa-Zellen

Hier wurden, genau wie in den HEK293T-Zellen, die AGA Varianten mit Twin-Strep-Tag und AGA-WT ohne Twin-Strep-Tag mit einer Gesamtmenge von 400 ng Plasmid-DNA kotransfiziert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Antikörperdetektion auf Röntgenfilmen optisch dargestellt (Abbildung 14). Auch hier zeigte sich kein positiver Effekt auf die Prozessierung nach Koexpression von AGA-WT. Dies ist ersichtlich, da kein verstärktes Signal in den verschiedenen Untereinheiten zu sehen ist. Am besten wäre dies ersichtlich durch ein verstärktes Signal der β -Untereinheit mit Twin-Strep-Tag. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den in HEK293T-Zellen durchgeführten Versuchen (Abbildung 12).

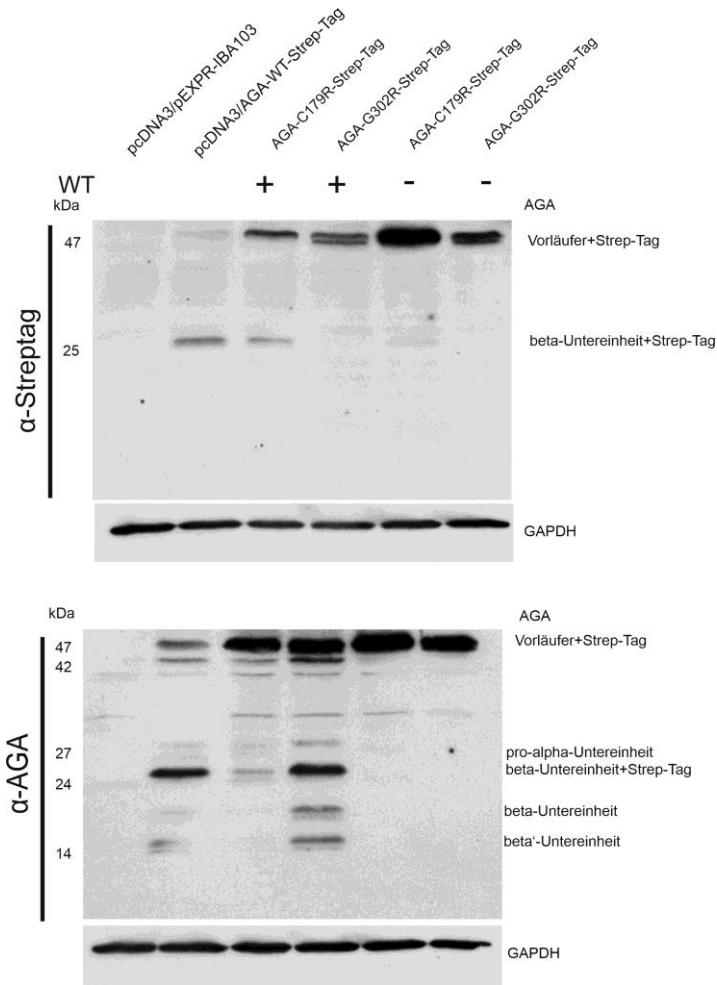


Abbildung 14: Koexpression von AGA-WT mit jeweils einer der AGA-Varianten (C179R oder G302R) in HeLa-Zellen: Es erfolgte eine Kotransfektion der verschiedenen Konstrukte in HeLa-Zellen, und es wurden nach 3 Tagen Lysate hergestellt. Gleiche Mengen der Proteine wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte nach Westernblot mit anti-AGA Antikörper, anti-Strep-Tag Antikörper sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Hier wird die Expression mit und ohne Koexpression von AGA-WT-pcDNA3 mit AGA-C179R-pEXPRIBA103 und AGA-G203R-pEXPR-IBA103 gezeigt, jeweils mit der Detektion des Twin-Strep-Tags (oben) und von AGA (unten). n=5.

4.5.4 AGA Aktivitätsmessung bei Koexpression des Wildtyps in HeLa-Zellen

Nach der Herstellung von Lysaten wurde die Aktivität mittels fluorimetrischer AGA-Aktivitätsmessung bestimmt. Auch in HeLa-Zellen zeigte sich, ähnlich wie in HEK293T-Zellen, keine nennenswerte Aktivitätsänderung bei Koexpression mit dem Wildtyp. Als Referenz wurden die beiden AGA-WT-Konstrukte kotransfiziert und diese Aktivität als 100% angesehen. Es zeigte sich, dass bei Koexpression der Varianten mit den AGA-WT-Konstrukten die Aktivität in etwa bei 50% liegt und somit keine relevante Steigerung der relativen Aktivität durch Koexpression erreicht werden kann (Abbildung 15).

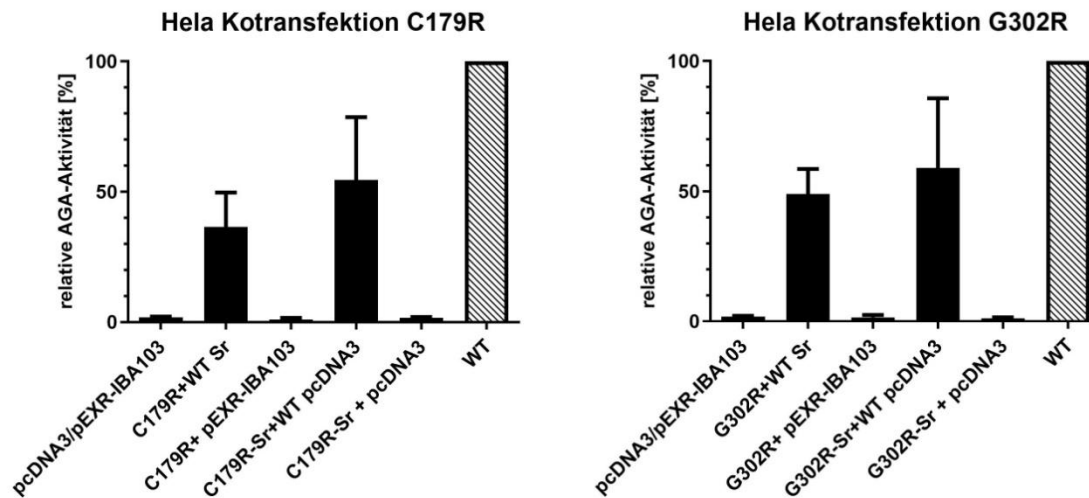


Abbildung 15: relative Aktivität der Koexpression beider Varianten und AGA-WT in HeLa-Zellen: Nach Herstellung der Zelllysate wurde die Messung der Aktivität durchgeführt. Hierzu wurden die Lysate bei 37°C mit Asp-AMC für 24 Stunden inkubiert. Die fluorimetrische Messung erfolgte nach dem Stoppen der Reaktion. Es wurden jeweils beide Leervektoren als Negativkontrolle kotransfiziert und beide WT DNA-Konstrukte kombiniert als Referenz. Links ist die Aktivität von der C179R-Variante gezeigt, und rechts die Aktivität der G302R Variante. n=5.

4.6 Chaperonbehandlung von stabil transfizierten HEK293T-Zellen

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Chaperone, hierunter vor allem Betain, zur Steigerung der Aktivität und Verbesserung der Prozessierung von verschiedenen Varianten beitragen können (Banning et al. 2016). Um die Auswirkung von Chaperonen auf die Expression und Aktivität der Varianten zu untersuchen war es nötig, stabil transfizierte Zellen herzustellen. Die vorherigen Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, welche eine endogene AGA-Aktivität besitzen. HEK293T-Zellen, die kein endogenes AGA exprimieren, waren in der AG Tikkanen zu diesem Zeitpunkt der Arbeit verfügbar. In diese Zellen wurde neben der jeweiligen Plasmid-DNA der beiden AGA-Varianten ein Konstrukt transfiziert, das eine Zeocinresistenz generiert. Mit einem Zeocin- Selektionsmedium wurden die Zellen ungefähr 2 Wochen selektiert und standen danach weiteren Versuchen zur Verfügung.

4.6.1 Expression der C179R-Variante nach Behandlung mit Chaperonen

Nach Behandlung der Zellen mit 10 mM Betain oder Glycin für 24 Stunden wurden Lysate der stabil transfizierten Zellen hergestellt. Diese wurden mittels SDS PAGE

aufgetrennt und anschließend nach Antikörperdetektion optisch auf Röntgenfilmen dargestellt. In den Western Blots ist kein positiver Effekt der Substanzen erkennbar, da es zu keiner verbesserten Prozessierung kommt.

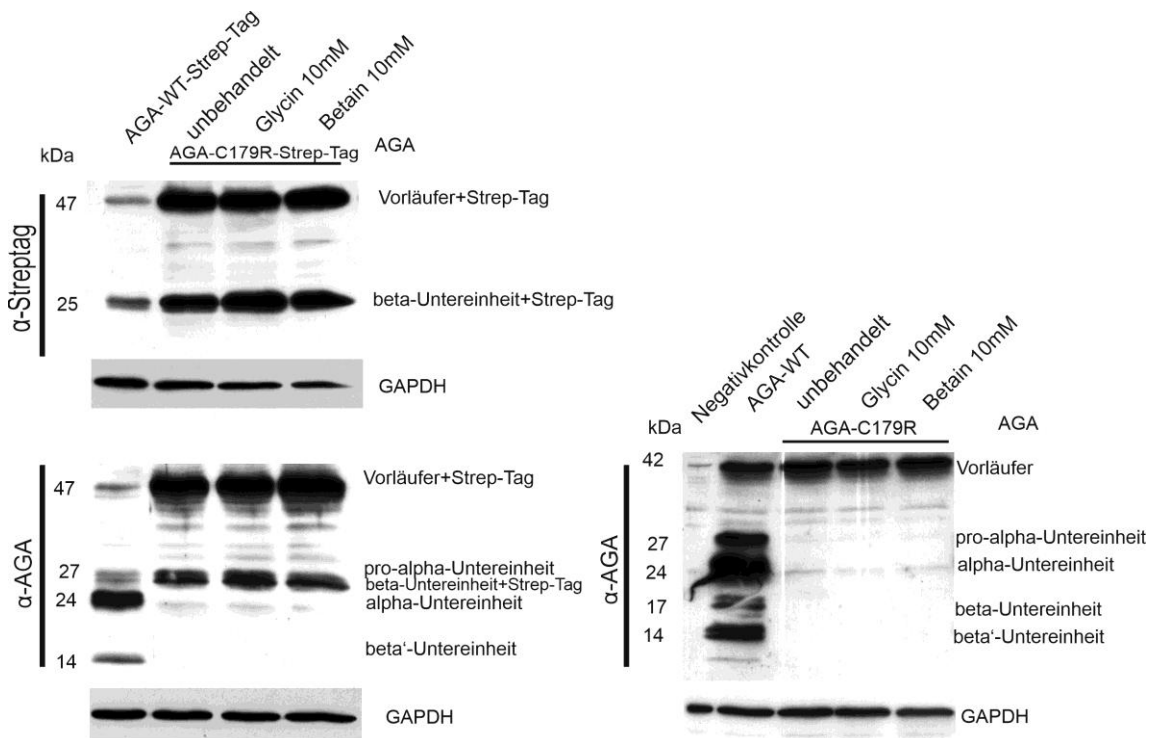


Abbildung 16: Western Blot der C179R Variante in stabil transfizierten HEK293T-Zellen behandelt mit Glycin 10 mM oder Betain 10 mM: Es erfolgte die Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Zellen mit Glycin (10 mM) oder Betain (10 mM). Nach 24 Stunden wurden Zelllysate hergestellt. Im Anschluss wurden gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE getrennt. Die Immundetektion erfolgte mit anti-AGA Antikörper, anti-Strep-Tag Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Links ist die Behandlung AGA Variante C179R (mit Twin-Strep-Tag) gezeigt, als Positivkontrolle wurden Zellen mit Wildtyp-Überexpression verwendet. Durch einen Belichtungsartefakt erscheint rechts im Western Blot bei der Detektion mit anti-AGA vertikale Linien, obwohl alle Spuren aus der gleichen Belichtung stammen. n=3.

4.6.2 AGA-Aktivität der C179R-Variante nach Behandlung mit Chaperonen

Um die mögliche Änderung der AGA-Aktivität mit und ohne Chaperonbehandlung zu untersuchen, wurde eine AGA-Aktivitätsmessung durchgeführt. Nach Behandlung mit Betain oder Glycin wurden Lysate hergestellt und eine fluorimetrische Aktivitätsmessung durchgeführt, die in Bezug zur Proteinmenge gesetzt wurde. Es zeigt sich, dass bei der Behandlung mit 10 mM Glycin eine moderate, statistisch signifikante Aktivitätssteigerung erreicht werden konnte. In Abbildung 17 wurde die Aktivität der unbehandelten stabil transfizierten Zellen, die die C179R-Variante exprimieren, als

100% gesetzt. Es zeigt sich, dass die Behandlung mit Betain keinen positiven Effekt zu haben scheint, dass jedoch die Behandlung mit Glycin zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung führt. Dieser Effekt ist im pcDNA3 Konstrukt sogar noch deutlicher zu sehen.

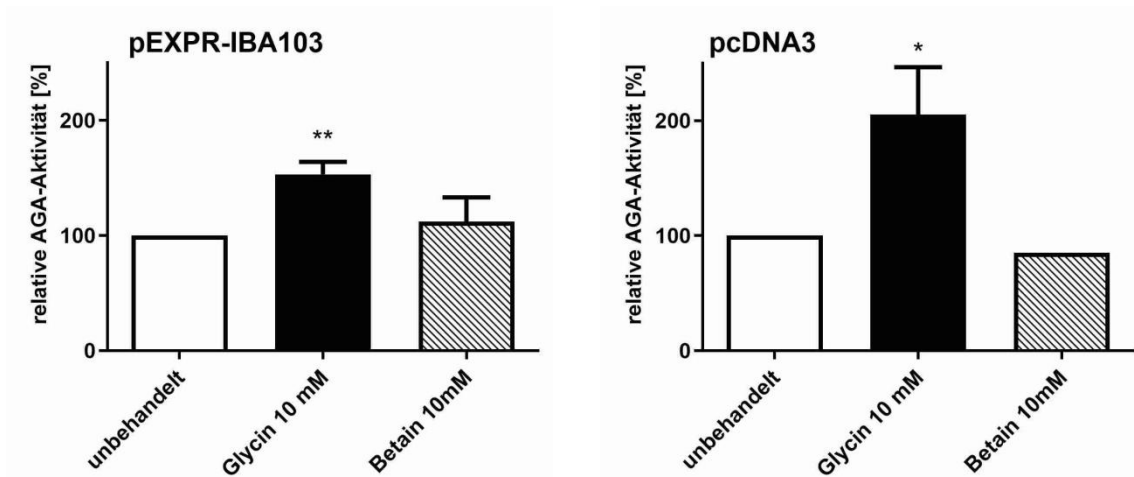


Abbildung 17: AGA-Aktivität der C179R-Variante nach Chaperonbehandlung: Es erfolgte eine Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Zellen mit Glycin (10 mM) oder Betain (10 mM). Nach 24 Stunden Behandlung erfolgte die Herstellung der Lysate. Im Anschluss erfolgte die Messung der AGA-Aktivität. Hierzu wurden die Lysate bei 37°C für 24 Stunden mit Asp-AMC inkubiert. Die fluorimetrische Messung erfolgte nach dem Stoppen der Reaktion. Die unbehandelte Variante ist in beiden Graphen als Referenz mit 100% dargestellt. Links zeigt sich die hochsignifikante Erhöhung der Aktivität der C179R-Variante im Vektor mit Twin-Strep-Tag bei Behandlung mit Glycin. Rechts zeigt sich die signifikante Erhöhung der AGA-Aktivität bei n=3 der C179R-Variante im Vektor ohne Tag bei Behandlung mit Glycin (1way ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.6.3 Expression der G302R-Variante nach Behandlung mit Chaperonen

Nach einer 24-stündigen Behandlung der G302R-Variante exprimierenden Zellen mit Glycin (10 mM) oder Betain (10 mM) wurden Lysate hergestellt. Diese wurden anschließend mittels Western Blot analysiert. Es zeigt sich, dass es durch die Chaperonbehandlung zu keiner Verbesserung der Prozessierung kommt.

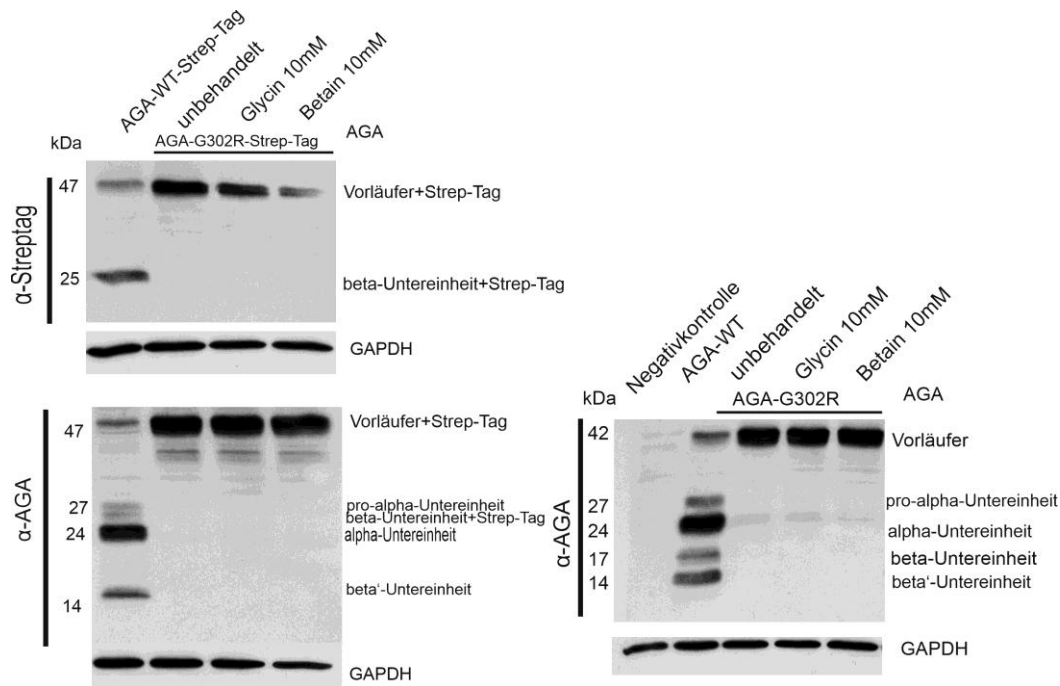


Abbildung 18: Western Blot von G302R-Variante in stabil transfizierten HEK293T-Zellen behandelt mit Glycin (10 mM) oder Betain(10 mM): Nach der 24-stündigen Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Zellen mit Glycin (10 mM) oder Betain (10 mM) erfolgte die Herstellung von Zelllysaten. Es erfolgte eine Auftrennung der Lysate mittels SDS-PAGE. Nach dem Western-Blot erfolgte eine Immundetektion mittels anti-AGA-Antikörper, anti-Strep-Tag-Antikörper, sowie anti-GAPDH als Ladekontrolle. Links ist die G302R-Variante mit Twin-Strep-Tag gezeigt, rechts ist die AGA- G302R-Variante im Vektor ohne Twin-Strep-Tag. Es zeigt sich, dass eine Behandlung mit Glycin oder Betain zu keiner Verbesserung der Prozessierung führt. n=4.

4.6.4 Aktivität der G302R Variante nach Behandlung mit Chaperonen

Nach Behandlung mit Chaperonen wurden Lysate hergestellt und diese zur Aktivitätsmessung verwendet. Die Aktivität der unbehandelten Zellen, welche die G302R-Variante enthalten, wurde auf 100% gesetzt. Die Aktivität der G302R-Variante ist jedoch sehr gering. Somit kam es zu einer großen Streuung und zur scheinbaren, aber nicht-signifikanten Aktivitätssteigerung der G302R-Variante im pcDNA3 bei der Behandlung mit Glycin (Abbildung 19).

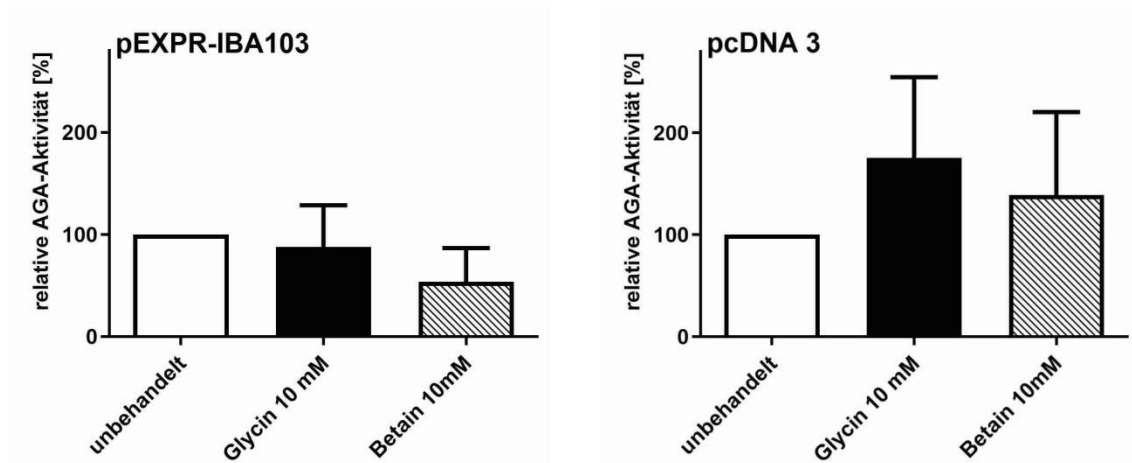


Abbildung 19: relative AGA-Aktivität der G302R-Variante nach Behandlung mit Glycin (10 mM) oder Betain (10 mM): Es erfolgte eine Behandlung mit Glycin (10mM) oder Betain (10mM) der stabil transfizierten HEK293T-Zellen. Nach 24 Stunden erfolgte die Herstellung der Lysate. Diese Lysate wurden im Anschluss 24 Stunden bei 37°C mit Asp-AMC inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion erfolgte die fluorimetrische Aktivitätsmessung. Die unbehandelte Variante ist in beiden Graphen als Referenz mit 100% dargestellt. Links zeigt sich keine signifikante Steigerung der Aktivität der G302R-Variante im pEXPR-IBA103-Vektor. Im rechten Graphen zeigt sich eine scheinbare, nicht signifikante Steigerung der Aktivität nach der Behandlung mit Glycin, bedingt durch die geringe Restaktivität der Variante im pcDNA3 Vektor bei n=4.

5 Diskussion

Aspartylglucosaminurie ist eine lysosomale Speicherkrankheit, welche autosomal rezessiv vererbt wird und gehäuft in der finnischen Bevölkerung auftritt. Bei den krankheitsverursachenden Varianten im AGA-Gen handelt es sich häufig um Punktmutationen. Die verschiedenen Varianten haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Prozessierung und Aktivität der AGA, so dass die Patienten unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung aufweisen können. Allgemein kommt es bei fehlender Aktivität der AGA zur Anreicherung von Glykoasparagin im Gewebe und Körperflüssigkeiten und somit zu einer fortschreitenden geistigen und körperlichen Behinderung der Erkrankten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei potentiell pathogene AGA-Varianten genauer untersucht. Es zeigte sich, dass die Variante C179R noch eine geringe Restaktivität hat und teilweise eine Prozessierung in die, für die Enzymaktivität essentiellen, Proteinuntereinheiten stattfindet. Im Gegensatz zur Variante C179R hat die Variante G302R keine nennenswerte Restaktivität und wird nicht prozessiert. Mit dieser Charakterisierung kann ein besseres Verständnis der Pathogenität dieser Varianten erreicht werden. Bei Patienten mit homozygoter G302R-Variante wären bei bloßer Betrachtung der enzymatischen Restaktivität demzufolge möglicherweise schwerwiegendere Symptome zu erwarten, als bei Patienten mit homozygoter C179R-Variante. Jedoch gibt es hierzu keine vergleichenden Patientendaten. In der Arbeit konnte des Weiteren die Auswirkung der Varianten auf die Struktur der Lysosomen gezeigt werden.

5.1 Gegenüberstellung der AGA C179R-Variante mit bekannten Varianten

In der vorliegenden Arbeit konnte AGA-C179R erfolgreich in zwei verschiedene Plasmide kloniert werden. Die AGA Punktmutation C179R bedingt, dass statt Cystein ein Arginin in der α -Kette liegt. Wichtig ist dieser Austausch vor allem im Hinblick auf die fehlende Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cystein 179 und Cystein 163. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass eine AGA-Variante, die an Position 163 ein Serin statt eines Cysteins enthält, ursächlich für einen frühen Prozessierungsfehler ist. Diese Variante wird als AGU_{Fin-major} beschrieben. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass es

auch bei Austausch von Cystein 179 gegen Serin zu einer deutlich reduzierten Enzymaktivität kommt. Eine Störung der C-terminalen Disulfidbrücke in der α Untereinheit führt zu einer fehlenden Stabilisierung einer Loop-Struktur außerhalb des aktiven Zentrums (Riikonen et al. 1996). Strukturell sind die Aminosäuren C163 und C179 nicht Teil des katalytischen Zentrums. Im Gegensatz zur AGU_{Fin-major}-Variante zeigte die Variante C179R eine höhere Restaktivität, was andeutet, dass auch ohne Ausbildung einer Disulfidbrücke von C179, ein gewisses Maß an katalytisch aktivem Enzym gebildet werden kann.

Es zeigte sich in den durchgeführten Versuchen, dass zumindest ein kleiner Teil des C179R-mutierten AGA-Enzyms in seine Untereinheiten prozessiert wird. Im Vergleich zum Wildtyp-AGA sieht man zwar eine größere Menge des Vorläuferpeptids, jedoch zeigt sich bei dieser Variante auch ein geringes Signal bei der β -Untereinheit im Expressionsplasmid pEXBR-IBA103, sowohl bei der Detektion des Twin-Strep-Tags als auch der Detektion von AGA. Im Expressionsplasmid pcDNA3 gelang die Detektion der β -Untereinheit nicht, jedoch zeigt sich hier erneut das Vorliegen des stabilen Vorläuferpeptids, das ein stärkeres Signal zeigt, als das Wildtyp-Enzym. In den Versuchen zur AGA-Aktivität zeigt sich bei beiden Plasmiden eine Aktivität, die oberhalb des Leervektors und somit oberhalb der endogenen AGA-Aktivität lag. Die Aktivitätssteigerung war jedoch mit dem Expressionsplasmid pEXPR-IBA103 deutlicher, als mit dem pcDNA3-Vektor. Somit stellt sich die Frage, ob die Verwendung des Twin-Strep-Tags einen positiven Einfluss auf die Konformation der AGA-Variante hat und zur Stabilisierung der β -Untereinheit beiträgt.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass nicht nur die fehlende Ausbildung der Disulfidbrücke einen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität des mutierten Enzyms hat, sondern dass auch die neue Aminosäure eine Rolle spielt. Bei AGU_{Fin} wurde Cystein 163 gegen Serin ausgetauscht, welche beide strukturell verwandt sind. In der C179R-Variante wurde Cystein durch Arginin ersetzt. Diese beiden Aminosäuren unterscheiden sich in ihrer Größe und Ladung und haben somit gegebenenfalls einen anderen Einfluss auf die Faltung des Enzyms in dieser Variante. In Abbildung 20 werden sowohl der AGA-WT und die AGA-Variante mit Hilfe von HOPE im Vergleich dargestellt (Stenson et al. 2014).

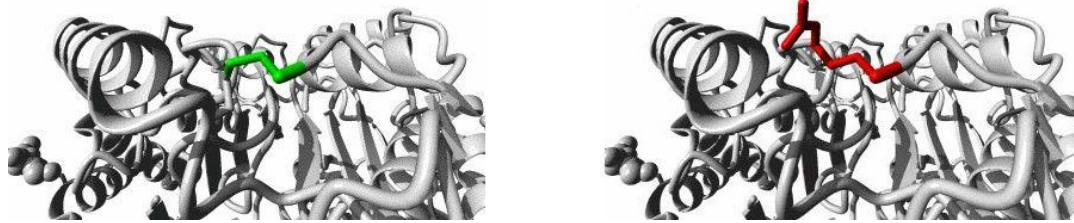


Abbildung 20: Proteinstruktur von AGA im Wildtyp (links) und der Variante C179R: Auf der linken Seite sieht man in grün die Seitenkette des Cysteins im Wildtyp und auf der rechten Seite in rot die Seitenkette von Arginin bei der Variante C179R.

5.2 Gegenüberstellung AGA G302R-Variante mit bekannten Varianten

Die Variante G302R wurde bereits in früheren Studien mit Patientenfibroblasten eines türkischen Patienten untersucht. Hier wird beschrieben, dass die Eltern im verwandschaftlichen Verhältnis als Cousins standen. Die geringe AGA-Restaktivität in den Patientenfibroblasten lag bei ungefähr 7%. Diese Restaktivität liegt höher, als die der G302R Variante in den von mir durchgeführten Versuchen, jedoch wurden auch andere Methoden zur Aktivitätsmessung angewandt. Die G302R Mutation sitzt im Kern des Moleküls auf der beta-Untereinheit, hat somit einen großen Einfluss auf die tetramere Struktur und resultiert in einer geringen Restaktivität (Ikonen et al. 1991a). Der Austausch von Glycin durch Arginin bewirkt einen deutlichen Unterschied in der Größe der verschiedenen Seitenketten (s. Abbildung 21).

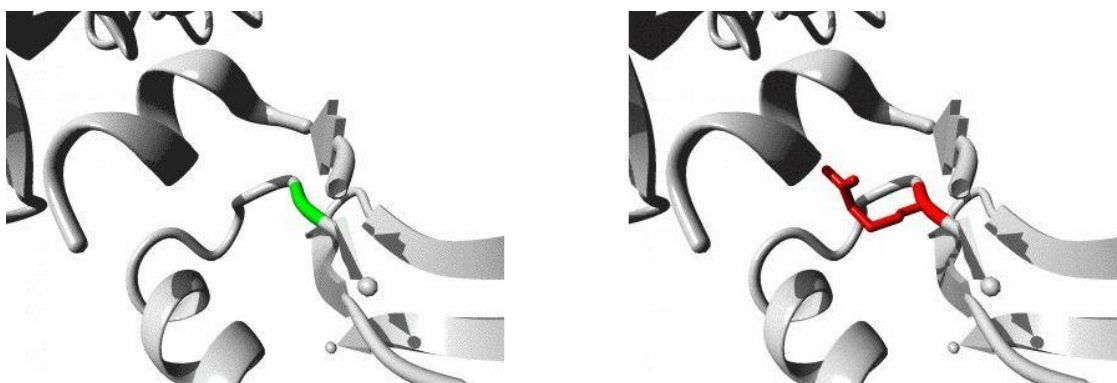


Abbildung 21: Proteinstruktur von AGA im Wildtyp (links) und der Variante G302R Auf der linken Seite sieht man in grün das Glycin des Wildtyps, auf der rechten Seite in rot das Arginin. Durch die graphische Darstellung werden vor allem die unterschiedlichen Größen der Seitenketten gut ersichtlich.

In den Western Blots ist ersichtlich, dass in beiden Plasmiden keine Prozessierung der Enzym-Variante stattfindet. Wenn man die Menge des Vorläuferpeptides betrachtet, ist diese bei der G302R-Variante geringer als bei der C179R-Variante. Dies lässt den Schluss zu, dass die G302R-Variante instabil ist und abgebaut wird. Die AGA-Aktivität der G302R-Variante ist vergleichbar mit der Aktivität des Leervektors. Bei dieser Variante hat der Twin-Strep-Tag keinen nennenswerten Einfluss auf Expression oder Aktivität.

Auch die am Universitätsklinikum Gießen behandelten Patienten mit AGU mit der Variante G302R sind türkischer Herkunft. Dieses gehäufte Auftreten der Erkrankung in Personen türkischer Herkunft legt die Vermutung nahe, dass auch in der Türkei eine Häufung der Erkrankung vorliegen könnte. In Bevölkerungsgruppen, bei denen gehäuft Konsanguinität auftritt, zeigt sich ein deutlich erhöhtes Risiko für das Auftreten von hereditären Erkrankungen. In Studien konnte gezeigt werden, dass es bei erhöhter Konsanguinität zu einer vermehrten Homozygotie im ganzen Genom kommt (Carothers et al. 2006). Hier stehen wir vor dem Problem, dass es für viele Teile der Welt keine Patientendaten gibt, da es kein einheitliches Patientenregister gibt. Des Weiteren gibt es zurzeit noch kein Screening für die AGU, da es aktuell keine kausale Therapie der Erkrankung gibt. Wäre es eines Tages möglich die Erkrankung zu behandeln, wäre eine Möglichkeit zum Screening wünschenswert.

5.3 Bekannte Therapieansätze bei Aspartylglucosaminurie

Es gibt keinen kurativen Therapieansatz für die AGU-Erkrankung. In den 1990er Jahren erhielten Patienten eine Knochenmarkstransplantation. Hier zeigte sich jedoch keine nennenswerte Besserung der Krankheitssymptome, verbunden mit vielen Nebenwirkungen (Arvio et al. 2001). Des Weiteren gibt es neue Ansätze bezüglich der Gentherapie. In AGA-Knockoutmäusen konnte gezeigt werden, dass mittels Adenovirus-vermittelter Gentherapie eine AGA-Substratreduktion um 50% erreicht werden konnte (Virta et al. 2006). Neue Ergebnisse unter Verwendung des rekombinanten adenoassoziierten viralen Vektor Typ 9 (AAV9) zeigen im Mausmodell gute Ergebnisse: Der Vektor zeigte sich als gute Möglichkeit, Gene in das ZNS zu transportieren, nach intravenöser Gabe im Mausmodell konnte die AGA-Aktivität gesteigert werden und es zeigten sich keinen nennenswerten Nebenwirkungen (Chen et al. 2021).

Auch eine Enzymersatztherapie ist denkbar, jedoch zeigen sich hier Probleme. Es ist eine lebenslange Therapie erforderlich. Bei peripherer Gabe des Enzyms kann das

Enzym nicht zentral wirken, wenn die Bluthirnschranke nicht überwunden wird. Außerdem gibt es auch Probleme in der ausreichenden Herstellung der Enzymmenge. Bei langjährigem Enzymersatz kann es des Weiteren zu einer immunologischen Antwort und somit einer verringerten Wirkung kommen (Dunder et al. 2000; Dunder et al. 2010).

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von pharmakologischen Chaperonen (siehe Kapitel 1.3.5), die durch Bindung an das Zielprotein wirken und den Faltungsvorgang unterstützen können. Eine unspezifische Bindung von Chaperonen an Enzyme tritt meistens bei einer Konzentration, größer als 100 μM , auf. Pharmakologische Chaperone zeigen schon bei Konzentrationen von kleiner als 10 μM ihre Wirkung (Fan et al. 1999). Pharmakologische Chaperone helfen Enzymen, die durch Mutationen eine andere Struktur haben, beim richtigen Falten und schützen somit vor einem proteolytischen Abbau (Lieberman et al. 2009). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass manche pharmakologische Chaperone die Bluthirnschranke überwinden können (Suzuki et al. 2007). Durch pharmakologische Chaperone kann meistens keine Enzymaktivitätssteigerung erzielt werden, die mit der Aktivität bei völlig gesunden Menschen vergleichbar ist. Es zeigt sich jedoch, dass selbst eine geringe Steigerung der Aktivität einen positiven Einfluss auf die Pathogenität hat und somit zu einer Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten beiträgt (Schueler et al. 2004). Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Therapien ist, dass pharmakologische Chaperone in oraler Form verabreicht werden können und in der Regel wenige Nebenwirkungen haben. Dennoch gibt es bis jetzt noch keine ausreichenden Daten über die genaue intrazelluläre Wirkung von Chaperonen. Vor allem interessant sind die Auswirkungen bei Patienten mit anderen lysosomalen Speicherkrankheiten, die nicht mehr ausreichend von den etablierten Therapien, beispielsweise einer Enzymersatztherapie, profitieren (Istaiti et al. 2023). Für Morbus Fabry, eine weitere lysosomale Speicherkrankheit, gibt es, abhängig von der vorliegenden Mutation, mit Migalastat eine Therapie mit Chaperonen (Weidemann et al. 2022). Des Weiteren zeigt sich beispielsweise Ambroxol als wirksames Chaperon in der Behandlung von Morbus Gaucher, einer anderen lysosomalen Speicherkrankheit, bei der es zu Störungen im Lipidstoffwechsel kommt (Maegawa u. a. 2009).

5.4 Behandlung der AGA Varianten C179R und G302R mit Glycin und Betain

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Glycin und Betain als pharmakologische Chaperone untersucht. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Glycin bei der Faltung der AGA-Varianten T122K und AGU_{Fin} helfen kann und somit die Aktivität steigert (Banning et al. 2016). In meiner Arbeit konnte bei der Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Klone der AGA Variante C179R mit Glycin eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität gezeigt werden. In den Western-Blots konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Glycin einen leicht positiven Effekt auf die Prozessierung hat. Es bleibt jedoch unklar, welche Rolle Glycin in der Chaperontherapie haben kann, da es letztlich auch ein Inhibitor des AGA Enzyms ist (Risley et al. 2001).

Betain dient unter anderem als Stabilisator von Proteinstrukturen, wenn Zellen osmotischem Stress ausgesetzt sind (Bruździak et al. 2013). Außerdem spielt Betain eine wichtige Rolle in katabolen Prozessen im Kohlenstoff-Stoffwechsel als Methylgruppendonator, welcher eine Rolle für die DNA Reparaturmechanismen spielt (Finkelstein et al. 1983). Es führt zur generellen Verbesserung der zellulären Stabilität (Dragolovich 1994). Betain weist jedoch auch strukturelle Ähnlichkeiten mit Glycin auf und kann somit bei AGU als pharmakologisches Chaperon wirken. Betain als Medikament findet schon eine klinische Verwendung zur Behandlung der Homocystinurie (Schiff 2012). Bei Patienten mit AGU_{Fin} wurde eine klinische Studie mit Cystadane® (=Betain) (EudraCT number 2017-000645-48) durchgeführt. Bei den in meiner Arbeit untersuchten Varianten zeigte sich jedoch kein positiver Einfluss auf die Enzymaktivität nach Behandlung mit Betain. Bei der Behandlung der stabil transfizierten HEK293T-Klone der Variante G302R mit Glycin und Betain konnte keine Steigerung der Enzymaktivität gezeigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass Mutationen in der β -Kette gegebenenfalls zu einer größeren Konformationsänderung führen und somit eine größere Schädigung des Enzyms mit sich bringen. Beide Chaperone eignen sich somit nicht zur Therapie dieser Variante.

5.5 Einfluss der Kotransfektion von AGA Wildtyp in die AGA Varianten C179R und G302R

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Voraussetzung, für die Prozessierung des AGA-Enzyms, eine Dimerisierung von zwei Vorläuferpeptiden ist.

Es gibt Mutationen, die diese Dimerisierung verhindern (Saarela et al. 2001). Deshalb sollte die Auswirkung der Koexpression mit dem Wildtyp und den in meiner Arbeit untersuchten Varianten näher betrachtet werden. Es stellte sich die Frage, ob eine Steigerung der allgemeinen Aktivität des Enzyms auch durch einen positiven Einfluss auf die Konformation der Varianten erreicht werden kann. Diese Versuche basieren auf der Erkenntnis, dass AGU letztlich eine Erkrankung der Proteinfaltung ist, denn es zeigt sich meistens ein Phänotyp aufgrund von lokalen Konformationsänderungen im AGA-Polypeptid. Nur wenige AGU-Varianten haben einen direkten Einfluss auf das aktive Zentrum. Um die Prozessierung zu analysieren, sind die Versuche mit dem Wildtyp im pcDNA3 Vektor und den beiden Varianten im pEXPR-IBA103 Vektor gut zu verwerten. Anhand der Ergebnisse dieses Versuchs sieht man, dass in beiden Varianten keine nennenswerte Änderung der Prozessierung stattfindet. Es zeigt sich jedoch ein vermehrtes Vorliegen des Vorläuferpeptids bei beiden Varianten. Somit trägt die Kotransfektion gegebenenfalls zur Stabilisierung der Vorläuferpeptide bei. Um die Aktivität zu vergleichen, wurde in den Versuchen die Aktivität der Zellen mit Koexpression von AGA Wildtyp in pEXPR-IBA 103 und pcDNA3 als 100% gesetzt. Bei den Aktivitätsmessungen der Kotransfektion mit dem Wildtyp nehmen wir an, dass die Aktivität des Wildtyps mit 50% des reinen Wildtyps gleichzusetzen ist. Wenn man davon ausgeht, dass somit die Aktivität bei der Koexpression mit den Varianten bei einem positiven Einfluss über 50% liegen muss, zeigt sich kein positiver Einfluss der Kotransfektion. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Kotransfektion mit AGA Wildtyp somit nicht zu einer Verbesserung beiträgt.

5.6 Fazit

Ziele der Arbeit waren zum einen die Charakterisierung von zwei Missense-Varianten des AGA-Enzyms und zum anderen sollte ein möglicher Effekt von pharmakologischen Chaperonen auf beide AGA-Varianten untersucht werden.

Bei der Charakterisierung der Missense-Varianten zeigte sich, dass die Variante G302R einen größeren negativen Einfluss auf die Prozessierung und eine reduzierte Enzym-Aktivität hat, als die Variante C179R. Beide Varianten liegen nicht im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Variante G302R liegt auf der β -Kette und hat möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Prozessierung und Aktivität des mutierten Enzyms.

Ziele einer Therapie von AGU sollten eine bessere Prozessierung des AGA-Vorläuferpeptids, sowie eine Steigerung der AGA-Aktivität sein. Bei der Behandlung mit Chape-

ronen (Betain oder Glycin) konnte ein positiver Effekt von Glycin auf die Variante C179R bei Prozessierung und Enzym-Aktivität gezeigt werden. Somit lässt sich ein positiver Nutzen für die Patienten vermuten. Letzlich stellt sich somit die Frage, ob die Verwendung von Glycin bei diesen Patienten einen therapeutischen Nutzen haben könnte. Bei der Verwendung von Betain konnte dagegen keine nennenswerte Aktivitätssteigerung erzielt werden. Ebenso zeigten sich die beiden verwendeten Chaperone ohne nennenswerte Steigerung der Enzymaktivität bei der Variante G302R. Somit lässt sich bei dieser Variante kein therapeutischer Nutzen der beiden untersuchten Chaperone vermuten.

5.7 Ausblick

Als nächster Schritt sollten Patientenfibroblasten der beiden Missense-Varianten untersucht werden. Hierbei können Western-Blots und Messungen der AGA Enzymaktivität durchgeführt werden. Mit Immunfluoreszenzfärbungen könnten genauere Charakterisierungen der Lysosomen und der Lokalisation des AGA-Enzyms untersucht werden. Dies wurde nach Abschluss meiner Arbeit gemacht. Hier zeigte sich keine Steigerung der Enzymaktivität durch die pharmakologischen Chaperone Glycin und Betain. Jedoch zeigte sich hier eine Differenz der Enzymaktivität bei einem männlichen Patienten der Variante C179R im Vergleich zu einer weiblichen Patientin. Hieraus ergibt sich die Frage, ob auch das Geschlecht auch eine Rolle bei AGU spielt.

Im Hinblick auf mögliche Therapieoptionen wurden in dieser Arbeit zwei pharmakologische Chaperone genauer untersucht. In Zukunft könnten mehrere andere Chaperone auf ihre mögliche Wirksamkeit untersucht werden. Gerade im Hinblick auf einen positiven Effekt von Glycin auf die C179R Variante könnte eine genauere Spezifikation erfolgen. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Konzentrationen aus einer anderen Veröffentlichung übernommen. Ein Wirkungsoptimum könnte bei Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen bestimmt werden.

6 Zusammenfassung

Aspartylglucosaminidase (AGA) ist eine lysosomale Hydrolase, welche für die letzten Schritte des Abbaus von N-glykosylierten Proteinen verantwortlich ist. Sie katalysiert die Spaltung des Asparagins von N-Acetylglukosamin-Bindungen nach dem Abbau der Polypeptidkette. AGA wird als Vorläuferpeptid synthetisiert und im endoplasmatischen Retikulum in Untereinheiten gespalten. Die Aspartylglucosaminurie (AGU) ist eine Erkrankung, die durch die fehlende Aktivität des AGA-Enzyms gekennzeichnet ist. Die Erkrankung tritt gehäuft in der finnischen Bevölkerung auf. Die Erkrankten werden phänotypisch gesund geboren, doch bereits im Kindesalter kommt es zur Verzögerung der Entwicklung. Bislang sind mehr als 30 verschiedene krankheitsverursachende AGA-Genvarianten bekannt, wobei die meisten Missense-Mutationen sind.

Die Ziele meiner Arbeit waren die Charakterisierung von zwei pathogenen AGA-Varianten. Die AGA-Variante Cys179Arg wurde bei einem italienischen Geschwisterpaar diagnostiziert, während die AGA-Variante Gly302Arg bei Patienten türkischer Herkunft nachgewiesen wurde. Hierzu habe ich die beiden Varianten in Expressionsplasmide kloniert und die Expression, Prozessierung und Aktivität der Enzymvarianten untersucht. Hierbei wurde bewiesen, dass bei der Variante C179R die Prozessierung zu einem geringen Anteil stattfindet. Die entstehende Enzymvariante zeigt eine geringe, aber messbare Restaktivität. Bei der Variante G302R findet keine Prozessierung statt, und es zeigt sich keine Restaktivität. Des Weiteren habe ich die Auswirkung einer Kotransfektion von AGA-Wildtyp mit jeweils einer der beiden AGA-Varianten untersucht. Hierbei kam es bei keiner der Varianten zu einer Stabilisierung der Vorläuferpeptide oder zur Verbesserung der Prozessierung.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von zwei pharmakologischen Chaperonen auf die Prozessierung und Aktivität der beiden AGA-Enzymvarianten zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Glycin einen positiven Einfluss auf die Prozessierung und Aktivität der C179R-Variante hat. Es konnte jedoch kein nennenswerter Einfluss von Betain gezeigt werden. Ebenso zeigte sich bei einer Behandlung mit Chaperonen kein positiver Einfluss auf die Prozessierung und Aktivität der G302R-Variante. Somit wäre denkbar, dass Glycin als mögliches Therapeutikum für die AGU-Variante C179R in Frage kommt, der Wirkungsgrad der verschiedenen Chaperone jedoch stark abhängig von den einzelnen Varianten ist.

7 Summary

Aspartylglucosaminidase (AGA) is a lysosomal hydrolase responsible for the final steps in the degradation of N-glycosylated proteins. It catalyzes the cleavage of asparagine from N-acetylglucosamine after degradation of the polypeptide chain. AGA is synthesized as a precursor peptide and cleaved into subunits in the endoplasmic reticulum. Aspartylglucosaminuria (AGU) is a disease characterized by the lack of activity of the AGA enzyme. The disease occurs frequently in the Finnish population. Patients are born phenotypically healthy, but developmental delay occurs in childhood. So far, more than 30 different disease-causing AGA gene variants are known, most of them being missense mutations.

This study aimed at characterizing two pathogenic AGA variants. The AGA variant Cys179Arg was diagnosed in an Italian sibling pair. The AGA variant Gly302Arg was detected in patients of Turkish origin. I cloned the two variants into expression plasmids and investigated the expression, processing and activity of the enzyme variants. I showed that the C179R variant is processed to a small extent. This enzyme variant shows a low but measurable residual AGA activity. No processing takes place with the G302R variant and there is no residual AGA activity. Furthermore, I investigated the effect of cotransfection of AGA wildtype with each of the two variants. There was no stabilization of the precursor peptides or improvement in processing. A further aim of this study was to investigate the effects of two pharmacological chaperones on the processing and activity of the two enzyme variants. It was shown that treatment with glycine has a positive influence on the processing and activity of the C179R variant. However, no significant influence could be shown after treatment with betaine. Treatment with neither of the two chaperones showed any positive influence on the processing and activity of the G302R variant. Therefore, it can be concluded that glycine could be a possible therapeutic agent for the AGU variant C179R, but that the efficiency of the various chaperones is highly dependent on the individual variants.

8 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AGA	Aspartylglukosaminidase
AGU	Aspartylglukosaminurie
AGU-Fin-major	AGA-Doppelmutation
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
Asp-AMC	L-Aspartic acid β -(7- amido-4-methyl- coumarin)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C179R	AGA-Variante
cDNA	komplementäre DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DpnI	Restriktionsenzym
DTT	Dithiotheritol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	Endosomal sorting Complex Required for Transport
EudraCT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials, Register für klinische Studien
FCS	Fetales Kälberserum
fwd	forward
G302R	AGA Variante
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
GC	Guanin Cytosin
GlcNAc	N-Acetylglucosaminy
GT/ AG	Guanin-Thymin/ Adenin-Guanin
HCl	Salzsäure
HEK/ HEK293T	humane, embryonale Nierenzellen
HeLa	Henrietta Lacks, Zervixkarzinom-Zellen
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
LB	Luria/Miller

MEM	Minimum Essential Medium
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR46	46 kDa großer Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPR300	300 kDa großer Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
N-Terminus	Amino-Terminus
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Salzoptimiertes Medium mit Glucose
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	nicht-translatierte Region
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transport von neu hergestellten löslichen lysosomalen Proteinen über den Mannose-6-Phosphat Weg, modifiziert nach (Coutinho et al. 2012)	3
Abbildung 2: Strukturen des humanen AGA-Gens und – Proteins, modifiziert nach (Aronson 1999)	5
Abbildung 3: Prozessierung von AGA, abgewandelt nach (Ikonen et al. 1993)	6
Abbildung 4: DNA-Sequenzen von AGA-WT, AGA-C179R (links) und AGA-G302R Variante (rechts)	29
Abbildung 5: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 in HEK293T-Zellen	31
Abbildung 6: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R-pcDNA3 und AGA-G302R-pcDNA3 in HEK293T-Zellen	32
Abbildung 7: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R-pEXPR-IBA103 und AGA-G302R-pEXPR-IBA103 in HeLa Zellen	33
Abbildung 8: Western Blot von AGA-WT, AGA-C179R-pcDNA3 und AGA-G302R-pcDNA3 in HeLa Zellen	34
Abbildung 9: Relative AGA-Aktivität in HEK293T-Zellen der untersuchten AGA-Varianten in pEXPR-IBA103 und pcDNA3	35
Abbildung 10: Relative AGA-Aktivität in HeLa-Zellen der beiden AGA-Varianten in pEXPR-IBA103 und pcDNA3	36
Abbildung 11: Färbungen von Lysosomen in AGA-WT, AGA-Knockout-Zellen, sowie Zellen mit Überexpression der AGA-C179R- und AGA-G302R-Variante in verschiedenen Vektoren	37
Abbildung 12: Koexpression von AGA-WT mit jeweils einer der AGA-Varianten (C179R oder G302R) in HEK293T-Zellen	39
Abbildung 13: relative Aktivität der Koexpression beider Varianten (C179R und G302R) mit AGA-WT in HEK293T-Zellen	40
Abbildung 14: Koexpression von AGA-WT mit jeweils einer der AGA-Varianten (C179R oder G302R) in HeLa-Zellen	41
Abbildung 15: relative Aktivität der Koexpression beider Varianten und AGA-WT in HeLa-Zellen	42
Abbildung 16: Western Blot der C179R Variante in stabil transfizierten HEK293T-Zellen behandelt mit Glycin 10 mM oder Betain 10 mM	43
Abbildung 17: AGA-Aktivität der C179R-Variante nach Chaperonbehandlung	44

Abbildung 18: Western Blot von G302R-Variante in stabil transfizierten HEK293T-Zellen behandelt mit Glycin (10 mM) oder Betain(10 mM)	45
Abbildung 19: relative AGA-Aktivität der G302R-Variante nach Behandlung mit Glycin (10 mM) oder Betain (10 mM)	46
Abbildung 20: Proteinstruktur von AGA im Wildtyp (links) und der Variante C179R	49
Abbildung 21: Proteinstruktur von AGA im Wildtyp (links) und der Variante G302R	49

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung	12
Tabelle 2:	Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen mit dem jeweiligen Hersteller und dessen Niederlassung	14
Tabelle 3:	Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung	15
Tabelle 4:	Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen und deren Hersteller	17
Tabelle 5:	Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primärantikörper, den jeweiligen Verdünnungen und deren Hersteller	18
Tabelle 6:	Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller	18
Tabelle 7:	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	18
Tabelle 8:	Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Hersteller	19
Tabelle 9:	Auflistung der in der Doktorarbeit verwendeten Primer und ihrer Sequenzen, sowie deren Punktmutation unterstrichen	19
Tabelle 10:	Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien und des Bakterienstamms sowie deren Hersteller	20

11 Literaturverzeichnis

- Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K. und Öllinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 5, 214–226.
- Arakawa, T., Ejima, D., Kita, Y. und Tsumoto, K. (2006). Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1677–1687.
- Aronson, N. N. (1999). Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochim Biophys Acta* 1455, 139–154.
- Arvio, M. A., Peippo, M. M., Arvio, P. J. und Kääriäinen, H. A. (2004). Dysmorphic facial features in aspartylglucosaminuria patients and carriers. *Clin Dysmorphol* 13, 11–15.
- Arvio, M., Autio, S. und Louhiala, P. (1993a). Early clinical symptoms and incidence of aspartylglucosaminuria in Finland. *Acta Paediatr* 82, 587–589.
- Arvio, M., Laiho, K., Kauppi, M., Peippo, M., Leino, P., Kautiainen, H., Kaipainen-Seppänen, O. und Mononen, I. (2002). Carriers of the aspartylglucosaminuria genetic mutation and chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 61, 180–181.
- Arvio, M., Oksanen, V., Autio, S., Gaily, E. und Sainio, K. (1993b). Epileptic seizures in aspartylglucosaminuria: a common disorder. *Acta Neurol Scand* 87, 342–344.
- Arvio, M., Sauna-Aho, O. und Peippo, M. (2001). Bone marrow transplantation for aspartylglucosaminuria: follow-up study of transplanted and non-transplanted patients. *J Pediatr* 138, 288–290.
- Arvio und Mononen, I. (2016). Aspartylglycosaminuria: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11.
- Arvio, Rapola, J. M. und Pelkonen, P. M. (1998). Chronic arthritis in patients with aspartylglucosaminuria. *J Rheumatol* 25, 1131–1134.
- Bai, C., Bowers, J., Verkman, A. S. und Matthey, M. A. (1998). A mouse model to test the in vivo efficacy of chemical chaperones. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 40, 39–45.
- Bainton, D. F. (1981). The discovery of lysosomes. *J Cell Biol* 91, 66s–76s.
- Ballabio, A. und Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793, 684–696.
- Banning, A., Gülec, C., Rouvinen, J., Gray, S. J. und Tikkanen, R. (2016). Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. *Scientific Reports* 6, 37583.
- Bellettato, C. M. und Scarpa, M. (2010). Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inher Metab Dis* 33, 347–362.

- Bonifacino, J. S. und Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 568–579.
- Braulke, T. und Bonifacino, J. S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793, 605–614.
- Braun, M., Waheed, A. und von Figura, K. (1989). Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J* 8, 3633–3640.
- Bright, N. A., Gratian, M. J. und Luzio, J. P. (2005). Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol* 15, 360–365.
- Bruździak, P., Panuszko, A. und Stangret, J. (2013). Influence of osmolytes on protein and water structure: a step to understanding the mechanism of protein stabilization. *J Phys Chem B* 117, 11502–11510.
- Carothers, A. D., Rudan, I., Kolcic, I., Polasek, O., Hayward, C., Wright, A. F., Campbell, H., Teague, P., Hastie, N. D. und Weber, J. L. (2006). Estimating Human Inbreeding Coefficients: Comparison of Genealogical and Marker Heterozygosity Approaches: Estimating Human Inbreeding. *Annals of Human Genetics* 70, 666–676.
- Chen, X., Snanoudj-Verber, S., Pollard, L., Hu, Y., Cathey, S. S., Tikkanen, R. und Gray, S. J. (2021). Pre-clinical Gene Therapy with AAV9/AGA in Aspartylglucosaminuria Mice Provides Evidence for Clinical Translation. *Molecular Therapy* 29, 989–1000.
- Coffey, J. W. und De Duve, C. (1968). Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 243, 3255–3263.
- Coutinho, M. F., Prata, M. J. und Alves, S. (2012). Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab* 105, 542–550.
- Dahms, N. M., Lobel, P., Breitmeyer, J., Chirgwin, J. M. und Kornfeld, S. (1987). 46 kd mannose 6-phosphate receptor: Cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 50, 181–192.
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. und Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60, 604–617.
- Dierks, T., Schlotawa, L., Frese, M.-A., Radhakrishnan, K., von Figura, K. und Schmidt, B. (2009). Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolidosis II/III and Niemann–Pick C1 disease — Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793, 710–725.
- Dragolovich, J. (1994). Dealing with salt stress in animal cells: The role and regulation of glycine betaine concentrations. *J Exp Zool* 268, 139–144.
- Dunder, U., Kaartinen, V., Valtonen, P., VÄÄnÄnen, E., Kosma, V.-M., Heisterkamp, N., Groffen, J. und Mononen, I. (2000). Enzyme replacement therapy in a mouse model of aspartylglycosaminuria. *The FASEB Journal* 14, 361–367.

- Dunder, U., Valtonen, P., Kelo, E. und Mononen, I. (2010). Early initiation of enzyme replacement therapy improves metabolic correction in the brain tissue of aspartylglucosaminuria mice. *J Inherit Metab Dis* 33, 611–617.
- Ellis, J. (1995). Principles of chaperone-mediated protein folding. *Phil Trans R Soc Lond B* 348, 107–112.
- Fan, J.-Q., Ishii, S., Asano, N. und Suzuki, Y. (1999). Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 5, 112–115.
- Fedorov, A. N. und Baldwin, T. O. (1997). Cotranslational protein folding. *J Biol Chem* 272, 32715–32718.
- Finkelstein, J. D., Martin, J. J., Harris, B. J. und Kyle, W. E. (1983). Regulation of Hepatic Betaine-Homocysteine Methyltransferase by Dietary Betaine. *The Journal of Nutrition* 113, 519–521.
- Fisher, K. J. und Aronson, N. N. (1991). Characterization of the mutation responsible for aspartylglucosaminuria in three Finnish patients. Amino acid substitution Cys163----Ser abolishes the activity of lysosomal glycosylasparaginase and its conversion into subunits. *J Biol Chem* 266, 12105–12113.
- Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. und Veltman, J. A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *European Journal of Human Genetics* 20, 490–497.
- Halila, R., Baumann, M., Ikonen, E., Enomaa, N. und Peltonen, L. (1991). Human leucocyte aspartylglucosaminidase. Evidence for two different subunits in a more complex native structure. *Biochemical Journal* 276, 251–256.
- Hartl, F. U. (1994). Secrets of a double-doughnut. *Nature* 371, 557–559.
- Hietala, M., Aula, P., Syvänen, A. C., Isoniemi, A., Peltonen, L. und Palotie, A. (1996). DNA-based carrier screening in primary healthcare: screening for aspartylglucosaminuria mutations in maternity health offices. *Clin Chem* 42, 1398–1404.
- Huotari, J. und Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* 30, 3481–3500 Ikonen, E., Aula, P., Grön, K., Tollersrud, O., Halila, R., Manninen, T., Syvänen, A. C. und Peltonen, L. (1991a). Spectrum of mutations in aspartylglucosaminuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 11222–11226.
- Ikonen, E., Baumann, M., Grön, K., Syvänen, A. C., Enomaa, N., Halila, R., Aula, P. und Peltonen, L. (1991b). Aspartylglucosaminuria: cDNA encoding human aspartylglucosaminidase and the missense mutation causing the disease. *EMBO J* 10, 51–58.
- Ikonen, E., Julkunen, I., Tollersrud, O. K., Kalkkinen, N. und Peltonen, L. (1993). Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 12, 295–302.
- Isoniemi, A., Hietala, M., Aula, P., Jalanko, A. und Peltonen, L. (1995). Identification of a novel mutation causing aspartylglucosaminuria reveals a mutation hotspot region in the aspartylglucosaminidase gene. *Hum Mutat* 5, 318–326.

- Istaiti, M., Frydman, D., Dinur, T., Szer, J., Revel-Vilk, S. und Zimran, A. (2023). High-Dose Ambroxol Therapy in Type 1 Gaucher Disease Focusing on Patients with Poor Response to Enzyme Replacement Therapy or Substrate Reduction Therapy. *Int J Mol Sci* 24, 6732.
- Kapahnke, M., Banning, A. und Tikkanen, R. (2016). Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells* 5, 45.
- Kaplan, A., Fischer, D., Achord, D. und Sly, W. (1977). Phosphohexosyl recognition is a general characteristic of pinocytosis of lysosomal glycosidases by human fibroblasts. *J Clin Invest* 60, 1088–1093.
- Kelo, E., Dunder, U. und Mononen, I. (2005). Massive accumulation of Man₂GlcNAc₂-Asn in nonneuronal tissues of glycosylasparaginase-deficient mice and its removal by enzyme replacement therapy. *Glycobiology* 15, 79–85.
- Lefrancois, S. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *The EMBO Journal* 22, 6430–6437.
- Lieberman, R. L., D'aquino, J. A., Ringe, D. und Petsko, G. A. (2009). Effects of pH and Iminosugar Pharmacological Chaperones on Lysosomal Glycosidase Structure and Stability. *Biochemistry* 48, 4816–4827.
- Lobel, P., Dahms, N. M. und Kornfeld, S. (1988). Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263, 2563–2570.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. und Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 622–632.
- Maegawa, G. H. B., Tropak, M. B., Buttner, J. D., Rigat, B. A., Fuller, M., Pandit, D., Tang, L., Kornhaber, G. J., Hamuro, Y., Clarke, J. T. R. und Mahuran, D. J. (2009). Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease. *Journal of Biological Chemistry* 284, 23502–23516.
- Makino, M., Kojima, T. und Yamashina, I. (1966). Enzymatic cleavage of glycopeptides. *Biochem Biophys Res Commun* 24, 961–966.
- Mindell, J. A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol* 74, 69–86.
- Mononen, I. (2016). Aspartylglycosaminuria: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11.
- Mononen, I., Heisterkamp, N., Dunder, U., Romppanen, E. L., Noronkoski, T., Kuronen, I. und Groffen, J. (1995). Recombinant glycosylasparaginase and in vitro correction of aspartylglycosaminuria. *FASEB J* 9, 428–433.
- Mononen, I., Heisterkamp, N., Kaartinen, V., Williams, J. C., Yates, J. R., Griffin, P. R., Hood, L. E. und Groffen, J. (1991). Aspartylglycosaminuria in the Finnish population: identification of two point mutations in the heavy chain of glycoasparaginase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2941–2945.

- Mononen, I., Mononen, T., Ylikangas, P., Kaartinen, V. und Savolainen, K. (1994). Enzymatic diagnosis of aspartylglycosaminuria by fluorometric assay of glycosylasparaginase in serum, plasma, or lymphocytes. *Clin Chem* 40, 385–388.
- Mononen, T., Parviainen, M., Penttilä, I. und Mononen, I. (1986). Liquid-chromatographic detection of aspartylglycosaminuria. *Clin Chem* 32, 501–502.
- Morello, J.-P., Salahpour, A., Laperrière, A., Bernier, V., Arthus, M.-F., Lonergan, M., Petäjä-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G. und Bouvier, M. (2000). Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105, 887–895.
- Morris, C., Heisterkamp, N., Groffen, J., Williams, J. C. und Mononen, I. (1992). Chromosomal localization of the human glycoasparaginase gene to 4q32-q33. *Hum Genet* 88, 295–297.
- Oinonen, C., Tikkanen, R., Rouvinen, J. und Peltonen, L. (1995). Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat Struct Biol* 2, 1102–1108.
- Park, H., Fisher, K. J. und Aronson, N. N. (1991). Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase. *FEBS Lett* 288, 168–172.
- Peltonen, L. (1997). Molecular Background of the Finnish Disease Heritage. *Annals of Medicine* 29, 553–556.
- Peltonen, L., Jalanko, A. und Varilo, T. (1999). Molecular genetics of the Finnish disease heritage. *Hum Mol Genet* 8, 1913–1923.
- Platt, F. M., Boland, B. und van der Spoel, A. C. (2012). The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol* 199, 723–734.
- Pohl, S. und Hasilik, A. (2015). Biosynthesis, targeting, and processing of lysosomal proteins: Pulse–chase labeling and immune precipitation. In: *Methods in Cell Biology*, Elsevier, S. 63–83, doi:10.1016/bs.mcb.2014.10.020.
- Pollitt, R. J., Jenner, F. A. und Merskey, H. (1968). ASPARTYLGLYCOSAMINURIA. *The Lancet* 292, 253–255.
- Poupetová, H., Ledvinová, J., Berná, L., Dvůráková, L., Kozich, V. und Elleder, M. (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inher Metab Dis* 33, 387–396.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T. und Saftig, P. (2007). LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase. *Cell* 131, 770–783.
- Riikonen, A., Rouvinen, J., Tikkanen, R., Julkunen, I., Peltonen, L. und Jalanko, A. (1996). Primary folding of aspartylglucosaminidase. Significance of disulfide bridges and evidence of early multimerization. *J Biol Chem* 271, 21340–21344.

- Riikonen, A., Tikkanen, R., Jalanko, A. und Peltonen, L. (1995). Immediate interaction between the nascent subunits and two conserved amino acids Trp34 and Thr206 are needed for the catalytic activity of aspartylglucosaminidase. *J Biol Chem* 270, 4903–4907.
- Risley, J. M., Huang, D. H., Kaylor, J. J., Malik, J. J. und Xia, Y.-Q. (2001). Glycosylasparaginase Inhibition Studies: Competitive Inhibitors, Transition State Mimics, Noncompetitive Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition* 16, 269–274.
- Saarela, J., Laine, M., Oinonen, C., von Schantz, C., Jalanko, A., Rouvinen, J. und Peltonen, L. (2001). Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. *Hum Mol Genet* 10, 983–995.
- Sagné, C. und Gasnier, B. (2008). Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *J Inherit Metab Dis* 31, 258–266.
- Schiff, M. (2012). Treatment of Inherited Homocystinurias. *Neuropediatrics* 43, 295–304.
- Schueler, U. H., Kolter, T., Kaneski, C. R., Zirzow, G. C., Sandhoff, K. und Brady, R. O. (2004). Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 27, 649–658.
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V., Shaw, K., Phillips, A. und Cooper, D. N. (2014). The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* 133, 1–9.
- Storch, S. und Braulke, T. (2001). Multiple C-terminal Motifs of the 46-kDa Mannose 6-Phosphate Receptor Tail Contribute to Efficient Binding of Medium Chains of AP-2 and AP-3. *Journal of Biological Chemistry* 276, 4298–4303.
- Suzuki, Y., Ichinomiya, S., Kurosawa, M., Ohkubo, M., Watanabe, H., Iwasaki, H., Matsuda, J., Noguchi, Y., Takimoto, K., Itoh, M., Tabe, M., Iida, M., Kubo, T., Ogawa, S., Nanba, E., Higaki, K., Ohno, K. und Brady, R. O. (2007). Chemical chaperone therapy: clinical effect in murine G_{M1}-gangliosidosis. *Ann Neurol* 62, 671–675.
- Syvänen, A. C., Ikonen, E., Manninen, T., Bengtström, M., Söderlund, H., Aula, P. und Peltonen, L. (1992). Convenient and quantitative determination of the frequency of a mutant allele using solid-phase minisequencing: application to aspartylglucosaminuria in Finland. *Genomics* 12, 590–595.
- Tikkanen, R., Enomaa, N., Riikonen, A., Ikonen, E. und Peltonen, L. (1995). Intracellular Sorting of Aspartylglucosaminidase: The Role of N-Linked Oligosaccharides and Evidence of Man-6-P-Independent Lysosomal Targeting. *DNA and Cell Biology* 14, 305–312.
- Tikkanen, R., Peltola, M., Oinonen, C., Rouvinen, J. und Peltonen, L. (1997). Several cooperating binding sites mediate the interaction of a lysosomal enzyme with phosphotransferase. *EMBO J* 16, 6684–6693.

- Tikkanen, R., Riikonen, A., Oinonen, C., Rouvinen, R. und Peltonen, L. (1996a). Functional analyses of active site residues of human lysosomal aspartylglucosaminidase: implications for catalytic mechanism and autocatalytic activation. *EMBO J* 15, 2954–2960.
- Tikkanen, R., Rouvinen, J., Törrönen, A., Kalkkinen, N. und Peltonen, L. (1996b). Large-scale purification and preliminary x-ray diffraction studies of human aspartylglucosaminidase. *Proteins* 24, 253–258.
- Tollersrud, O. K. und Aronson, N. N. (1989). Purification and characterization of rat liver glycosylasparaginase. *Biochem J* 260, 101–108.
- Uusitalo, A., Tenhunen, K., Tenhunen, J., Matikainen, S., Peltonen, L. und Jalanko, A. (1997). Expression and regulation of the human and mouse aspartylglucosaminidase gene. *J Biol Chem* 272, 9524–9530.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C. P., Brummelkamp, T. R., Agami, R. und Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4, 609–615.
- Virta, S., Rapola, J., Jalanko, A. und Laine, M. (2006). Use of nonviral promoters in adenovirus-mediated gene therapy: reduction of lysosomal storage in the aspartylglucosaminuria mouse. *The Journal of Gene Medicine* 8, 699–706.
- Voznyi YaV, null, Keulemans, J. L., Kleijer, W. J., Aula, P., Gray, G. R. und van Diggelen, O. P. (1993). Applications of a new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of aspartylglucosaminuria. *J Inherit Metab Dis* 16, 929–934.
- Weidemann, F., Jovanovic, A., Herrmann, K. und Vardarli, I. (2022). Chaperone Therapy in Fabry Disease. *IJMS* 23, 1887.
- Wilcox, W. R. (2004). Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 144, S3-14.
- Winchester, B. (2005). Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* 15, 1R-15R.

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Hiermit möchte ich einigen Personen meinen herzlichen Dank entgegenbringen.

Als erstes möchte ich Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen und Frau Dr. Antje Banning für die Möglichkeit danken mich mit diesem Thema auseinanderzusetzen, für die starken Nerven und die Geduld, die sie manchmal für mich aufbringen mussten, sowie für ihre wunderbare Rundumbetreuung.

Des Weiteren Danke ich Ralf Füllkrug und Petra Janson für die geduldige Einführung, Betreuung und Unterstützung im Labor und Petra besonders für das Appellieren eine lückenlose Dokumentation zu führen und genau aufzuschreiben, wo sich was befindet.

Danken möchte ich außerdem Francesca, Blendi und Bene für die gute Zeit im Labor, die vielen gemeinsamen Mittagessen und eure Hilfsbereitschaft.

Und dann möchte ich meinen Mädels danken, denn ohne euch wäre dieses Studium auf keinen Fall das gleiche gewesen. Ich freue mich sehr, dass unser Kontakt auch über das Studium hinaus so rege ist. Danke Francesca, Franzi, Jessi, Lena, Nicole und Svenja.

Außerdem geht ein großer Dank an meine Eltern. Dank euch durfte ich dieses Studium absolvieren und ihr seid nicht müde geworden, mich zu motivieren diese Dissertation zu vollenden.

Und zum Schluss geht ein großer Dank an meinen liebevollen Mann. Danke Jonas, dass du mir den Rücken freihältst und immer an mich glaubst.