

# N-Glycanase-1-Mangel – Charakterisierung von Genvarianten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Orczyk, Ralph Rene

aus Stuttgart

Gießen 2025

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,  
aus dem Biochemischen Institut.**

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Hahn

Tag der Disputation: 11.11.2025

*Für Annsu.*

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 N-Glycanase-1 .....	1
1.1.1 Struktur der N-Glycanase-1 .....	1
1.1.2 Funktion der N-Glycanase-1 .....	3
1.2 N-Glycanase-1-Mangel .....	5
1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit .....	8
2. Material .....	9
2.1 Materialien und Geräte .....	9
2.2 Chemikalien und Puffer .....	11
2.3 Kits .....	15
2.4 Antikörper .....	16
2.5 Primer .....	16
2.6 Plasmide .....	18
2.7 Bakterienkulturen .....	19
2.8 Zelllinien und Nährmedien .....	19
3. Methoden .....	21
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	21
3.1.1 Klonierung .....	21
3.1.2 Bakterielle Transformation .....	22
3.1.3 Mutagenese .....	22
3.1.4 Agarosegel-Elektrophorese .....	24
3.1.5 SDS PAGE und Western Blot .....	24
3.2 Zellbiologische Methoden .....	25
3.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien .....	25
3.2.2 Transfektion .....	25
3.2.3 Herstellung von Proteinlysaten .....	26
3.2.4 CRISPR/Cas9-vermittelter Knock-Out von NGLY1 in HEK-Flp-In <sup>TM</sup> -Zellen .....	26
3.2.5 NGLY1-Aktivitätsmessung .....	27
3.3 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung .....	30

3.3.1 Statistik .....	30
3.3.2 Elektronische Manipulation der Abbildungen .....	30
4. Ergebnisse .....	31
4.1 Generierung einer NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In-Zelllinie .....	31
4.2 Expression der NGLY1 Genvarianten R390Q und R401* nach transienter Transfektion in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen .....	32
4.3 Etablierung eines Aktivitätsassays für NGLY1 in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen	34
4.4 Charakterisierung der Varianten R390Q und R401* in NGLY1-Knock-Out HEK- Flp-In Zellen .....	38
4.5 Expression von NRF1 in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen .....	40
4.6 Einfluss von Medikamenten auf die Aktivität der Genvarianten R390Q und R401* 41	
5. Diskussion .....	49
5.1 Unterschiede in der Expression und der Aktivität zwischen den Varianten R390Q und R401* .....	49
5.2 Diagnostische Wertigkeit des Aktivitätsassays .....	50
5.3 Einfluss auf NRF1 bei Expression der Varianten R390Q und R401* .....	52
5.4 Einfluss von Medikamenten und mögliche Therapieansätze bei der Varianten R390Q und R401* .....	53
5.5 Ausblick .....	55
6. Zusammenfassung .....	56
7. Summary .....	57
8. Abkürzungsverzeichnis .....	58
9. Abbildungsverzeichnis .....	61
10. Tabellenverzeichnis .....	63
11. Literaturverzeichnis .....	64
12. Publikationsverzeichnis .....	76
13. Ehrenwörtliche Erklärung .....	77
14. Danksagung .....	78

## **1. Einleitung**

### **1.1 N-Glycanase-1**

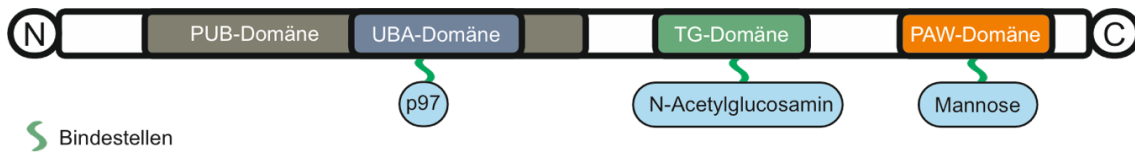
Die N-Glycanase-1 (NGLY1), auch als Peptid:N-Glycanase (PNGase) bezeichnet, wurde erstmalig 1977 beschrieben nach einer Isolierung aus der Pflanze *Prunus dulcis* (Takahashi, 1977). Die Bezeichnung NGLY1 wird in Mäusen und Menschen verwendet. Dieses Enzym spielt eine tragende Rolle im Zusammenhang mit der am häufigsten vorkommenden Modifikation von Proteinen, der N-Glykosylierung (Schwarz & Aebi, 2011).

N-Glycanase-1 unterstützt den nicht-lysosomalen Abbau von N-Glykoproteinen als auch deren fehlgefalteter Formen (Harada et al., 2015), dazu entfernt es Zuckermoleküle von zelleigenen, fehlgefalteten Proteinen, die anschließend vom Proteasom abgebaut werden. Es ist ein hochkonserviertes, deglykosylierendes Enzym (Suzuki, 2015), das die Spaltung der Amidbindung zwischen einem N-Acetylglucosamin und einem Asparaginrest katalysiert sodass dabei ein Aspartatrest und ein Oligosaccharid mit einem Amino-N-Acetylglucosamin-Rest entsteht. Der letzte Schritt ist die spontane Ammoniakfreisetzung (Isbell & Frush, 1950; Makino et al., 1968).

Der erste Nachweis der enzymatischen NGLY1-Aktivität in der Zellkultur fand 1993 statt (Suzuki et al., 1993), und die Identifizierung des dazugehörigen Gens erfolgte im Jahr 2000 in *Saccharomyces cerevisiae* (Suzuki et al., 2000). Im Jahr 2002 gelang die Entschlüsselung des Gens in Säugetieren, bei der eine Größe von 2,6 kb festgestellt wurde (Suzuki et al., 2002). Die Pathologie im Zusammenhang mit einer mangelnden Aktivität der N-Glycanase-1 wird N-Glycanase-1-Mangel genannt und wurde 2012 erstbeschrieben (Need et al., 2012).

#### **1.1.1 Struktur der N-Glycanase-1**

Das humane NGLY1 besteht in seiner dominierenden Isoform aus 654 Aminosäuren mit drei funktionellen Domänen (Abbildung 1): der PNGase/Ubiquitin-assoziierten oder Ubiquitin-regulatorischen-X-Domäne (PUB), der Transglutaminase-ähnlichen-Kerndomäne (TG) und der PNGase-And-Other-Worm-Proteins-Domäne (PAW) (Miao et al., 2022). Es verfügt über eine intrinsische kohlenhydratbindende Einheit (Suzuki et al., 1995).



### Abbildung 1: Schematischer Aufbau der N-Glycanase 1

Aufbau des NGLY1. Am N-Terminus ist die PNGase/Ubiquitin-assoziierte oder Ubiquitin-regulatorische X-Domäne (PUB) mit der Ubiquitin-assoziierten Domäne (UBA) zu sehen, die in der Lage ist, das Protein p97 zu binden. Darauf folgend liegt die Transglutaminase-ähnliche (TG) Domäne mit dem katalytischen Zentrum, die N-Acetylglucosamine bindet. Am C-Terminus lokalisiert ist die PNGase-And-Other-Worm-Proteins-Domäne (PAW), die mannosereiche Glykane bindet.

Am N-Terminus ist die PUB-Domäne zu finden (Suzuki et al., 2001). Diese besteht aus fünf Alpha-Helices und drei anti-parallel verlaufenden Beta-Faltblatt-Strukturen (Doerks et al., 2002). Die bereits erwähnte Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA), die Teil der PUB-Domäne ist, spielt eine Rolle im Rahmen der Ubiquitinierung, indem es als Vermittler zwischen den beteiligten Proteinen dient. Sie kann aber auch homologe Sequenzen zum Ubiquitin selbst beinhalten (Varadi et al., 2022). Zudem bindet die PUB an p97 (auch als VCP oder Cdc48 bekannt) (Allen et al., 2006). Durch p97 binden unter anderem die Ubiquitin E3-Ligase, der Autocrine Motility Factor Rezeptor (AMFR) und die Sphingolipid Acyltransferasen (SAKS) (Li et al., 2005, 2006; McNeill et al., 2004). Die Ubiquitin E3-Ligase bindet Ubiquitin an Proteine, AMFR aktiviert unter anderem die Ubiquitin E3-Ligase und spielt daneben im Rahmen von Zellproliferation und -wachstum eine Rolle (Chiu et al., 2008; Ye & Rape, 2009). SAKS übertragen Fettsäuren auf Sphingosin oder andere Vorläufermoleküle und sind so an der Bildung von spezifischen Sphingolipiden beteiligt (LaLonde & Bretscher, 2011).

Die TG-Domäne wird unterteilt in eine Transglutaminase-ähnliche Region, ein Zink-bindendes Motiv und ein RAD23/HR23-bindendes Motiv (Ghaemmaghami et al., 2003; Katiyar et al., 2005). Die TG-Domäne ist hauptsächlich dafür verantwortlich, die Beta-Aspartyl-Glykosyl-Amin-Bindung zwischen dem innersten N-Acetyl-Glucosamin und dem Asparagin-Rest des N-Glykoproteins zu spalten. Dafür beinhaltet das katalytische Zentrum eine Bindestelle für das N-Acetylglucosamin (Suzuki et al., 1997; X. Zhou et al., 2006). Das Zink-bindende Motiv steigert die Enzymaktivität durch divalente Metallionen (Zhao et al., 2006). Das RAD23/HR23-bindende Motiv bildet die Bindungsstelle für den Ubiquitin-Pfad und die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) ab

(Lambertson et al., 2003; Maerz et al., 2010). RAD23 leitet sich von „radiation sensitive 23“ ab, da es das 23. Gen in einer Reihe von strahlungsempfindlichen Genen von *Saccharomyces cerevisiae* darstellt. HR23 steht für die humane Variante des Proteins (Yokoi & Hanaoka, 2017).

Am C-Terminus befindet sich die PAW-Domäne, diese besteht aus einer Beta-Sandwich-Struktur, die aus zwei Schichten antiparallel verlaufender Beta-Stränge und kurzen Helices besteht (Doerks et al., 2002; Miao et al., 2022). Diese Domäne dient der Bindung von mannosereichen Glykanen (X. Zhou et al., 2006).

### 1.1.2 Funktion der N-Glycanase-1

Die N-Glycanase-1 beteiligt sich vor allem an der ER-assoziierten Degradation von Proteinen (De Virgilio et al., 1998; Mosse et al., 1998; Suzuki et al., 1997). Dabei soll der Rücktransport fehlgefalteter N-Glykoproteine vom Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) in das Zytosol stattfinden, damit diese der proteasomalen Degradation zugeführt werden können. Vor der proteasomalen Degradation entfernt die N-Glycanase-1 im Zytosol die N-Glykane der fehlgefalteten N-Glykoproteine (Hirsch et al., 2003).

Im Rahmen dieser Prozesse wird das ER Degradation Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 1 (EDEM1) von NGLY1 stabilisiert (Park et al., 2014). EDEM1 schneidet terminale Mannosereste von fehlgefalteten Proteinen ab, wodurch diese als fehlerhaft erkannt werden und im Anschluss ins Zytosol transloziert werden können (Hosokawa et al., 2009; Phillips et al., 2020; Roth & Zuber, 2017). Die Endo-Beta-N-Acetylglucosaminidase (ENGase) interagiert dann mit den fehlgefalteten Proteinen und führt zu einem Überschuss an N-Glucosaminen, was zu einem verzögerten Abbau und damit zu einer vorübergehenden Akkumulation der N-Glucosamine führt (Suzuki et al., 2015).

Ein weiteres Substrat von NGLY1 ist der Nuclear Factor Erythroid-2-Like 1 (NFE2L1 oder NRF1). Dieser muss von NGLY1 deglykosyliert werden und anschließend von DNA-Damage Inducible 1 Homolog 2 (DDI2) proteolytisch prozessiert werden, um als Transkriptionsfaktor für proteasomale Gene zu fungieren (Owings et al., 2018; Tomlin et al., 2017a). NRF1 spielt daneben auch bei oxidativem Stress, Differenzierungsprozessen, Entzündungsreaktionen und Stoffwechselprozessen eine Rolle (Miao et al., 2022). So ist

NRF1 ebenfalls ein Transkriptionsfaktor für die Prozesse der sogenannten Ferroptose, einer eisenabhängigen Form der Apoptose (Forcina et al., 2022; W. S. Yang & Stockwell, 2016).

Die Effizienz der Antigenpräsentation auf MHC-I ist ebenfalls von der NGLY1-Aktivität abhängig (Altrich-VanLith et al., 2006; Kario et al., 2008). MHC-I steht für Major Histocompatibility Complex Klasse I, dessen Hauptfunktionen die Antigenpräsentation und die Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen darstellen. Die Konversion von Asparagin zu Aspartat dient dabei der posttranslationalen Modifikation von Antigenen, die anschließend von MHC-I-Molekülen präsentiert werden, und erhöht damit die Diversität in der Präsentation von Antigenen (Dalet et al., 2011).

Eine weitere Funktion besteht in der mitochondrialen Homöostase. Dabei wurde im Rahmen des N-Glycanase-1-Mangels festgestellt, dass mitochondriale Bestandteile und das Membranpotential reduziert werden und eine Erhöhung der Oxidantien innerhalb der Matrix stattfindet (Kong et al., 2018). Auch die Mitophagie wird dementsprechend reguliert: Ohne NGLY1 werden Mitophagie-assoziierte Gene vermindert exprimiert (K. Yang et al., 2018). Dieser Einfluss wird am ehesten über entsprechende Transkriptionsfaktoren bewirkt. Daraus ergibt sich auch der überlappende klinische Symptomkomplex mit Erkrankungen der mitochondrialen Atmungskette, den sogenannten Mitochondriopathien (Freeze et al., 2015; Gorman et al., 2016).

Des Weiteren ist NGLY1 an der Regulation des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ -Transporters, unter anderem in der Niere, beteiligt. Hierbei spielt ebenfalls am ehesten die Deglykosylierung des genannten Transporters eine Rolle in seiner Regulierung (Talsness et al., 2020).

Auch auf den AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Signalweg übt NGLY1 Einfluss aus. So ist bei Verlust von NGLY1 eine geringere Menge an AMPK $\alpha$  vorhanden, welches negative Auswirkungen auf den Zellmetabolismus hat (Han et al., 2020). Ein weiterer Signalweg, der im Zusammenhang mit NGLY1 steht, ist der Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Signalweg (Galeone et al., 2017). BMP gehört zu der TGF- $\beta$  Familie (Transforming Growth Factor). Fehlgefaltetes BMP4 wird in *Drosophila* NGLY1-vermittelt deglykosyliert, sodass eine anschließende Retrotranslokation stattfinden kann.

Dadurch wird der Weg für korrekt gefaltetes BMP4 gebahnt, und es kann anschließend seine Funktion in der Entwicklung des Darms erfüllen (Galeone et al., 2020).

Abbott et al. untersuchten 2023 weitere Funktionen von NGLY1 im Hinblick auf die neuronale Differenzierung von Geweben. Dabei stellten sie fest, dass neuronale und astrozytäre Markerproteine (unter anderem das Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP) bei verminderten NGLY1-Spiegeln ebenfalls vermindert waren. Darüber hinaus waren der Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und dopaminerge neuronale Marker (unter anderem Forkhead Box A2 - FOXA2) vermindert. Insgesamt ist von einem wichtigen Einfluss von NGLY1 auf die Entwicklung des Mittelhirns auszugehen.

Auch in der Onkogenese gibt es Hinweise auf die Beteiligung von NGLY1. Dementsprechend sind die Missense-Varianten Thr127Pro und Thr127Lys beim Kolonkarzinom und auch beim hepatozellulären Karzinom festgestellt worden (H. Zhou et al., 2013).

## 1.2 N-Glycanase-1-Mangel

Die erstmalige Identifizierung von Patienten mit *NGLY1*-Mutationen und damit die Prägung des Krankheitsbegriffs, N-Glycanase-1-Mangel, erfolgte 2012 durch die Aufschlüsselung des gesamten Exoms (Need et al., 2012). Im englischsprachigen Raum findet man auch den Begriff NGLY1-related congenital disorder of deglycosylation (NGLY1-CDDG1), zu Deutsch NGLY1-zugeordnete kongenitale Störung der Deglykosylierung (Lam et al., 2017).

Sie ist die erste beschriebene kongenitale Störung der Deglykosylierung (Freeze, 2013). Die offizielle Anzahl der betroffenen Patienten liegt weltweit bei ca. 100, damit hätte die Erkrankung eine Prävalenz von weniger als 1:1.000.000 (Pandey et al., 2022). Allein in den USA sind bereits über 70 Erkrankte bekannt, daher ist es wahrscheinlich, dass die Anzahl an Betroffenen weltweit höher ist (Stanclift et al., 2022). Zum aktuellen Zeitpunkt liegt kein offizielles Register für die Erkrankung vor. Die Krankheit ist durch insgesamt fünf Kernsymptome geprägt: eine globale Entwicklungsverzögerung und/oder geistige Behinderung, eine hyperkinetische Bewegungsstörung (sogenannte Choreoathetose), Erhöhung von Leberwerten in Blutuntersuchungen (der Transaminasen ALT und AST), Hypo-/Alakrimie und eine progressive, sensomotorische Neuropathie (Adams & Schaaf, 2018; Enns et al., 2014; Lam et al., 2018; Tong et al., 2023). Aus den zuvor genannten

Symptomen wurde der im deutschsprachigen Raum verwendete Begriff Alakrimie-Choreoathetose-Leberdysfunktion-Syndrom geprägt.

Insgesamt beherbergt das Krankheitsbild weitere Symptome, die eine Diagnose erschweren können. Dazu gehören: muskuläre Hypotonie, Kontrakturen und Krampfanfälle, Mikrozephalie, Leberfibrose, Skoliose, Hörminderung, Strabismus, Ulcus corneae, Xerostomie, kleine Akren sowie chronische Obstipationen (Abuduxikuer et al., 2020; Lam et al., 2017; Tong et al., 2023). Die Symptome der Hypo-/Alakrimie, Xerostomie, sowie die der Obstipationen, lassen sich aus der Rolle von NGLY1 für den Creb1/Atf1-AQP Signalweg ableiten (Asahina et al., 2020). Dabei werden notwendige Transkriptionsfaktoren deglykosyliert. Die weiteren Symptome der Erkrankungen konnten bisher nicht abschließend auf einen bestimmten Pathomechanismus reduziert werden. Eine Annahme liegt immer noch in der Akkumulation von fehlgefalteten N-Glykoproteinen (Pandey et al., 2022). Diese These ist fragwürdig, da Substrate des ERAD auch ohne Deglykosylierung degradiert und proteasomal abgebaut werden können (Kario et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für die Pathologie der Erkrankung könnte in der vermehrten Bildung von Autophagosomen und einer Zunahme von p62/SQSTM1 bei NGLY1-KO-Zellen der HEK293-Zelllinie in den Autophagosomen zu finden sein (Needs et al., 2022). Ebenfalls kommt die Verminderung von NRF1/NFE2L1 und die damit einhergehende Abnahme der Transkription von proteasomalen Genen als möglicher Pathomechanismus in Frage (Tomlin et al., 2017a). Die verminderte Transkription von proteasomalen Genen wurde mit einer einhergehenden Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies, sowie verminderten ATP-Spiegeln bei *Drosophila* festgestellt (Han et al., 2020). Weitere mögliche Pathomechanismen ergeben sich aus den bereits erwähnten funktionellen Zusammenhängen mit der Mitophagie, dem AMPK- oder dem BMP-Signalweg, sowie den daraus resultierenden gestörten Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen, insbesondere auf neuronaler Ebene (Abbott et al., 2023; Fujihira et al., 2022; Galeone et al., 2017, 2020; Han et al., 2020; K. Yang et al., 2018). Der genaue Pathomechanismus bleibt jedoch weiterhin Gegenstand aktueller Forschung und ist damit nicht abschließend geklärt.

Die Diagnostik der Erkrankung basiert auf mehreren Pfeilern, die zu einer entsprechenden Verdachtsdiagnose führen können. Dazu gehören ein auffälliges EEG, mit bspw. Spike-Wave und Epilepsie-ähnlichen Darstellungen, sowie die bereits erwähnten erhöhten

Blutleberwerte, die Transaminasen AST und ALT. Darüber hinaus kann auch ein auffälliger MRT-Befund ergänzend auftreten. Hierbei ist vor allem die Atrophie der Hirnsubstanz erkennbar. Daneben kann auch eine intrauterine Wachstumsrestriktion bereits im Mutterleib auf die Erkrankung hinweisen (Abuduxikuer et al., 2020; Lam et al., 2017). Insgesamt ist die genannte Diagnostik jedoch uneindeutig und kann nur Hinweise auf die mögliche Diagnose geben. Sie umfasst darüber hinaus auch andere ähnliche Erkrankungen, die in Frage kommen. Daher ist eine zusätzliche Labordiagnostik notwendig, um die möglichen Differenzialdiagnosen weiter einzuschränken. So akkumuliert bei NGLY1-Mangel N-Acetylglucosamin-Asparagin in den Zellen, sodass entsprechend erhöhte Spiegel davon im Urin oder auch im Blut von Patienten nachgewiesen werden können (Haijes et al., 2019; Mueller et al., 2022a). Erhöhte Spiegel von N-Acetylglucosamin-Asparagin sind allerdings nicht ausschließlich beweisend für einen NGLY1-Mangel, so können erhöhte Werte auch im Rahmen einer Aspartylglucosaminurie festgestellt werden (Goodspeed et al., 2021). Daher führt zum aktuellen Zeitpunkt eine ergänzende genetische Testung bei der Verdachtsdiagnose zur Bestätigung eines N-Glycanase-1-Mangels (Need et al., 2012). So können mögliche Mutationen des *NGLY1*-Gens festgestellt werden.

Bisher sind etwa 56 verschiedene Mutationen bekannt. Dazu gehören Nonsense-, Missense- und Frameshift-Mutationen, sowie In-Frame Deletionen und auch Spleißvarianten (Pandey et al., 2022; Stanclift et al., 2022). Dabei kommen die Nonsense-Mutationen auf der gesamten Proteinelänge vor, während die Mehrheit der Missense-Mutationen in der Transglutaminase-ähnlichen Domäne zu finden sind (Stanclift et al., 2022). Nahezu alle Mutationen führen zu einem verminderten NGLY1-Spiegel, sowie einer einhergehenden verminderten Enzymaktivität (Pandey & Jafar-Nejad, 2022). Bisher konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Art der Mutation und der Ausprägung der Krankheit gefunden werden (Stanclift et al., 2022).

Die Lebenserwartung von Patienten ist durch die ausgeprägte Ambivalenz der Erkrankung weltweit nicht ausreichend definiert. Teilweise erreichen Patienten das Erwachsenenalter, während andere bereits im Kindesalter versterben (Dabaj et al., 2021; Kalfon et al., 2022; Stuu et al., 2021). Näherungsweise liegt die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten zwischen 11,9 und 13 Jahren (Stanclift et al., 2022).

Kausale therapeutische Ansätze für die Erkrankung liegen aktuell nicht vor, damit kommt zunächst nur eine rein symptomatische Therapie für Patienten in Frage. Dazu gehören

Tränenersatzmittel, Antikonvulsiva, Ergo- und Physiotherapie sowie psychosoziale Unterstützung von betroffenen Familien (Lam et al., 1993, 2017). Mögliche Ansätze für kausale Therapien stellen die Gentherapie oder auch eine Enzyzersatztherapie dar.

### 1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Erkrankung des N-Glycanase-1-Mangels ist erst seit 2012 bekannt, damit ergibt sich hier auch ein entsprechend hoher Forschungsbedarf (Need et al., 2012). Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei mögliche pathogene Varianten des *NGLY1*-Gens p.Arg390Gln (c.1169G>A), sowie p.R401\* (c.1201A>T) hinsichtlich ihres enzymatischen Verhaltens näher beleuchtet und charakterisiert werden. Damit sollten jeweils eine Missense- sowie eine Nonsense-Mutation, die zu NGLY1-Mangel führen, untersucht werden. Dabei stellt p.R401\* die momentan häufigste Variante aller Mutationen dar (Pandey et al., 2022).

Hierfür sollte in einem geeigneten Zellmodell zunächst eine NGLY1-KO-Zelllinie generiert werden. Anschließend sollte die Expression der beiden Varianten im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Da die Expression alleine aber keinen Aufschluss über die enzymatische Aktivität der Varianten gibt, musste eine Methode zur Messung der Enzymaktivität etabliert werden. Dabei wurde in dieser Arbeit auf eine Fluoreszenzmessung zurückgegriffen.

Neben den Unterschieden der Mutationen der N-Glycanase-1 spielt auch der genaue Pathomechanismus der Erkrankung in der aktuellen Forschung weiterhin eine große Rolle. Um auch diesen Gesichtspunkt im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurde mit NRF1/NFE2L1, eine bereits identifizierte Zielstruktur von NGLY1, weiter untersucht (Tomlin et al., 2017a).

Zuletzt sollte die aktuell noch fehlende kausale Therapie betrachtet werden. Hierzu wurden die Expression sowie die Enzymaktivität der zuvor genannten Varianten in Verbindung mit medikamentösen Ansätzen untersucht. Dabei kamen Amlexanox, Ataluren sowie Betain zum Einsatz.

## 2. Material

### 2.1 Materialien und Geräte

Die für diese Arbeit verwendeten Materialien und Geräte sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 1 aufgeführt. Gebrauchsmaterialien wie Eppendorf-Gefäße wurden von der Firma Sarstedt AG & Co. (Nürnbrecht, DE) bezogen.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

<b>Geräte- bzw. Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg (DE)
Bakterien-Schüttler, KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Bio Photometer Plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
CO <sub>2</sub> Inkubator für Zellkulturen	Sanyo, Eschborn (DE)
Filterpapier, Protran BA 83	Whatman, Dassel (DE)
Glaskolben	Schott, Mainz (DE)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
LI-COR <sup>®</sup> Odyssey <sup>®</sup> XF	LI-COR Biosciences, Bad Homburg (DE)
Lichtmikroskop, AE 31	Motic, Wetzlar (DE)
Mikroplatte OptiPlate-96 F schwarz	Perkin Elmer, Baesweiler (DE)
Nano Quant Plate <sup>®</sup>	Tecan, Crailsheim (DE)
Nitrocellulose-Transfermembran	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Parafilm „M“ <sup>®</sup>	Bemis, Rheinbach (DE)
PCR System 2700	Thermo Scientific, Dreieich (DE)
Pipettierhilfe accu jet <sup>®</sup>	Brand, Wertheim (DE)
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl und 5, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
SDS-PAGE Kammer	Healthcare Life Sciences, München (DE)

SDS-Gel-Gießkammer	Healthcare Life Sciences, München (DE)
Spannungsquelle (Electrophoresis power supply, EPS 301)	Healthcare Life Sciences, München (DE)
Sterilbank, Herasafe KS	ThermoFisher, Dreieich (DE)
Tecan Infinite M 200	Tecan, Crailsheim (DE)
Thermocycler (T-Personal Combi)	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS GM3100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin (DE)
Ultraviolett-Flächenstrahler Nu-72 ML	Konrad Benda Laborgeräte, Wiesloch (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB., Erlangen (DE)
Waage Toledo PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
Wärmeschrank	Heraeus GmbH & Co. KG, Hanau (DE)
Western-Blot-System Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zellkulturflasche T25 Standard	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zellkulturplatte 6, 12, 24, 48, 96 Well	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zellkulturschale 60, 100 mm	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht (DE)
Zentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Zentrifuge, Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (DE)
Zentrifuge, Mikro 200 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml) CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

## 2.2 Chemikalien und Puffer

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien und Puffer sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Amlexanox	Cayman Chemical, Hamburg (DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ataluren (PTC124)	Cayman Chemical, Hamburg (DE)
Betain	AppliChem, Darmstadt (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Cölbe (DE)
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
CutSmart Puffer	NEB, Frankfurt (DE)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
DNA-Größenmarker (DRAMA)	eigene Herstellung
DNA-Ladepuffer (6x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	GE Healthcare, München (DE)
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Dreieich (DE)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Hygromycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Luria/Miller Broth-Medium (LB-Medium)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Luminol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
MACSfectin®	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach (DE)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)

Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Nonidet P40 (NP-40)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Oligo-Primer (dT)	NEB, Frankfurt (DE)
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare, München (DE)
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) Mononatriumsalz (PIPES)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
PJK 2x Lysepuffer - dual concentrated buffer for Firefly, Renilla- and Gaussia-Assays	PJK GmbH, Kleinblittersdorf (DE)
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad, München (DE)
Q5 <sup>®</sup> DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt (DE)
Q5 <sup>®</sup> Reaktionspuffer (10x)	NEB, Frankfurt (DE)
Random Hexamer-Oligonukleotide (dNTP)	Agilent Technologies GmbH, Waldbronn (DE)
ROTI <sup>®</sup> Mount FluorCare 4',6-Diamidino-2- phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Shrimp-Alkaline-Phosphatase (rSAP)	NEB, Frankfurt (DE)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
T4 DNA-Ligase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
T4 10x Ligase-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)

Trishydroxymethylaminomethan-HCl sowie - Base (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Tween	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Wasserstoffperoxid 10% (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	AppliChem, Darmstadt (DE)
Zeocin	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierungspuffer	TBS-T 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 10% Methanol
ECL-Lösung	1 M Tris-HCl; 250 mM Luminol in DMSO 90 mM Cumarinsäure
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	19 mM Glycin; 25 mM Tris 0,1% Natriumlaurylsulfat
Phosphate Buffered Saline (PBS)	150 mM NaCl; 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
SDS Polyacrylamidgel Trenngel (10%) Sammelgel (4%)	3 M Tris (pH 6,8); 3 M Tris (pH 8,8); SDS (20%); Acrylamid (30%); TEMED; APS (10%)
SDS Probenpuffer (4x)	250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 8% SDS; 40% Glycerin; 0,4% Bromphenolblau; 100 mM DTT; 20% Mercaptoethanol
Super optimal broth with catabolite repression-Medium (SOC-Medium)	40 mM Glucose, LB-Medium

Standard Lysepuffer	50 mM Tris (pH 7,4); 150 mM NaCl 2 mM EDTA; 1% NP-40
Stripping Buffer	0,1 M NaOH
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8)
TRIS buffered saline + Tween20 (TBS-T)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 0,05 % Tween

### 2.3 Kits

Die für diese Arbeit verwendeten Kits sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel, Düren (DE)
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren (DE)
Phire Tissue Direct PCR Master Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)

## 2.4 Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper sind mit den jeweiligen Herstellern und deren Firmensitz in Tabelle 5 und 6 aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

<b>Antigen</b>	<b>Wirt</b>	<b>WB</b>	<b>Hersteller</b>
GAPDH	Maus	1:10.000	Abcam, Eching (DE)
NGLY1	Kaninchen	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (DE)
TCF11/NRF1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M. (DE)

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Wirt</b>	<b>WB</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:10.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M. (DE)
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:10.000	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M. (DE)

## 2.5 Primer

Die in der PCR zur Amplifikation von genetischem Material verwendeten DNA-Primer samt ihrer Sequenzen sind in Tabelle 7 gelistet. Alle Primer stammen vom Hersteller Sigma-Aldrich in Taufkirchen (DE).

Die mit ° markierten Primer wurden ausschließlich zur Sequenzierung von PCR-Produkten herangezogen.

Tabelle 7: DNA-Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
NGLY1- gRNA1 fwd	CACCGGGACTGAAGAACTTCTAGAA
NGLY1- gRNA1 rev	AAACTTCTAGAAGTTCTTCAGTCCC
NGLY1- p.Arg390Gln fwd	GTAGTTGATGTCACCTTGGCAATATTCCTGCAAACATGAAG
NGLY1- p.Arg390Gln rev	CTTCATGTTTGCAGGAATATTGCCAAGTGACATCAACTAC
NGLY1- p.R401* fwd	ACATGAAGAGGTGATTGCCTGAAGAACTAAGGTAAAGAAG
NGLY1- p.R401* rev	CTTCTTTAACCTTAGTTCTTCAGGCAATCACCTCTTCATGT
EcoRI-SS- C-Venus fwd	CTATAGAATTCCCATGGTACCGTGCACGC
NotI-stop- mCherry rev	CTATAGCGGCCGCTTACTTATAAAGCTCGTCCATGCCG
NGLY1 screening gRNA1 fwd <sup>o</sup>	AGGCTCTGACACAAATGTGGCT
NGLY1 screening gRNA1 rev <sup>o</sup>	TACAAGCCAACGCTTTCTCCTG

## 2.6 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 gelistet.

Tabelle 8: Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Insert	Referenz
IRES-mCherry C3-SS-C-Venus	pRetroX	mCherry, Venus	Zur Verfügung gestellt von Prof. Lars Steinmetz, EMBL, Heidelberg (Mueller et al., 2020)
C3-SS-C-Venus	pcDNA3	Venus	AG Tikkanen (abgeleitet aus o.g. Plasmid).
IRES-mCherry C3-SS-C-ddVenus	pRetroX	mCherry, ddVenus	Zur Verfügung gestellt von Prof. Lars Steinmetz, EMBL, Heidelberg (Mueller et al., 2020)
C3-SS-C-ddVenus	pcDNA3	ddVenus	AG Tikkanen (abgeleitet aus o.g. Plasmid).
mCherry	pcDNA3	mCherry	AG Tikkanen (abgeleitet aus o.g. Plasmid).
IRES-mCherry C3-SS-C-Venus	pSH-IRES-P	mCherry, Venus	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
IRES-mCherry C3-SS-C-ddVenus	pSH-IRES-P	mCherry, ddVenus	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
NGLY1	pcDNA <sup>TM</sup> 5/FRT	N-Glycanase-1	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

NGLY1-gRNA1	pSpCas9(BB)- 2A-Puro (PX459)	-	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
R390Q	pcDNA <sup>TM</sup> 5/FRT	N-Glycanase-1, Arginin 390 mutiert zu Glutamin	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
R401*	pcDNA <sup>TM</sup> 5/FRT	N-Glycanase-1, Arginin 401 mutiert zu Stoppcodon	Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

## 2.7 Bakterienkulturen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Kulturen entsprechen XL-1 Blue. Dabei handelt es sich um einen E. coli-Stamm, hergestellt von Stratagene in La Jolla (US), der im Rahmen dieser Arbeit zur Plasmidamplifikation genutzt wurde. Alle Kulturen wurden in LB-Medium bzw. SOC-Medium und im Anschluss auf LB-Agarplatten bei 37°C inkubiert.

## 2.8 Zelllinien und Nährmedien

Humane Zelllinien und die Parameter derer Kultivierung, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 9: Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Parameter
HEK-Flp-In <sup>TM</sup> -293 Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)	humane embryonale Nierenzellen, mit integriertem pFRT/lacZeo im Genom	DMEM ++ bei 8% CO <sub>2</sub> und 37°C

Tabelle 10: Nährmedien und deren Zusammensetzung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM ++	Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose 10% FCS 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin	Gibco, Dreieich (DE)

Es wurden sowohl Wildtyp- als auch NGLY1-Knock-Out-Zelllinien der HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293 verwendet.

### 3. Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Klonierung

Zur Amplifizierung aller DNA-Inserts wurde bei der Standard-PCR die Q5<sup>®</sup>-Polymerase verwendet. Das PCR-Protokoll wurde von der Firma NEB übernommen und ist in Tabelle 11 dargestellt. Die Annealing-Temperaturen wurden unter Zuhilfenahme vom NEB TM-Kalkulator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>) errechnet. Alle anderen Parameter sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Nach der PCR wurde das Produkt mittels Agarosegel-Elektrophorese, wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben, aufgetrennt. Danach erfolgte das Ausschneiden des zuvor definierten Signals und die Aufreinigung des PCR-Produkts mittels Nucleospin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-Up-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE). Im Anschluss wurde ein Verdau mit Hilfe von Restriktionsenzymen (NEB, Frankfurt, DE) durchgeführt, siehe hierzu Tabelle 13. Die Ligation wurde daraufhin bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. 12 Stunden mit der T4 DNA-Ligase (NEB, Frankfurt, DE) nach dem Standard-Protokoll der Firma NEB durchgeführt.

Tabelle 11: PCR Protokoll zur Klonierung

Reagenz	Volumina
5x Q5 <sup>®</sup> Reaktionspuffer mit MgCl <sub>2</sub>	4 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Primer forward (20 µM)	0,5 µl
Primer reverse (20 µM)	0,5 µl
Plasmid 0,1 - 1 µg/µl	0,5 µl
Q5 <sup>®</sup> DNA-Polymerase 2000 IU/ml	0,2 µl
dd H <sub>2</sub> O	ergänzend auf 20 µl Gesamtvolumen

Tabelle 12: PCR Parameter (Klonierung)

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	2 min
Denaturierung	98°C	30 s
Annealing	Primer-abhängig	20 s
Amplifikation	72°C	70 s
restliche Amplifikation	72°C	2 min

Die Schritte 2-4 wiederholen sich 39-mal.

Tabelle 13: Protokoll für den Restriktionsverdau des PCR Produkts

Reagenz	Volumina
gereinigtes PCR-Produkt/ Vektor	17 $\mu$ l/ 5 $\mu$ g
10x CutSmart Puffer	2 $\mu$ l
Restriktionsenzym EcoRI 10 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Restriktionsenzym NotI 10 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l

### 3.1.2 Bakterielle Transformation

Nach der Ligation erfolgte die bakterielle Transformation. Hierzu wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes E. coli (XL-1 Blue) eingesetzt. Dazu wurden 10  $\mu$ l einer Ligation hinzugegeben und für 30 Minuten auf Eis gelegt. Danach wurde ein Hitzeschock (45°C für 60 s) durchgeführt. Die Bakterien wuchsen für 45 Minuten ohne Selektionsdruck in 1 ml SOC-Medium bzw. LB-Medium und wurden dann auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden für etwa 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

Danach wurden einzelne Kolonien gepickt und je eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (250  $\mu$ g/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zur Vorbereitung für eine Midi-Präparation wurde mit 2 ml aus der vorangegangenen Kultivierung eine Kultur von 200 ml angesetzt.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte im ersten Schritt mit Hilfe des Nucleospin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE) für ein Volumen von 5 ml und ggf. mit dem Nucleobond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE) für ein Volumen von 200 ml, jeweils nach den Protokollen des Herstellers. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte im Anschluss mittels Tecan Infinite M 200 auf einer Nano Quant Plate®.

Hiernach erfolgten die Kontrollspaltung mittels Restriktionsenzymen und eine anschließende Auftrennung mittels Agarosegel-Elektrophorese. Bei positiver Kontrolle wurde im Anschluss eine Sequenzierung durchgeführt.

### 3.1.3 Mutagenese

Zur Herstellung der jeweiligen Varianten R390Q bzw. R401\* wurden die bereits in Tabelle 7 dargestellten Primer benutzt. Die Mutagenese fand mit Hilfe einer PCR statt,

wobei die DNA *in vitro* durch Punktmutationen verändert wird, um die jeweilige Mutation zu erhalten.

Die jeweiligen Primer waren dabei in DEPC-behandeltem Wasser mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  aufgelöst worden. Der Mutagenese-Ansatz wurde dann entsprechend Tabelle 14 in ein Eppendorf-Gefäß mit 0,2 ml Fassungsvermögen pipettiert und entsprechend dem Protokoll in Tabelle 15 bearbeitet.

Tabelle 14: Protokoll für den Mutagenese-Ansatz

Reagenz	Volumina
DEPC-behandeltes Wasser	40,5 $\mu\text{l}$
10x PCR Puffer	5 $\mu\text{l}$
Primer fwd 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$
Primer rev 10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{l}$
dNTPs	1 $\mu\text{l}$
Pfu-Turbo-Polymerase	1 $\mu\text{l}$
Plasmid-DNA (die mutiert werden soll)	0,5 $\mu\text{l}$ (entspricht 100-500 ng)

Tabelle 15: PCR-Parameter zur Mutagenese

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	1 min
Annealing	60°C	1 min
Amplifikation	68°C	12 min
restliche Amplifikation	68°C	7 min

Die Schritte 2-4 wiederholen sich 19-mal.

Die verarbeitete Probe wurde im Anschluss mit 5  $\mu\text{l}$  Natriumacetatlösung versetzt und resuspendiert. Im Anschluss wurden 110  $\mu\text{l}$  Ethanol (100%) dazugegeben und der Ansatz nochmal resuspendiert. Die anschließende Fällung fand bei -20°C für 30 Minuten statt. Danach wurde der Ansatz mit 12.000 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, dann erfolgten eine Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Ethanol (70-75%) und eine erneute Zentrifugation bei 12.000 g bei 4°C für 5 Minuten. Auch hiernach wurde der Überstand verworfen und das Pellett anschließend an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde das Pellett in 22,5  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

Mit Hilfe des anschließenden DpnI-Verdau wurde eingesetztes noch methyliertes Plasmid ohne Mutation zerschnitten. Die gesamte Probe (22,5 µl) wurde hierzu mit 2,5 µl 10x CutSmart Puffer und 1 µl DpnI versetzt und zunächst für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym für 10 Minuten bei 80°C. Im Anschluss erfolgten die bakterielle Transformation und das weitere Prozedere wie unter 3.1.2 beschrieben.

### **3.1.4 Agarosegel-Elektrophorese**

Zur Herstellung eines einprozentigen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose-Pulver in 150 ml 0,5x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt bis eine klare Flüssigkeit entstanden ist. Das Gel wurde anschließend mit einem Volumen von 20 ml jener Lösung gegossen. Die Konzentration des Ethidiumbromids lag im Gesamtvolumen bei 0,5 ng/ml. Zu einer 10 µl DNA-Probe wurden 2 µl DNA-Ladepuffer (6x) hinzugefügt. Beim verwendeten Marker handelte es sich um einen eigens hergestellten DNA-Größenmarker (DRAMA). Das Gel lief über einen Zeitraum von 30 bis 60 min, abhängig von der erwarteten Größe der DNA, bei einer Spannung von 100 V.

Die Methode diente zur Auftrennung bzw. der Isolation von DNA nach ihrer Größe und dem anschließenden Vergleich mit DNA bekannter Größe oder mit genormten DNA-Markern. Die Beurteilung erfolgte auf einem UV-Flächenstrahler und wurde fotografisch dokumentiert. Bei Bedarf wurde das entsprechende Signal ausgeschnitten und mit Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Düren, DE) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt.

### **3.1.5 SDS PAGE und Western Blot**

Für die SDS PAGE wurden zehnpromtente Polyacrylamid-Laufgele und vierpromtente Polyacrylamid-Sammelgele benutzt. Die zu ladende Gesamtproteinmenge wurde auf 30 µg in einem Volumen von 27 µl angepasst. Die Lysate wurden dann mit 9 µl SDS-Probenpuffer (4x) versetzt. Im Anschluss wurden die Proben bei 95°C für fünf Minuten gekocht, für eine Minute auf Eis abgekühlt und anschließend auf das Gel beladen. Die Laufzeit betrug etwa 90 Minuten. Anschließend wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Dauer betrug zwischen 1,5 und 2 Stunden. Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde eine Ponceau-Färbung angewandt.

Folgend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern zu vermeiden, wurde eine 30-minütige Inkubation mit dem Blockierungspuffer durchgeführt.

Die Primärantikörper wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-T, wurde der entsprechende Sekundärantikörper über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Membran für 30 Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde eine ECL-Lösung für zwei Minuten appliziert und das Signal mittels des LI-COR Odyssey XF digital dargestellt.

Falls nötig, wurde die Membran mit Hilfe von 0,1 M NaOH „gestrippt“, anschließend gewaschen, wieder mit Blockierungspuffer versetzt und dann mit einem anderen Primärantikörper für 12 Stunden bei 4°C inkubiert.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien**

Die Informationen zur Kultivierung der jeweiligen Zelllinien, sowie die Zusammensetzung der jeweiligen Medien, sind den Tabellen 9 und 10 zu entnehmen.

Zum Passagieren der Zelllinien wurde zunächst das Medium entfernt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten in 500 µl Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mittels FCS-haltigen Mediums gebremst. Nach Resuspension in Wachstumsmedium erfolgte die Aussaat der Zelllinien.

### **3.2.2 Transfektion**

Die Transfektion der Zelllinien HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293, sowie deren NGLY1-Knock-Out-Zelllinien, wurde mit dem Reagenz MACSfectin<sup>®</sup> durchgeführt. Die Zellen wurden in der Regel auf einer 12-Well-Platte ausgesät (siehe hierzu Abbildung 2) und bei einer Konfluenz von ca. 80% transfiziert. 0,75 µg DNA wurden zunächst in 100 µl DMEM gelöst. Im Falle der Co-Transfektion mehrerer Plasmide wurden diese immer zu jeweils gleichen Verhältnissen transfiziert. Sollte weder der Wildtyp noch eine Variante transfiziert worden sein, wurde als Platzhalter ein Leervektor (pcDNA5) transfiziert. Die Gesamtmenge der DNA blieb bei 0,75 µg. Anschließend wurden 3 µl MACSfectin<sup>®</sup> Reagenz in derselben Menge DMEM gelöst. Entsprechend bestand ein Verhältnis von

MACSfectin<sup>®</sup> Reagenz zu transfizierender DNA von 4:1. Die beiden Ansätze wurden zusammengemischt und resuspendiert. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert und im Anschluss tropfenweise auf die Zellen, die zuvor mit frischem Medium versetzt wurden, gegeben.

### 3.2.3 Herstellung von Proteinlysaten

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl Standard-Lysepuffer (mit 2 µl Protease-Inhibitor-Cocktail) oder PJK Lysepuffer auf Eis abgetragen. Anschließend wurde das Lysat bei -20°C für 12 Stunden eingefroren. Nach dem Auftauen erfolgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall für drei Sekunden. Im Anschluss wurde das Lysat bei 12.000 g für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entsprechend überführt.

Die Gesamtproteinmenge des Lysats wurde mittels Bio Photometer Plus (Eppendorf, Hamburg, DE) gemessen.

### 3.2.4 CRISPR/Cas9-vermittelter Knock-Out von NGLY1 in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen

Das CRISPR/Cas9-System dient dazu, zuvor definierte Stellen der DNA umzuändern. Die Nuklease Cas9 induziert dazu Doppelstrangbrüche in der DNA. Die Navigation der Cas9 erfolgt mittels genspezifischer Single Guide RNAs (gRNA). Die zugefügten DNA-Doppelstrangbrüche werden dann vom zelleigenen Reparatursystem zufällig (nicht-homolog) oder gezielt (homolog) wieder zusammengefügt.

In der vorliegenden Arbeit wurde wie in 3.2.2 beschrieben eine Transfektion mit der NGLY1-gRNA1 im Plasmid PX459 (1 µg/ml) auf einer 6 cm Schale durchgeführt (5 µg CRISPR-Plasmid in 250 µl DMEM und 20 µl MACSfectin<sup>®</sup> Reagenz in 250 µl DMEM). Durch die vorhandene Puromycin-Resistenz ist am 3. Tag nach Aussaat der Zellen eine Selektion nach Zugabe von DMEM +/- mit Puromycin (2 µg/ml) über 24 Stunden durchgeführt worden. Nach serieller Verdünnung mittels Neubauer-Zählkammer auf eine theoretische Anzahl von einer Zelle pro 200 µl Medium wurden die Zellen am 4. Tag auf einer 96-Well-Platte ausgesät, wobei anschließend nur Wells mit je einem Zellklon weitergeführt werden. Nach konfluentem Wachstum wurden die einzelnen Wells auf eine 24-Well-Platte und daraufhin auf eine 12-Well-Platte überführt.

Die Kontrolle der Klone erfolgte mittels Phire Tissue Direct PCR Master Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE) nach Herstellerprotokoll unter Verwendung der Primer NGLY1 screening gRNA1 fwd und NGLY1 screening gRNA1 rev (siehe Tabelle 14 und 15).

Tabelle 16: PCR-Parameter für Phire Tissue

Reagenz	Volumina
2x Tissue Mix	10 µl
Zelllysat	1 µl
Primer forward (20 µM)	0,5 µl
Primer reverse (20 µM)	0,5 µl
dd H <sub>2</sub> O	4 µl

Tabelle 17: PCR-Protokoll für Phire Tissue

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Denaturierung	98°C	10 s
Annealing	60°C	30 s
Amplifikation	72°C	60 s

Die Schritte 2-4 wiederholen sich 39-mal.

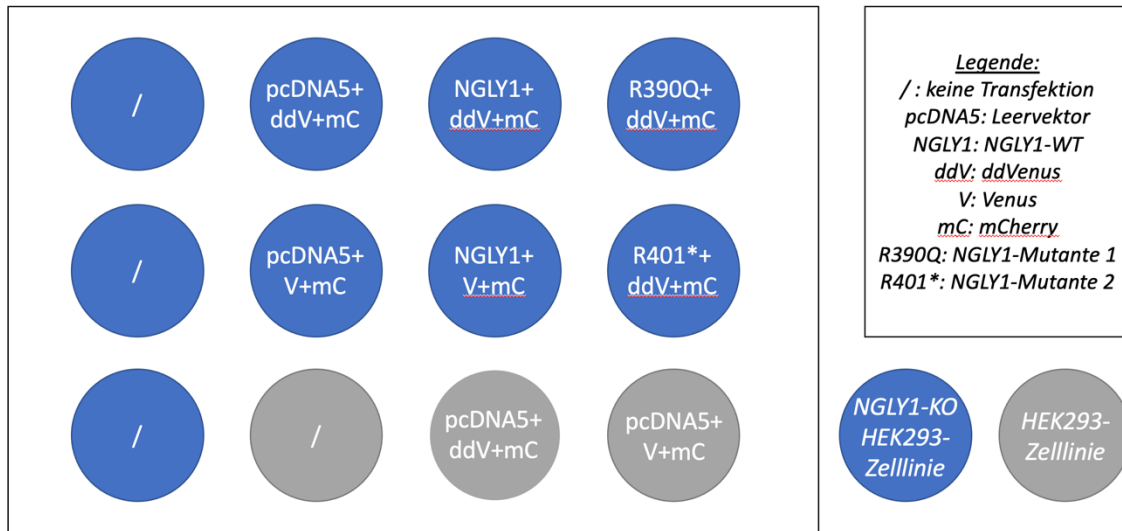
Das PCR-Produkt wurde anschließend wie in 3.1.3 beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und aufgereinigt, um es dann zur Kontrolle zu sequenzieren.

### 3.2.5 NGLY1-Aktivitätsmessung

Nach der Transfektion nach gegebenem Schema (siehe Abbildung 2) wurden die transfizierten Zellen jeweils doppelt auf 6-Well- bzw. 48-Well-Platten ausgesät. Bei der Transfektion wurden entweder der Leervektor pcDNA5, die NGLY1 Isoform 1/WT oder eine der Varianten R390Q bzw. R401\* transfiziert. Dazu wurden im gleichen Verhältnis mCherry und ddVenus bzw. Venus transfiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls versucht einen Tandem-Assay mit IRES-mCherry C3-SS-C-ddVenus/-Venus zu etablieren. Da kein Nachweis einer erfolgreichen Transfektion erbracht werden konnte, wurde die Aktivitätsmessung, wie beschrieben, mit den einzeln transfizierten Plasmiden durchgeführt.

Nach 24 Stunden wurde das Medium in jeweils einem der doppelt angelegten Wells auf ein Medium mit 2  $\mu\text{M}$  MG132 gewechselt. Nach weiteren 12 Stunden fand die Zellernte der 6-Well-Platten statt.

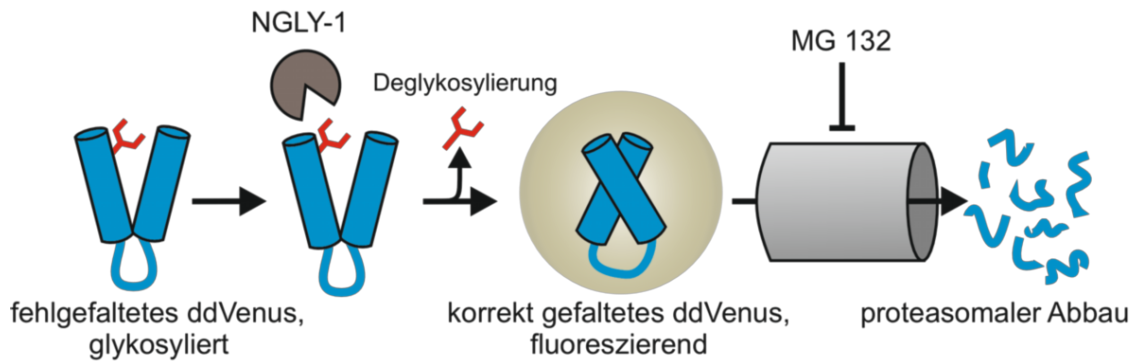


**Abbildung 2: Beispielhaftes Transfektionsschema einer 12-Well-Platte**

Sofern Medikamentenbehandlungen durchgeführt werden sollten, wurden die Zellen entsprechend mit Betain (10 mM), Amlexanox (25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ ) oder Ataluren (17  $\mu\text{M}$ ) für 8 Stunden oder 48 Stunden (je nach Versuchsaufbau) inkubiert.

Die Lyse der Zellen fand wie unter 3.2.3 mit PJK Lysepuffer statt. Die Messung der Fluoreszenz wurde auf einer Mikroplatte OptiPlate-96 F (schwarz) durchgeführt. Hier wurden 100  $\mu\text{l}$  Wasser mit 40  $\mu\text{l}$  Lysat gemessen. Für die Fluoreszenz von mCherry wurde eine Exzitationswellenlänge von 561 nm eingestellt und die Emission bei 610 nm gemessen. Für die Fluoreszenz von Venus wurde eine Exzitationswellenlänge von 488 nm eingestellt und die Emission bei 530 nm gemessen. Bei den 48-Well-Platten wurde das Medium abgesaugt, daraufhin wurde 100  $\mu\text{l}$  PBS pro Well dazugegeben und im Anschluss direkt eine Fluoreszenzmessung mit den oben genannten Parametern durchgeführt.

Die Grundlage für den Fluoreszenzassay bildet das fehlgefaltete, glykosylierte ddVenus (eine Abwandlung des GFP; siehe Abbildung 3) (Grotzke et al., 2013; Mueller et al., 2020, 2022b).



**Abbildung 3: Funktionsprinzip des angewandten Fluoreszenzassays.**

Aufgrund der vorhandenen Glykosylierung von ddVenus ist es fehlgefaltet und nicht fluoreszierend. Nachdem die N-Glycanase-1 die Deglykosylierung ermöglicht, erfolgt eine Konformationsänderung in korrekt gefaltetes und somit auch fluoreszierendes ddVenus (vereinfacht auch Venus genannt). Dieses wird im Verlauf proteasomal abgebaut. Um diesen Abbau zu bremsen, wird ein Proteasominhibitor verwendet (hier: MG 132). Dadurch akkumuliert möglichst viel fluoreszierendes ddVenus/Venus und ermöglicht eine Fluoreszenzmessung.

Jenes fluoresziert nur wenn eine funktionierende N-Glycanase-1 das ddVenus deglykosyliert. Damit kann indirekt eine Aktivität der N-Glycanase-1 über die Fluoreszenz des ddVenus ermittelt werden. Das korrekt gefaltete Venus dient hierbei parallel als Positivkontrolle und Orientierungsmaßstab für die mögliche Fluoreszenz. Um die gemessene Fluoreszenz von Venus bzw. ddVenus in ein korrektes Verhältnis zu setzen, wurde mCherry co-transfiziert und die Fluoreszenz von Venus bzw. ddVenus in Relation zur Fluoreszenz gesetzt. Zuvor wurde die jeweilige Eigenfluoreszenz der untransfizierten Zellen sowohl für mCherry als auch Venus bzw. ddVenus subtrahiert.

### **3.3 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung**

#### **3.3.1 Statistik**

Alle aufgeführten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Mit Hilfe der GraphPad Prism® 5.04 Software (Kalifornien, USA) erfolgte die statistische Analyse. Zur Auswertung wurde die einseitige als auch die zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

#### **3.3.2 Elektronische Manipulation der Abbildungen**

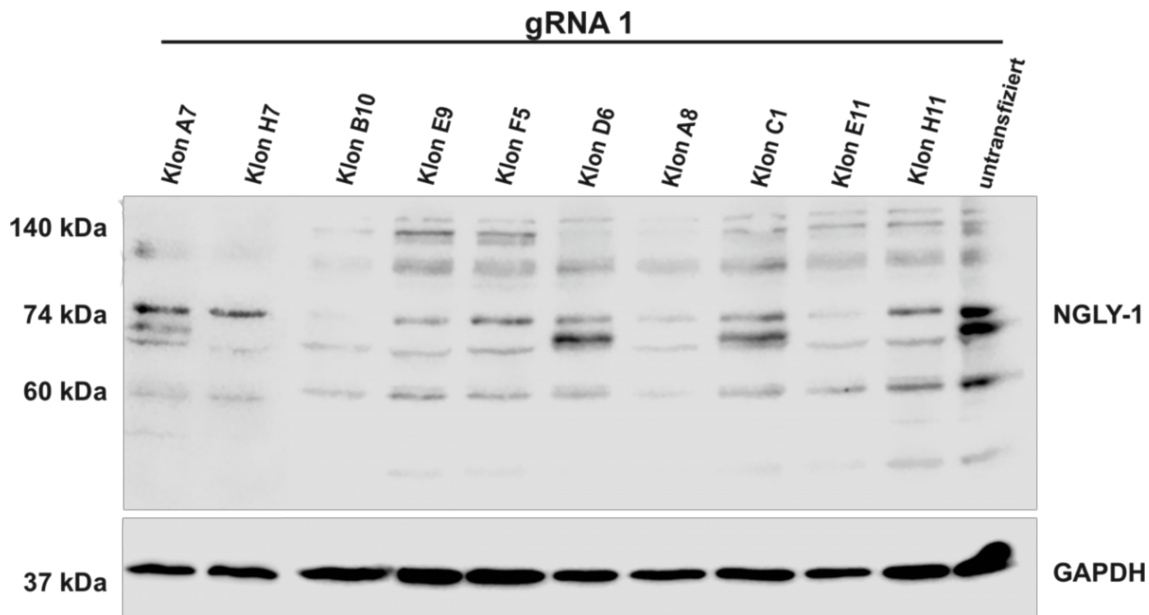
Die dargestellten Abbildungen wurden durch Kontrast- oder Helligkeitseinstellungen angepasst. Alle Manipulationen wurden für die gesamte Fläche durchgeführt. Andere Manipulationen wurden nicht durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Generierung einer NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In-Zelllinie

Um eine ausführliche Untersuchung der N-Glycanase-1 zu ermöglichen, war es notwendig, eine geeignete Zelllinie auszuwählen und anschließend eine N-Glycanase-1-Knock-Out-Zelllinie zu generieren. Letzteres wurde mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methodik umgesetzt. Bei dem ausgewählten Zellmodell handelt es sich um HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Thermo Fisher Scientific, Waltham). Diese haben den Vorteil einer hohen Erfolgsrate hinsichtlich der transienten Transfektion sowie die erweiterte Möglichkeit, genomische Knock-In-Varianten vereinfacht zu generieren (Craig, 1988; Sauer, 1994).

Es konnten nach Durchführung des CRISPR/Cas9-Protokolls mehrere Zellklone mit einem möglichen Knock-Out für NGLY1 identifiziert werden. Die Abbildung 4 zeigt einen Western Blot, der die Expression von NGLY1 in möglichen Knock-Out Kandidaten darstellt. Das heterogene Muster der Signale des Western Blots lässt sich wahrscheinlich auf die verschieden prozessierten NGLY1-Varianten sowie die unterschiedlichen Isoformen von NGLY1 zurückführen. Zielführend ist die Betrachtung der stärksten Signale auf der Höhe von 74 kDa, wie sie bei den untransfizierten HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen am deutlichsten zu sehen ist. Daraus ergaben sich, unter anderem, die Klone H7, B10, A8 und E11 als mögliche NGLY1-Knock-Out Zelllinien. Diese wurden mit Hilfe der jeweiligen Screening-Primer sequenziert (siehe Tabelle 7). Die Klone A8 und H7 stellten sich dabei als einzige homozygote NGLY1-Knock-Out Zelllinien dar, die eine Insertion einer Thymin-Base und damit eine Leserasterverschiebung aufwiesen, während B10 und E11 nur heterozygot mutiert waren und keine sichere Leserasterverschiebung aufwiesen. Da die Klone A8 und H7 genetisch identisch waren, wurden die folgenden Versuche mit einem der beiden Klone, in diesem Fall Klon A8, durchgeführt.



**Abbildung 4: Western Blot der HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen mit Nachweis von NGLY1 in Lysaten.**

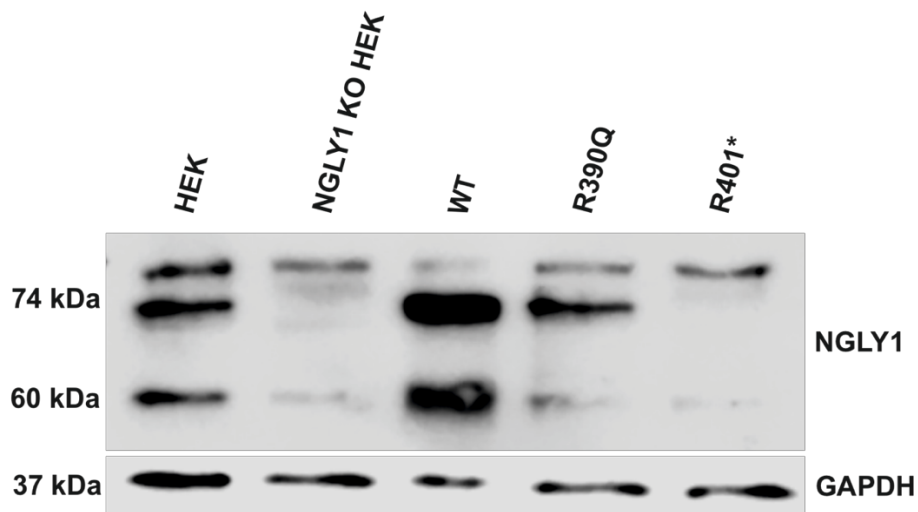
HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen wurden kultiviert, nach dem CRISPR/Cas9-Protokoll selektiert und lysiert. Die Immundetektion wurde nach der SDS-PAGE und dem Western Blot mit NGLY1-Antikörpern durchgeführt. Der Western Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dar. Bei ca. 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

## 4.2 Expression der NGLY1 Genvarianten R390Q und R401\* nach transienter Transfektion in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen

Zur Charakterisierung der beiden krankheitsverursachenden Varianten von NGLY1 musste auch die mögliche Immundetektion im Western Blot bzw. deren Expressionsverhalten untersucht werden. Hierzu wurden die beiden Varianten R390Q und R401\* herangezogen und entsprechend in die von HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (NGLY1-KO) transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für mindestens 12 Stunden mit dem Proteasominhibitor MG132 inkubiert. Dies verhindert eine potenzielle proteasomale Degradation der beiden zu untersuchenden Varianten.

Die Variante R390Q stellt dabei eine Missense-Mutation dar, bei der an der 390. Stelle Arginin gegen Glutamin ausgetauscht wurde. R401\* ist die bisher am häufigsten vorkommende pathogene Variante von NGLY1. Dabei handelt es sich um eine Nonsense-Mutation, die zu einem Stoppcodon führt.

In Abbildung 5 ist der entsprechende Western Blot zu sehen. Das endogen exprimierte NGLY1 ist in der ersten Spalte zu sehen, hier sind prominente Signale bei 74 kDa sowie eine bei 60 kDa zu sehen. Diese Signale sind in der KO-Variante entsprechend nicht mehr bzw. stark abgeschwächt zu erkennen. Nach Transfektion des Wildtyps von NGLY1 nimmt die Intensität der Signale bei 74 kDa und der bei 60 kDa wieder zu. Die Intensität der Signale ist höher als die bei endogener NGLY1 Expression. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Annahme einer Überexpression nach transienter Transfektion des Wildtyps. Nach der Transfektion der Variante R390Q ist ebenfalls eine Signalzunahme im Vergleich zur KO-Variante bei 74 kDa erkennbar. Damit ist die Variante R390Q weiterhin mittels NGLY1-Antikörper nachweisbar. Bei der Transfektion der Variante R401\* hingegen ist kein Signal nachweisbar. Gelegentlich zeigte sich ein Signal bei ca. 40 kDa. Da diese sporadisch auftrat, wird sie nicht als definitives Ergebnis in dieser Arbeit dargestellt. Das Signal entspräche am ehesten dem verkürzten NGLY1 mit 401 Aminosäuren. Insgesamt unterscheiden sich die beiden Varianten in der Nachweisbarkeit mittels Immundetektion.



**Abbildung 5: Western Blot der HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Non-KO und KO) mit Nachweis von NGLY1 in Lysaten nach Zugabe von MG132.**

HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen wurden transfiziert (nur NGLY1-KO), mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert und anschließend lysiert. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g der jeweiligen DNA (WT, R390Q oder R401\*). Die Immundetektion wurde nach der SDS-PAGE und dem Western Blot mit NGLY1-Antikörpern durchgeführt. Der Western Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen dar. Bei ca. 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

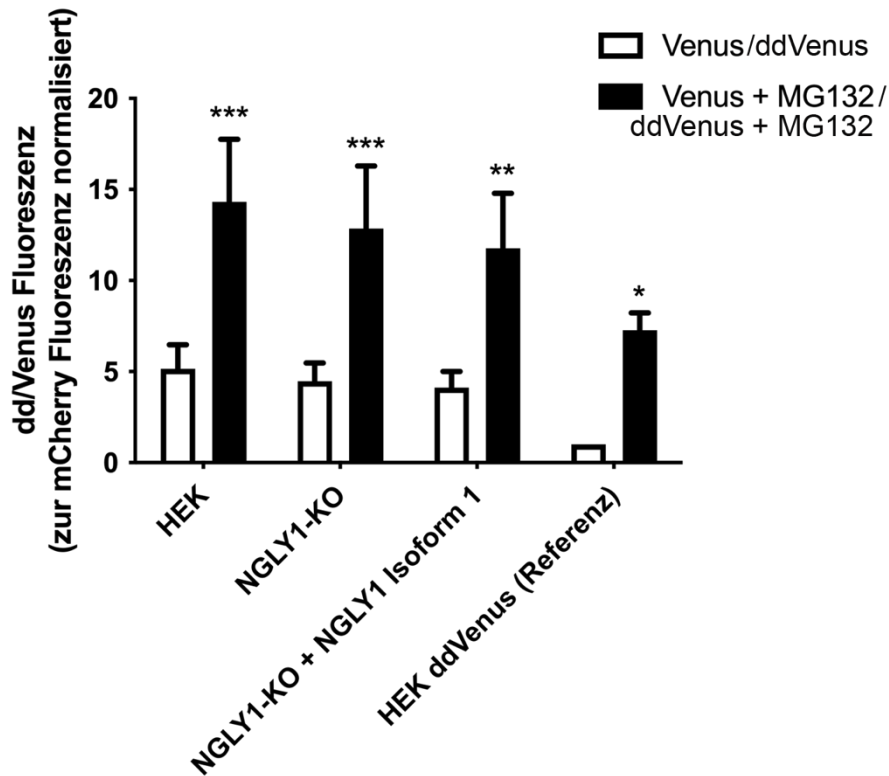
### 4.3 Etablierung eines Aktivitätsassays für NGLY1 in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen

Bevor man die Aktivität von NGLY1 analysieren kann, muss der Aktivitätsassay zunächst etabliert werden. Hierzu wurden unterschiedliche Parameter miteinander verglichen und ergänzend durch statistische Tests in ihrer Signifikanz eingestuft bzw. überprüft.

Geplant war zunächst einen Tandem-Assay zu etablieren, bei dem mCherry mit ddVenus bzw. Venus als Tandem innerhalb eines Plasmids transfiziert werden sollten. Eine ausreichende Transfektion konnte nicht etabliert werden, daher wurden mCherry und ddVenus bzw. Venus einzeln kloniert und anschließend transfiziert.

Des Weiteren sollte der Assay ebenfalls mit lebenden Zellen in 48-Well-Platten etabliert werden, um so eine leichtere und schnelle Handhabung ohne Lyse der Zellen zu ermöglichen. Die Ergebnisse waren inkonsistent und nicht eindeutig interpretierbar, sodass der Aktivitätsassay in der Versuchsreihe nach einer Zelllyse durchgeführt werden musste.

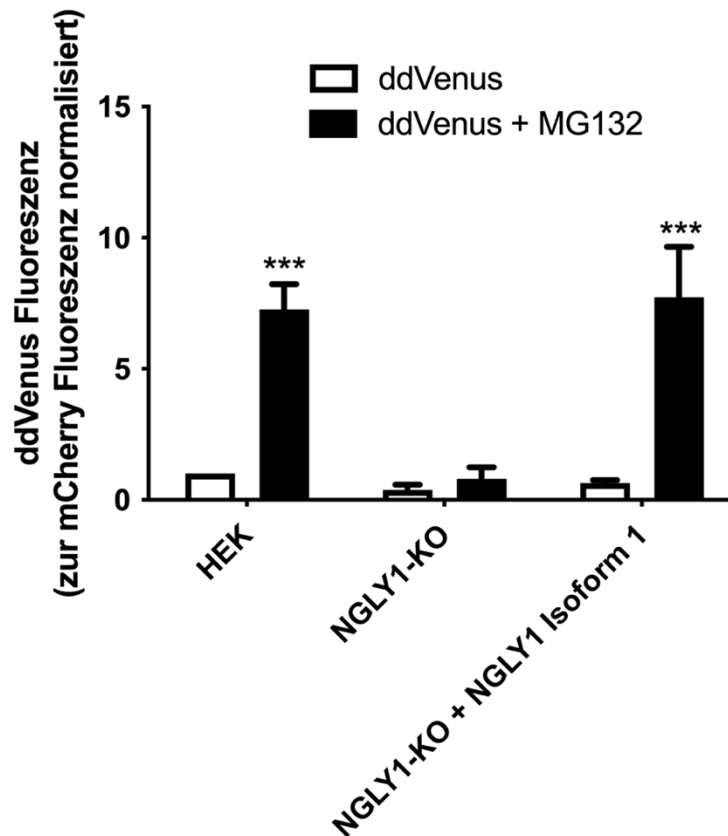
Im Rahmen der Etablierung sollte auch festgestellt werden, welchen Einfluss der Proteasominhibitor MG132 auf die Fluoreszenzmessung hat. In Abbildung 6 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellkultur mit 2  $\mu$ M MG132 (Proteasominhibitor) für 24 Stunden die messbare Fluoreszenz von Venus steigert und dadurch eine vereinfachte Messbarkeit ermöglicht. Ein verminderter proteasomaler Abbau von Venus bzw. ddVenus durch MG132 ist anzunehmen. Die Steigerung der Fluoreszenz ist bei HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (HEK) sowie deren NGLY1-KO-Zelllinie im Vergleich zu deren Fluoreszenz ohne MG132 sehr hoch signifikant. Nach Transfektion von NGLY1 in der KO-Zelllinie ist die Fluoreszenzzunahme im Vergleich dazu ohne MG132 hoch signifikant. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen herangezogen (ddVenus Fluoreszenz ohne MG132 = 1). Damit wird als Standardreferenz die Fluoreszenz von ddVenus unter endogener Expression, damit ohne zusätzliche Transfektion von NGLY1 oder deren Varianten, festgelegt.



**Abbildung 6: Fluoreszenzassay von Venus/ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren NGLY1-KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. NGLY1 Isoform 1 sowie +/- MG132.** HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (parental und NGLY1-KO) wurden transfiziert, zum Vergleich mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben dem Leervektor pcDNA5 oder dem NGLY1 WT/Isoform 1 wurden Venus bzw. ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Venus fluoresziert selbstständig ohne Einwirkung von NGLY1, damit ist die Fluoreszenz in den ersten 3 Spalten vergleichbar zueinander. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus ohne MG132 auf 1 gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurde die zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei stehen \*\*\* für sehr hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ), \*\* für hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) und \* für signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ).

Die Bedingungen, die nun für Venus angenommen werden konnten, mussten auf das von der Deglykolysierungs-abhängigen ddVenus übertragen werden. Hierzu wurde die Fluoreszenz von ddVenus in den folgenden Zellmodellen: HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293, deren NGLY1-KO-Variante nach Transfektion von pcDNA5 und jene nach Transfektion von NGLY1 nach Zugabe von MG132 verglichen.

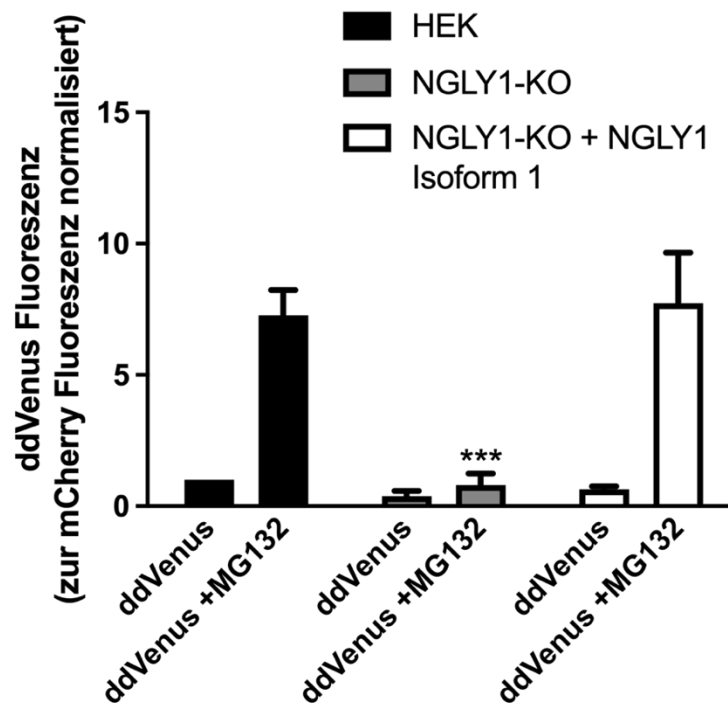
Auch hier bestätigte sich die sehr hoch signifikante Zunahme der Fluoreszenz nach Zugabe von MG132 für die HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen und deren KO-Zelllinie nach zusätzlicher Transfektion von NGLY1. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen herangezogen (ddVenus Fluoreszenz ohne MG132 = 1).



**Abbildung 7: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren NGLY1-KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. NGLY1 Isoform 1 sowie +/- MG132.**

HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (parental und NGLY1-KO) wurden transfiziert, zum Vergleich einmal mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben dem Leervektor pcDNA5 oder dem NGLY1 WT/Isoform 1 wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Zur statistischen Auswertung wurde die zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei stehen \*\*\* für sehr hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ), \*\* für hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) und \* für signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ).

In der Annahme, dass die ddVenus-Fluoreszenz von der Enzymaktivität von NGLY1 abhängig ist, dürfte keine oder eine nur sehr geringe Fluoreszenz in der KO-Zelllinie nach Transfektion von ddVenus messbar sein. In Abbildung 7 ist dies bereits ersichtlich. Abbildung 8 stellt eine andere Darstellung der Ergebnisse von Abbildung 7 dar und soll dieses Ergebnis nochmals aus anderer Perspektive zeigen. Die Fluoreszenz von ddVenus (unter Zugabe von MG132) in der NGLY1-KO-Zelllinie ist im Vergleich zur Referenz (ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen) sehr hoch signifikant verringert. Damit bestätigt sich die Abhängigkeit der Fluoreszenz von ddVenus von der Expression von NGLY1. Sofern keine enzymatisch aktive N-Glycanase-1 vorhanden ist, kann ddVenus nicht in seine fluoreszierende Form übergehen.



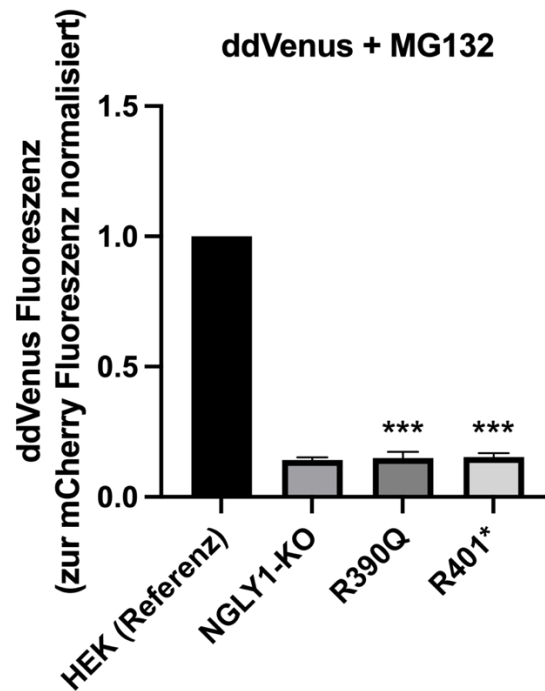
**Abbildung 8: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. NGLY1 Isoform 1.**

HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (parental und NGLY1-KO) wurden transfiziert, zum Vergleich einmal mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben dem Leervektor pcDNA5 oder dem NGLY1 WT/Isoform 1 wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Zur statistischen Auswertung wurde die zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt.

Dabei stehen \*\*\* für sehr hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ), \*\* für hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) und \* für signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ).

#### **4.4 Charakterisierung der Varianten R390Q und R401\* in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen**

Zur Charakterisierung der Proteinvarianten R390Q und R401\* wurde der zuvor für NGLY1 etablierte Aktivitätsassay angewandt. Ziel war es, ein mögliches Aktivitätsniveau der beiden zu untersuchenden Mutanten festzustellen. Dafür wurden die lysierten Proben nach Transfektion mit den Varianten R390Q oder R401\* dem Fluoreszenzassay zugeführt. Abbildung 9 zeigt die Fluoreszenz nach Transfektion der Plasmide im Vergleich zur Fluoreszenz bei NGLY1-KO HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen bzw. zur Referenz (HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen mit endogen exprimiertem NGLY1). Hier ist zu sehen, dass die Fluoreszenz nach Transfektion der mutierten Plasmide, verglichen mit der Referenz, sehr hoch signifikant vermindert ist. Sie entspricht annähernd der Fluoreszenz der Knock-Out-Zelllinie und damit der anzunehmenden Hintergrundfluoreszenz. Somit ist davon auszugehen, dass bei beiden Varianten keine bzw. nur sehr geringe Enzymaktivität vorliegt.



**Abbildung 9: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren NGLY1-KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. Varianten R390Q und R401\*.**

HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (parental und NGLY1-KO) wurden transfiziert, kultiviert, mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben pcDNA5, R390Q und R401\* wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus mit MG132 auf 1 (HEK) gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei stehen \*\*\* für sehr hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ), \*\* für hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) und \* für signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ).

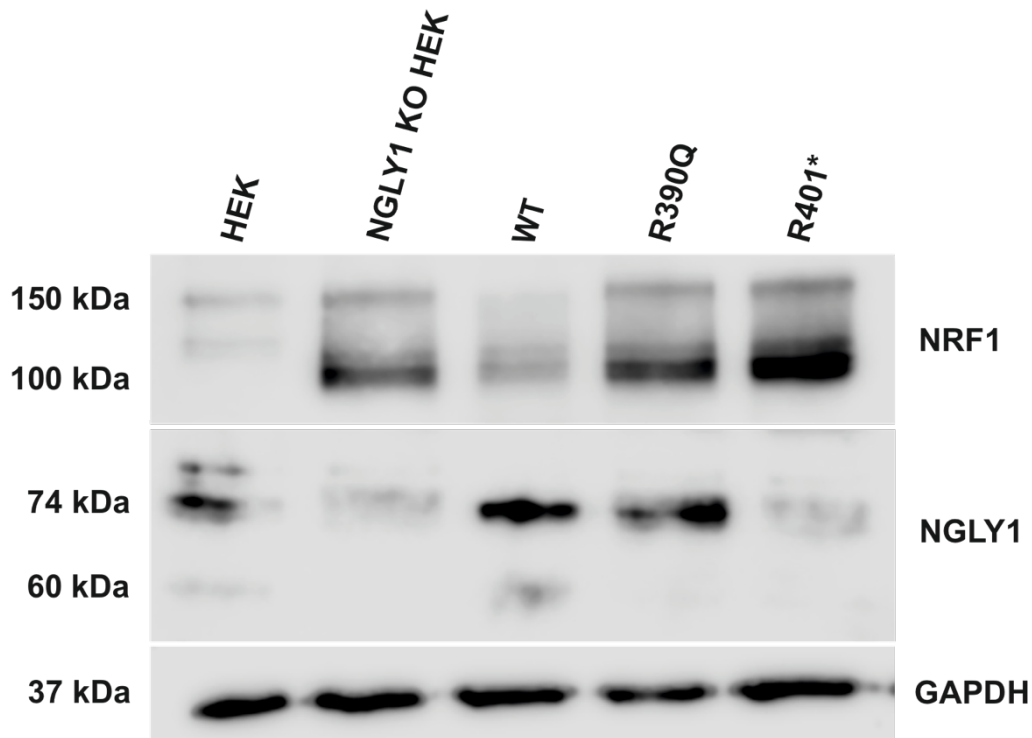
## 4.5 Expression von NRF1 in NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In Zellen

Da NGLY1 für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NRF1 (auch NFE2L1 genannt) eine tragende Rolle spielt, wurde die Expression von NRF1 in Abhängigkeit von NGLY1 bzw. dessen pathogenen Varianten mittels Western Blot untersucht.

Durch die unterschiedliche Prozessierung von NRF1 sind multiple Signale mit Hilfe des NRF1-Antikörpers im Western Blot detektierbar (siehe Abbildung 10). In den untransfizierten HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen ist NRF1 bei ca. 120 und 150 kDa nachzuweisen. Das Signal bei ca. 150 kDa wird als vollständige Form von NRF1 verstanden, während das Signal bei 120 kDa der prozessierten Form entspricht. In der KO-Zelllinie ist ein verstärktes Signal bei ca. 100 kDa und eine schwächere bei ca. 150 kDa zu erkennen. Dies deckt sich mit der Annahme, dass falsch prozessiertes NRF1 in Abwesenheit von NGLY1 akkumuliert. Zum einen weist es ein anderes Molekulargewicht auf, und zum anderen ist es in einer anderen Menge nachweisbar. Durch Transfektion des NGLY1-Wildtyps ist diese Akkumulation nicht vollständig reversibel: Das prominente Signal verbleibt bei ca. 100 kDa. Die Signale sind jedoch insgesamt schwächer.

Nach Transfektion der Varianten lässt sich kein Unterschied zum Verhalten von NRF1 in der KO-Zelllinie erkennen. Auch hier ist eine Akkumulation von NRF1 in verstärkt prozessiertem Zustand anzunehmen. Die Menge des akkumulierten NRF1 scheint dabei bei der Variante R401\* am höchsten zu sein.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Akkumulation von falsch prozessiertem NRF1 in der KO-Zelllinie ohne Transfektion und nach Transfektion der Varianten R390Q und R401\* stattfindet. Eine Tendenz zur Kompensation dieser Akkumulation nach Transfektion des NGLY1-Wildtyps konnte nachgewiesen werden.



**Abbildung 10: Western Blot der HEK-Flp-In™-293-Zellen (parental und KO) mit Nachweis von NRF1 und NGLY1 in Lysaten.**

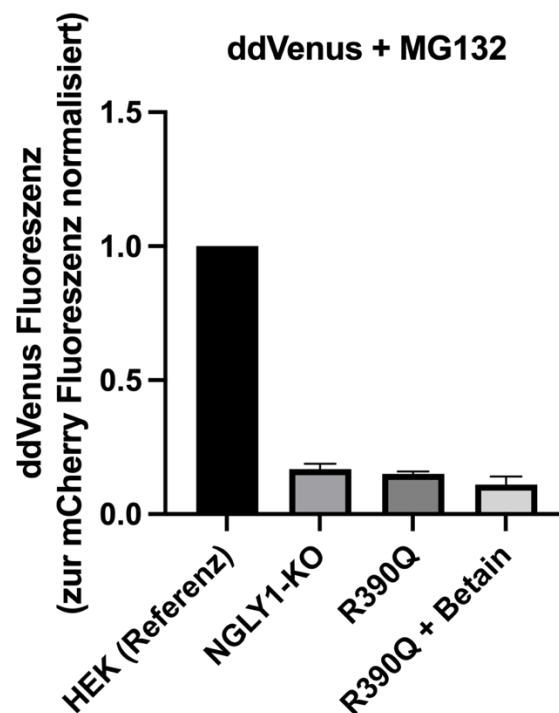
HEK-Flp-In™-293-Zellen wurden transfiziert (nur NGLY1-KO), mit MG 132 (2  $\mu$ M) inkubiert und anschließend lysiert. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin® und 0,75  $\mu$ g der jeweiligen DNA (pcDNA5, NGLY1 Isoform 1/WT, R390Q oder R401\*). Die Immundetektion wurde nach der SDS-PAGE und dem Western Blot mit NRF1- und NGLY1-Antikörpern durchgeführt. Der Western Blot stellt ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten Versuchen dar. Bei ca. 37 kDa ist der Nachweis von GAPDH als Ladekontrolle zu sehen.

## 4.6 Einfluss von Medikamenten auf die Aktivität der Genvarianten

### R390Q und R401\*

Nach Feststellung des niedrigen enzymatischen Aktivitätsniveaus der beiden Varianten R390Q und R401\*, geht es im Weiteren darum, festzustellen, inwieweit sich diese Aktivität medikamentös beeinflussen lässt. Die Variante R390Q wurde dabei hinsichtlich einer möglichen Aktivitätsänderung bei der Behandlung mit einer 10 mM Betain-Lösung untersucht. Betain wurde genutzt, da dieses als pharmakologisches Chaperon positive Effekte bei bestimmten Varianten der Aspartylglucosaminurie zeigte (Banning et al., 2016). Nach der Transfektion wurde hierfür das Medium der Zellkultur für 48 Stunden

mit 10 mM Betain versetzt. In Abbildung 11 ist gezeigt, dass die Fluoreszenz bzw. die Aktivität der Variante R390Q nicht positiv durch Betain beeinflussbar ist. Die Fluoreszenz nimmt nach Zugabe von Betain ab, ist jedoch nicht signifikant verändert.



**Abbildung 11: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. der Variante R390Q und anschließender Behandlung mit Betain.**

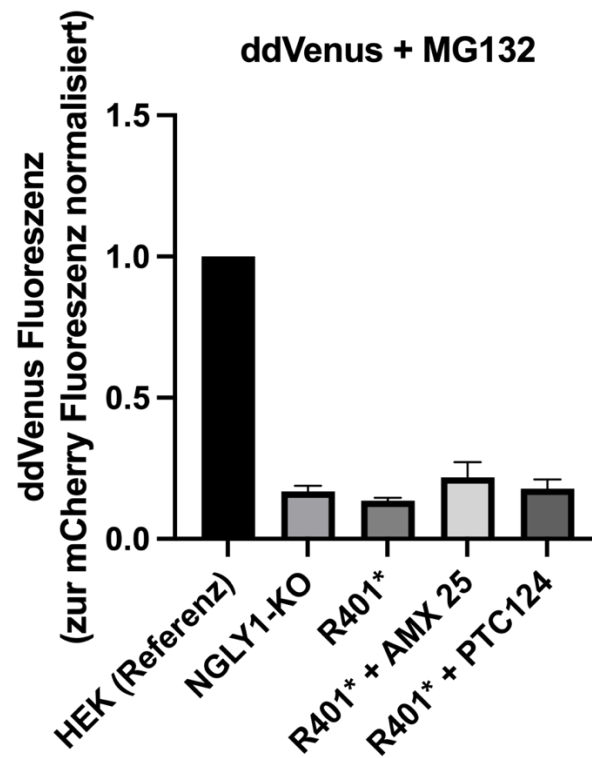
HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Non-KO und NGLY1-KO) wurden transfiziert, kultiviert, mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben pcDNA5 bzw. der Variante R390Q wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus mit MG132 auf 1 (HEK) gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse nicht signifikant.

Da die Variante R401\* zu einem Stoppcodon führt, wurde deren Aktivitätsverhalten hinsichtlich des Einsatzes von sogenannten Readthrough-Substanzen untersucht. Readthrough-Substanzen sollen bei der Translation dazu führen, dass Nonsense-Mutationen supprimiert und „überlesen“ werden. Dadurch sollte es im Optimalfall zu einer Expression von intakten Proteinen kommen.

Amlexanox ist eine Readthrough-Substanz, die bereits eine Zulassung in den USA zur Behandlung von Aphthen in der Mundhöhle innehat (Uma Maheswari & Shanmugasundaram, 2013a). Im folgenden Versuch wurde Amlexanox (Cayman Chemical, US) mit einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  mit 48 Stunden Inkubationszeit in der Zellkultur nach Transfektion der Variante R401\* dazugegeben und nach Zelllyse der Fluoreszenzmessung zugeführt. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 12 gezeigt. Es ist keine signifikante Zunahme der Fluoreszenz nach Amlexanox-Behandlung registrierbar. Damit ist ein positiver Einfluss auf die Expression von enzymatisch aktivem NGLY1 trotz der R401\* Mutation höchstens in nur geringem Maße anzunehmen.

Eine Alternative zu Amlexanox ist Ataluren (auch PTC124, Cayman Chemical, US). Ataluren soll, ähnlich wie Amlexanox, die Translation so beeinflussen, dass vorzeitige Stoppcodons überbrückt werden und so ein vollständiges Protein exprimiert werden kann (Hirawat et al., 2007). In der EU wurde Ataluren 2014 zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie zugelassen (Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL) – Ataluren, 2015).

Nach der Transfektion der Variante R401\* wurde die Zellkultur mit Ataluren (17  $\mu\text{M}$ ) für 48 Stunden inkubiert, anschließend lysiert und der Fluoreszenzmessung zugeführt. Die angewandten Konzentrationen wurden bereits zuvor in anderen Versuchen etabliert (Banning et al., 2018). Wie bei Amlexanox, konnte auch hier keine signifikante Zunahme der Fluoreszenz registriert werden. Damit ist auch hier kein bzw. ein nur sehr geringer Einfluss auf die Enzymaktivität anzunehmen.



**Abbildung 12: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. der Variante R401\* und anschließender Medikamentenbehandlung mit Amlexanox (AMX) bzw. Ataluren (PTC124).**

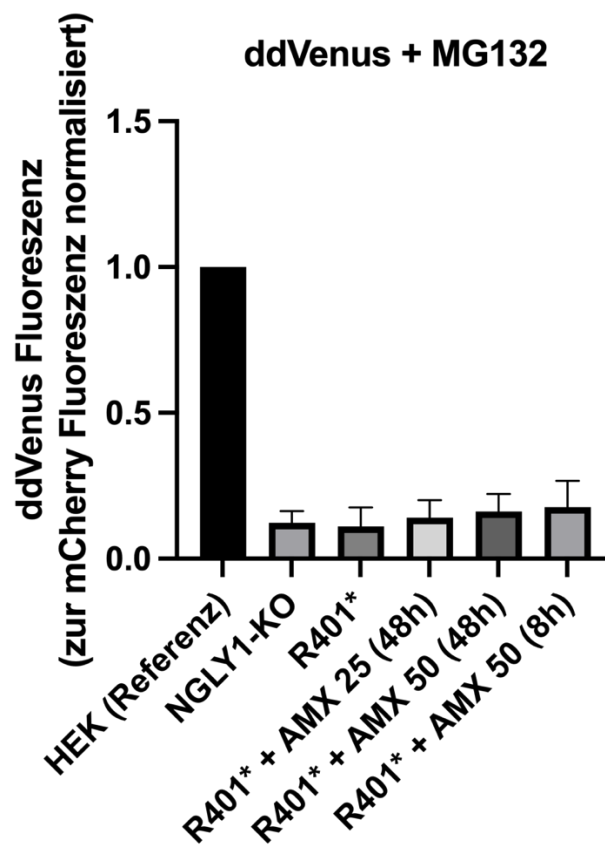
HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Non-KO und NGLY1-KO) wurden transfiziert, kultiviert, mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben pcDNA5 bzw. der Variante R401\* wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus mit MG132 auf 1 (HEK) gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse nicht signifikant.

Da bei Zugabe von Amlexanox (25  $\mu$ M) eine geringfügige Steigerung der Fluoreszenz erreicht wurde, wurden im Anschluss Versuche mit angepassten Konzentrationsparametern durchgeführt. Die Konzentration wurde zum einen auf 50  $\mu$ M erhöht, und zum anderen wurde die Inkubationszeit mit 50  $\mu$ M Amlexanox auf 8 Stunden verkürzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Die zuvor festgestellte sehr geringe Steigerung der Fluoreszenz nach Inkubation mit 25  $\mu$ M Amlexanox für 48 Stunden war weiterhin nachweisbar. Diese konnte durch Inkubation mit 50  $\mu$ M Amlexanox für 48 Stunden weiter gesteigert werden. Die kürzere

Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Amlexanox für nur 8 Stunden zeigte im Vergleich zu der für 48 Stunden eine weitere Steigerung der Fluoreszenz. Alle Steigerungen der Fluoreszenzen in diesem Versuch sind jedoch im Vergleich zur Fluoreszenz nach Transfektion von R401\* ohne Zugabe von Medikamenten nicht signifikant. Eine positive Tendenz von Amlexanox auf die Fluoreszenz ist möglich. Es ist aktuell nicht davon auszugehen, dass mehr enzymatisch aktive N-Glycanase-1 nach Inkubation mit Amlexanox trotz Mutation zur Verfügung steht.

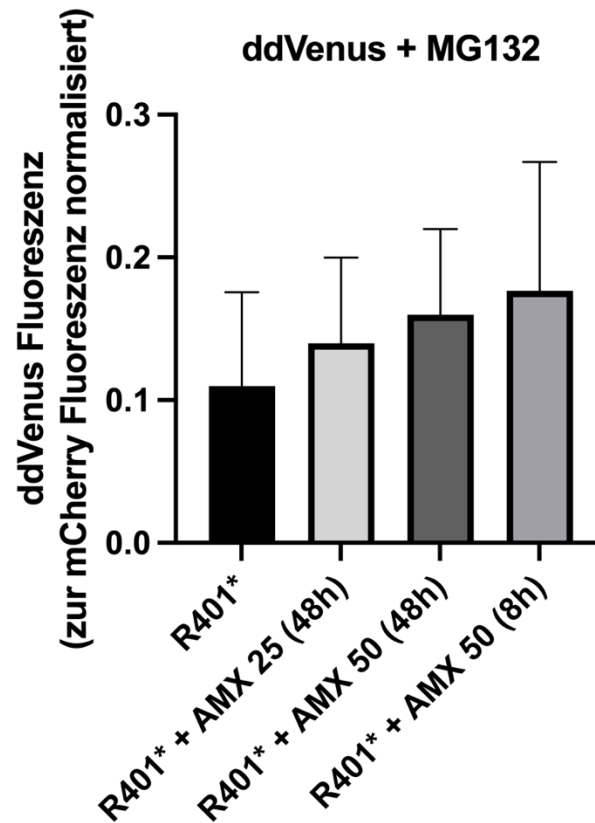
Zur verbesserten Darstellung und der erleichterten Vergleichbarkeit ist in Abbildung 14 nur die Relation der Fluoreszenz von R401\* zu den jeweiligen Fluoreszenzen von R401\* nach der jeweiligen Medikamentenzugabe dargestellt.



**Abbildung 13: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. der Variante R401\* und anschließender Medikamentenbehandlung mit unterschiedlichen Amlexanox-Konzentrationen (AMX).**

HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Non-KO und NGLY1-KO) wurden transfiziert, kultiviert, mit MG132 (2  $\mu\text{M}$ ) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu\text{l}$  MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu\text{g}$  DNA. Neben pcDNA5 bzw. der Variante R401\* wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Als Referenz wurde

die Fluoreszenz von ddVenus mit MG132 auf 1 (HEK) gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse nicht signifikant.



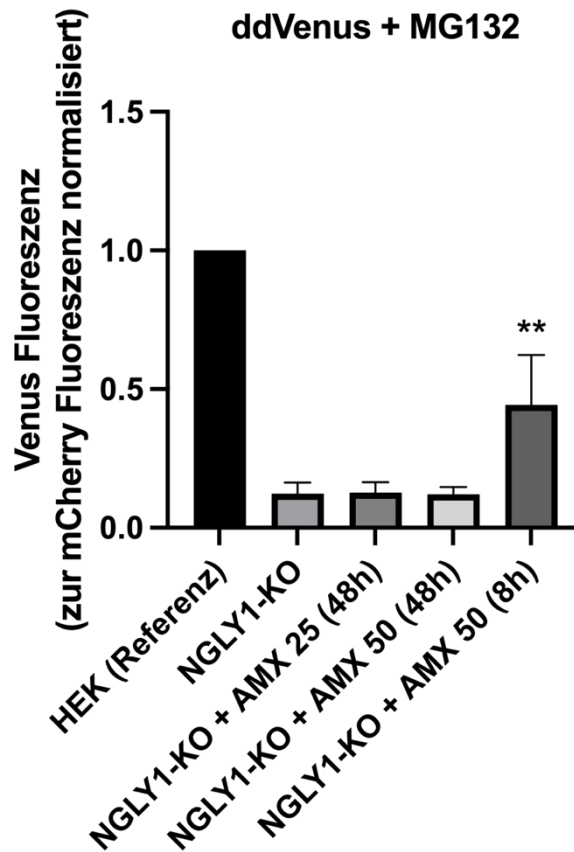
**Abbildung 14: Detaillierte Ansicht des Fluoreszenzassays von ddVenus in NGLY1-KO-HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen mit Transfektion der Variante R401\* und anschließender Medikamentenbehandlung mit unterschiedlichen Amlexanox-Konzentrationen (AMX).**

NGLY1-KO-HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen wurden transfiziert, kultiviert, mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben der Variante R401\* wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Als Referenz dient in dieser Abbildung die Fluoreszenz von ddVenus mit MG132 nach Transfektion von R401\*. Zur statistischen Auswertung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse nicht signifikant.

Da bei der Verwendung von Amlexanox auch eine Autofluoreszenz angenommen werden kann, wurde der Versuch in Abbildung 13 unter denselben Bedingungen nach

Transfektion des Leervektors pcDNA5 durchgeführt (Banning et al., 2018). Das Ergebnis ist in Abbildung 15 zu sehen.

Bei der Verwendung der Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Amlexanox über 48 Stunden konnte keine signifikante Fluoreszenzzunahme festgestellt werden. Damit ist die Autofluoreszenz von Amlexanox im Rahmen dieser Konzentrationen zu vernachlässigen. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Amlexanox bei einer Inkubationszeit von 8 Stunden zeigt sich jedoch eine sehr signifikante Fluoreszenzzunahme im Vergleich zur Probe ohne eine Zugabe von Amlexanox. Hier ist von einer signifikanten Autofluoreszenz von Amlexanox auszugehen. Damit ist die betrachtete geringe Steigerung der Enzymaktivität in Abbildung 13 bei der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Amlexanox für 8 Stunden zu verwerfen. Die Fluoreszenzzunahme bei der Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  Amlexanox für 48 Stunden kann jedoch weiterhin angenommen werden. Damit ist unter den genannten Bedingungen auch eine Zunahme der enzymatischen Aktivität nach Transfektion der Variante R401\* möglich.



**Abbildung 15: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 und anschließender Medikamentenbehandlung mit unterschiedlichen Amlexanox-Konzentrationen (AMX).**

HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Non-KO und NGLY1-KO) wurden transfiziert, kultiviert, mit MG132 (2  $\mu$ M) inkubiert, lysiert und anschließend einer Fluoreszenzmessung zugeführt. Die Transfektion erfolgte als Lipofektion mit 3  $\mu$ l MACSfectin<sup>®</sup> und 0,75  $\mu$ g DNA. Neben dem Leervektor pcDNA5 wurden ddVenus sowie mCherry jeweils einzeln im entsprechenden Verhältnis kotransfiziert. Als Referenz wurde die Fluoreszenz von ddVenus mit MG132 auf 1 (HEK) gesetzt. Zur statistischen Auswertung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei durchgeführten Versuchen dargestellt. Dabei stehen \*\*\* für sehr hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,001$ ), \*\* für hoch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ) und \* für signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ).

## 5. Diskussion

### 5.1 Unterschiede in der Expression und der Aktivität zwischen den Varianten R390Q und R401\*

Zur Charakterisierung standen bei N-Glycanase-1-Mangel multiple Varianten zur Auswahl. Insgesamt geht man momentan von ca. 56 Mutationen aus, die zum Krankheitsbild des N-Glycanase-1-Mangels führen (Pandey et al., 2022; Stanclift et al., 2022).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei solcher Varianten genauer untersucht. Die Variante R401\* gilt aktuell als die häufigste Variante und stellt eine Nonsense-Mutation dar. Ihr wurde R390Q gegenübergestellt; diese ist zum einen eine seltenere Variante und darüber hinaus durch eine Missense-Mutation verursacht.

Beide Mutationen führen zum selben Ausprägungsgrad der Krankheit. Es liegen bisher keine Beweise dafür vor, dass die Art der Mutation einen Einfluss auf die Ausprägung der Krankheit hat (Stanclift et al., 2022).

Zunächst wurde die Expression der beiden Varianten miteinander über Western Blots verglichen. Hier zeigte sich bei der Expression des transfizierten Wildtyps ein unterschiedliches Signalmuster: Das Signal bei 74 kDa ist nach Transfektion des Wildtyps deutlich zu sehen, bei der Variante R390Q nimmt sie an Intensität ab, während sie bei der Variante R401\* vollständig verschwindet.

Eine mögliche Erklärung weshalb ein unterschiedliches Expressionsmuster der beiden Varianten im Western Blot könnte darin liegen, dass der verwendete Antikörper nicht an die Variante R401\* binden kann. Dies ist jedoch nicht anzunehmen, da die Bindestelle für den Antikörper innerhalb der Aminosäuren 1 bis 300 der N-Glycanase-1 liegt.

Alternativ wird das Protein nicht gebildet, da die mRNA oder das Protein selbst instabil ist. Wahrscheinlich ist, dass das Protein instabil ist und nur durch die Verwendung von MG132 im Western Blot sichtbar gemacht werden kann. Vereinzelt konnte in den Western Blots bei R401\* auch ein Signal bei 40 kDa dargestellt werden, diese entspräche dem verkürzten Protein mit 401 Aminosäuren. Dass dieses Signal nur sporadisch nachgewiesen werden konnte, könnte mit der transienten Transfektion der Zellen zusammenhängen. Im Rahmen einer stabilen Transfektion könnten konstantere Ergebnisse erwartet werden. Auch hier ist davon auszugehen, dass MG132 den Nachweis des instabilen R401\* ermöglicht.

Die Abnahme der Intensität bei R390Q könnte ebenfalls auf ein instabiles Protein hinweisen, das zum Teil bereits abgebaut wurde und deshalb nur in reduzierter Menge nachgewiesen werden kann. Bei der Variante R390Q kommt es zum Verlust der positiven Ladung innerhalb der Proteinkette (Miao et al., 2022). Dies könnte einen Grund für eine instabile Proteinstruktur darstellen.

Inzwischen sind in der AG Tikkanen stabile Flp-In Zelllinien aus den im Rahmen dieser Arbeit generierten NGLY1-Knock-Out HEK-Flp-In-Zellen mit den Varianten R390Q, R401\* sowie dem Wildtyp etabliert worden. Damit besteht bereits die Möglichkeit, die Expression unter stabilen Transfektionsbedingungen weiter zu untersuchen.

Nach der Etablierung des Aktivitätsassays für die NGLY1-Enzymaktivität wurden die Varianten hinsichtlich ihrer Enzymaktivität miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivität beider Varianten der Aktivität in NGLY1-KO-Zellen entsprach. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Mutationen dazu führen, dass eine Tendenz zur verminderten Enzymaktivität vorhanden ist. Dies kann, wie zuvor erwähnt, in einer instabilen mRNA, einem instabilen Protein oder einem enzymatisch inaktiven Protein begründet sein und deckt sich damit mit der bisherigen Annahme, dass die Mutation an sich nicht über den Ausprägungsgrad der Krankheit entscheidet.

## **5.2 Diagnostische Wertigkeit des Aktivitätsassays**

Zur Interpretation des Fluoreszenzassays als Aktivitätsassay hinsichtlich der NGLY1-Aktivität musste dieser zunächst etabliert werden. Hierfür wurden unterschiedliche Parameter miteinander verglichen und ergänzend durch statistische Tests in ihrer Signifikanz überprüft. Im Rahmen der Etablierung sollte auch festgestellt werden, welchen Einfluss der Proteasominhibitor MG132 auf die Fluoreszenzmessung hat. Ein verminderter proteosomaler Abbau von Venus bzw. ddVenus durch MG132 ist anzunehmen. Die Steigerung der Fluoreszenz war bei HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (HEK) sowie deren NGLY1-KO-Zelllinie im Vergleich zu deren Fluoreszenz ohne MG132 hoch signifikant. Nach Transfektion von NGLY1 in die KO-Zelllinie war die Fluoreszenzzunahme ohne MG132 vergleichsweise sehr signifikant.

Ohne den Einsatz von MG132 wäre eine Fluoreszenzmessung nicht möglich, da die Venuskonstrukte proteasomal abgebaut werden würden. Damit ist die Vorbehandlung mit MG132 Voraussetzung für den diagnostischen Einsatz dieser Methode.

Um eine schnellere und vereinfachte Messung der Aktivität von NGLY1 zu ermöglichen, wurde versucht, eine Messung ohne Zelllyse durchzuführen, indem die Fluoreszenzmessung direkt über eine 48-Well-Platte mit lebenden Zellen durchgeführt wurde. Diese Methodik konnte durch inkonstante Ergebnisse nicht etabliert werden, stellt jedoch theoretisch ein mögliches Instrument für die Diagnose der Krankheit dar. Hierfür müsste nach Etablierung an der HEK-Zelllinie eine Anpassung an Fibroblasten von Patienten erfolgen. Erschwert wird eine solche Etablierung durch die schlechte Transfizierbarkeit von Fibroblasten. Daher wäre ein *in vitro*-Assay ohne Transfektion wünschenswert. Im Falle des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Aktivitätsassays ist also von einer begrenzten diagnostischen Wertigkeit auszugehen, da das Prozedere keine schnellen Ergebnisse liefert. Dies käme dem Aufwand einer genetischen Aufschlüsselung in etwa gleich. Dennoch wäre es prinzipiell nach einer Weiterentwicklung ein mögliches diagnostisches Mittel.

In der Vergangenheit wurden bereits Methoden zur Aktivitätsmessung von NGLY1 etabliert. Einer dieser möglichen Assays beruht auf der Messung mittels Autoradiographie. Dabei werden von Fetuin-abgeleitete <sup>14</sup>C-markierte Glykopeptide als Substrate genutzt. Im Anschluss werden diese mit Hilfe einer Chromatographie oder einer Elektrophorese getrennt. Danach kann das Ergebnis anhand der Schwärzung des Filmes interpretiert werden (Kitajima et al., 1995; Suzuki et al., 1993). Die Nachteile dieser Methode liegen unter anderem in den strengen Regularien bei der Verwendung radioaktiver Isotope und der möglichen Strahlenbelastung bei der Anwendung. Darüber hinaus ist eine entsprechende Ausrüstung des Labors erforderlich.

Eine weitere etablierte Methodik basiert auf der Benutzung einer S-alkylierten RNase B als Substrat für das Enzym. Nach der Reaktion wird das Produkt mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend bspw. durch einen Western Blot visualisiert (Suzuki, 2005). Die Nachteile der Autoradiographie werden damit umgangen. Bei einer möglichen Kontamination mit endogenen Peptidasen in nicht adäquat aufgereinigten Enzymproben ist jedoch davon auszugehen, dass die Substrate anderweitig abgebaut werden und die Ergebnisse dadurch verfälscht werden. Zusammenfassend sind die beiden genannten Methoden wenig praktikabel und sehr aufwendig.

Eine neuere Methode stellt die FRET-basierte GCP-Sonde dar, mit der ebenfalls die Enzymaktivität gemessen werden kann. Das GCP besteht dabei aus einem Fluorophor-markierten zweigeteilten N-Acetylglucosamin und einem mit einem Dabcyl-Quencher

kombinierten Cyclopeptid (Hirayama et al., 2024). Damit können nach der Fluoreszenzmessung Rückschlüsse auf die NGLY1-Aktivität gezogen werden. Bei dieser Methode ist kein Einfluss endogener Peptidasen zu erwarten, da das GCP resistent gegenüber diesen ist (Hirayama et al., 2022). Darüber hinaus ist sie auf verschiedene Proben wie Zell- oder Gewebeproben von Patienten, Blutzellen oder definierte Zelllinien anwendbar.

Neben der Messung der Enzymaktivität könnten auch definierte Proteine, die beim N-Glycanase-1-Mangel akkumulieren, gemessen werden. Solche Proteine könnten unter anderem über die Niere in den Urin ausgeschieden werden. So wird beim N-Glycanase-1-Mangel N-Acetylglucosamin-Asparagin über den Urin ausgeschieden und könnte als möglicher Biomarker für die Erkrankung dienen, jedoch wird dieser Biomarker auch bei der Diagnose der Aspartylglucosaminurie als solcher verwendet (Goodspeed et al., 2021). Daher eignet sich dies allein nicht als sicheres diagnostisches Mittel für den N-Glycanase-1-Mangel.

Die Anforderung an ein diagnostisches Mittel für den N-Glycanase-1-Mangel sind hinsichtlich der frühen Folgen dieses Gendefekts besonders hoch. So sollte es im Rahmen eines frühen Schwangerschaftsscreenings die Möglichkeit einer sicheren Diagnose geben, um so eine kausale Therapie, sofern irgendwann verfügbar, schon frühzeitig durchzuführen. Anderenfalls kommt es bei später Therapie dennoch zu Ausprägungen der Krankheit, obwohl ein geeigneter kausaler Ansatz zur Verfügung steht.

### **5.3 Einfluss auf NRF1 bei Expression der Varianten R390Q und R401\***

Da NRF1 sich als ein wichtiger Interaktionspartner von NGLY1 bestätigt hat, wurde er ebenfalls Thema in dieser Arbeit. Als Transkriptionsfaktor für proteosomale Gene spielt er auch im Rahmen des Pathomechanismus des N-Glycanase-1-Mangels eine Rolle (Tomlin et al., 2017a).

NRF1 wurde hinsichtlich seiner Expression unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. In der NGLY1-KO-Zelllinie ist das Signal bei ca. 100 kDa dominant. Dies spricht für eine Akkumulation von prozessiertem NRF1 und deckt sich mit den Ergebnissen von Tachida et al., 2023. Eine alternative Erklärung stellt nach dieser Arbeit

auch eine stabilere prozessierte Form von NRF1 dar, die in geringerem Ausmaß abgebaut wird. Verglichen mit der Expression in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen ist das Spektrum der unterschiedlichen Proteinmassen geringer und das prominenteste Signal liegt bei ca. 150 kDa. Dieses Signal entspricht dem unprozessierten NRF1. Der Einfluss von NGLY1 auf diese Prozessierung bzw. die Änderung des Molekulargewichts von NRF1 wird dabei nur in geringem Maße auf eine tatsächliche Deglykosylierung durch NGLY1 zurückgeführt. Viel mehr wird das durch die DDI2 Protease verursacht, die eine N-terminale Domäne in dem Protein entfernt (Koizumi et al., 2016). Zusätzlich bestand die Annahme, dass die Inaktivierung von NGLY1 zu einer Akkumulation von fehlerhaft prozessiertem NRF1 außerhalb des Zellkerns führt (Tomlin et al., 2017b). Im Rahmen weiterer Forschung konnte gezeigt werden, dass eine Translokation von NRF1 in den Zellkern jedoch auch ohne NGLY1 stattfindet (Northrop et al., 2020; Yoshida et al., 2021).

Nach der transienten Transfektion von NGLY1 in den NGLY1-KO-Zellen kann eine Tendenz zur Kompensation der möglicherweise fehlerhaften Prozessierung von NGLY1 beobachtet werden. Es liegen neue Daten aus der Arbeitsgruppe Tikkanen vor, der es gelungen ist, eine stabile Flp-In-Zellreihe mit dem Wildtyp NGLY1 zu generieren, die ebenfalls implizieren, dass eine Kompensation nach stabiler Transfektion stattfindet. Vermutlich ist die geringe Kompensation in der Versuchsreihe dieser Arbeit auf die transiente Transfektion zurückzuführen, bei der nur ein Teil der Zellen transfiziert wird. Nach Transfektion der Varianten R390Q und R401\* wurde keinerlei Kompensation in der Prozessierung von NRF1 festgestellt. Besonders bei der Transfektion von R401\* scheint die Akkumulation von verstärkt prozessiertem NRF1 gefördert zu werden. Auch hier konnte die Arbeitsgruppe Tikkanen stabile Flp-In-Zellreihen mit beiden Genvarianten etablieren, die bzgl. NRF1 dieselben Ergebnisse erbrachten, wie in meiner Arbeit.

#### **5.4 Einfluss von Medikamenten und mögliche Therapieansätze bei der Varianten R390Q und R401\***

Da es momentan noch keine kausale Therapie für den N-Glycanase-1-Mangel gibt, sind insbesondere mögliche Therapieansätze Gegenstand aktueller Forschung. Im Rahmen meiner Arbeit wurde dieser Faktor ebenfalls miteinbezogen. Die Auswahl möglicher Therapeutika bezog sich auf die beiden Genvarianten, die untersucht wurden. Da R390Q eine Missense-Variante darstellt, wurde hier ein Versuch mit Betain unternommen.

Betain wirkt als pharmakologisches und chemisches Chaperon und zeigte bereits positiven Einfluss bei Formen der Aspartylglucosaminurie (Banning et al., 2016). Dabei ist es wahrscheinlicher, dass es im Zusammenhang mit NGLY1 als chemisches Chaperon agiert, da es hierfür nicht direkt an NGLY1 binden muss. R401\* stellt eine Nonsense-Variante von *NGLY1* dar, die zum verfrühten Abbruch der Proteinbiosynthese führt. Daher wurden hier sogenannte Readthrough-Substanzen angewandt: Amlexanox und Ataluren. Ersteres ist in den USA zur Behandlung von Aphthen der Mundhöhle zugelassen, letzteres in der EU zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie (Uma Maheswari & Shanmugasundaram, 2013b; Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie – Ataluren, 2015).

Betain zeigte bei R390Q nur geringen Einfluss, und die gemessene Aktivität von NGLY1 nahm zwar ab, war jedoch nicht signifikant. Dies kann an einer Interaktion von ddVenus und Betain liegen, die die Fluoreszenz weiter einschränkt. Ein solcher Zusammenhang ist in der Literatur jedoch nicht beschrieben. Bei beiden Readthrough-Substanzen konnte ein tendenziell positiver Einfluss auf die Aktivität von NGLY1 festgestellt werden. Bei mangelnder Signifikanz sind die in-vitro Ergebnisse jedoch eingeschränkt verwertbar. Insgesamt ist somit bei den zuvor genannten Substanzen nicht von einem geeigneten Therapieansatz auszugehen.

Vielversprechender sind therapeutische Ansätze im Sinne einer Gensatztherapie bspw. Mittels adeno-assoziierten Viren (AAV). Im Versuch mit NGLY1-KO-Ratten konnte gezeigt werden, dass Symptome der Krankheit durch die Therapie mit GS-100 reduziert werden können (Zhu et al., 2022). GS-100 stellt dabei einen rekombinanten, einzelsträngigen AAV9-Vektor dar, der eine humane NGLY1-Genkopie trägt. Es wurde im Rahmen dieser Untersuchung intracerebroventrikulär, d.h. in die Ventrikel des Großhirns, appliziert. Das verwendete Rattenmodell zeigte einige Übereinstimmungen zum Ausprägungsgrad der Krankheit beim Menschen: reduzierte Lebenserwartung, Verlust von neuronalen Axonen, neurologische Beeinträchtigung, motorische Störungen sowie Störungen des räumlichen Denkvermögens (Asahina et al., 2020). Die Bestimmung des Ausprägungsgrades dieser Symptome bzw. deren Minderung durch die Therapie und die Übertragung auf mögliche Effekte im Menschen sollten mangels vollständiger Übertragbarkeit durch das gewählte Tiermodell jedoch zurückhaltend betrachtet werden.

Eine Studie zur Erprobung von GS-100 am Menschen ist jedoch seit dem 13.02.2024 in den USA im Gange (ID NCT06199531).

## 5.5 Ausblick

Obwohl die Krankheit N-Glycanase-1-Mangel erst seit 2012 bekannt ist und damit noch nicht lange Gegenstand aktueller Forschung ist, ist der Fortschritt hinsichtlich neuen Erkenntnissen in diesem Bereich so weit, dass sogar eine klinische Studie zur Erprobung von einer kausalen Therapie etabliert wurde. Dies zeigt, dass auch sogenannte *Orphan Diseases*, trotz der bisher angenommenen geringen Prävalenz, einen hohen Stellenwert in der aktuellen Forschung genießen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein entsprechendes NGLY1-Knockout-Zellmodell etabliert, damit nicht nur ein Krankheitsmodell zur Verfügung steht, sondern auch anschließend die Charakterisierung von Genvarianten der Erkrankung stattfinden kann. Im Fokus lagen die Genvarianten R390Q und R401\*. Theoretisch ist die Untersuchung aller anderen bisher bekannten Genvariationen von N-Glycanase-1-Mangel damit ebenfalls möglich. Hier könnte man weiterhin nach möglichen Unterschieden hinsichtlich des Ausprägungsgrades der Krankheit in Abhängigkeit von der jeweiligen Genvariante forschen. Gleichzeitig sollte ein Fokus auf die klinischen Kernelemente der Diagnostik und der Therapie in dieser Arbeit gesetzt werden. Im Rahmen der Etablierung des Fluoreszenzassays ergab sich damit auch ein mögliches diagnostisches Mittel, das durch eine Weiterentwicklung und Vereinfachung zu einem klinisch praktikablen Werkzeug werden könnte.

Daneben wurden Therapeutika, die sich im Rahmen anderer Versuche bewährt haben, *in-vitro* untersucht und zeigten bedingt einen möglichen therapeutischen Ansatz. Zumindest hinsichtlich der Genvariante R401\* und der Anwendung von Amlexanox könnten sich weitere Untersuchungen lohnen. Mit dem Hinzukommen von weiteren Readthrough-Substanzen, wie ELX-02 oder SRI-41315, auf dem Markt für Arzneimittel könnten auch diese erprobt werden (Crawford et al., 2021; Sharma et al., 2021). Der vielversprechendste therapeutische Ansatz ist jedoch in der Gentherapie mittels Virusvektoren zu sehen. Diese Therapieform hat sich bspw. bereits bei anderen früheinsetzenden Erkrankungen, wie der spinalen Muskelatrophie, bewiesen (Ogbonmide et al., 2023).

## 6. Zusammenfassung

N-Glycanase-1-Mangel ist eine kongenitale Störung der Deglykosylierung. Die Krankheit ist durch fünf Kernsymptome geprägt: globale Entwicklungsverzögerung, Choreoathetose, Erhöhung von Leberwerten in Blutuntersuchungen, Hypo-/Alakrimie und eine progressive, sensomotorische Neuropathie. Der Erkrankung liegen Mutationen im Enzym N-Glycanase-1 (NGLY1) zu Grunde. Die N-Glycanase-1 ist vor allem an der ER-assoziierten Degradation von Proteinen beteiligt. Dabei werden N-Glykane vor der proteasomalen Degradation entfernt. Daneben interagiert es unter anderem mit NRF1/NFE2L1 und hat einen Einfluss auf unterschiedliche Signalwege. Bisher sind etwa 56 Mutationen bekannt, die zu der Erkrankung führen. Die Konsequenz jener Mutationen ist ein verminderter Spiegel von N-Glycanase-1 und somit eine verminderte Enzymaktivität. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht abschließend geklärt. Mögliche Ansätze beziehen sich unter anderem auf eine Verminderung des oben genannten NRF1/NFE2L1 als Transkriptionsfaktor für proteasomale Gene.

Diese Arbeit hatte das Ziel, die zwei NGLY1-Varianten, R390Q und R401\*, des N-Glycanase-1-Mangels zu charakterisieren. Dafür wurde zunächst eine NGLY1-KO-Zelllinie generiert. Mit dieser wurde dann das Expressionsverhalten der Genvarianten nach transienter Transfektion untersucht. Die Expression von R390Q konnte mit den verwendeten NGLY1-Antikörpern nachgewiesen werden, während dieser Nachweis bei R401\* ausblieb.

Im Weiteren sollte ein Aktivitätsassay zur Bestimmung der Enzymaktivität von NGLY1 bzw. dessen Genvarianten etabliert werden. Hierzu wurde ein Venuskonstrukt, genannt ddVenus, verwendet, das erst nach Deglykosylierung durch NGLY1 fluoresziert. Damit konnte ein Rückschluss aus der Fluoreszenz auf die NGLY1-Enzymaktivität gezogen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Enzymaktivität bei beiden Genvarianten hoch signifikant vermindert war. In weiteren Versuchen konnte die Aktivität von R390Q mit Betain nicht gesteigert werden, während bei R401\* und der Verwendung von 50 µM Amlexanox mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden eine Aktivitätssteigerung festgestellt werden konnte, die jedoch nicht signifikant war. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass NRF1/NFE2L1 in den KO-Zellen in prozessierter Form akkumuliert. Eine Kompensation durch transiente Transfektion von NGLY1 oder der Genvarianten R390Q oder R401\* konnte nicht erreicht werden.

## 7. Summary

N-Glycanase-1-Deficiency is a congenital disorder of deglycosylation. The disease is characterized by five core symptoms: global developmental delay, choreoathetosis, elevation of liver parameters in blood tests, hypo-/ alacrimia and a progressive sensorimotor neuropathy. The disease is caused by mutations in the enzyme N-Glycanase-1 (NGLY1) that is primarily involved in the ER-associated degradation of proteins, whereby N-glycans are removed prior to proteasomal degradation. It also interacts with NRF1/NFE2L1 and has an influence on various signaling pathways. To date, around 56 mutations are known to lead to the disease. The consequence of these mutations is a reduced level of N-Glycanase-1 and thus reduced enzyme activity. However, the exact pathomechanism is the subject of current research and has not yet been conclusively clarified. Possible approaches include a reduction in the above-mentioned NRF1/NFE2L1 as a transcription factor for proteasomal genes.

The aim of this study was to investigate and characterize the two gene variants, R390Q and R401\*, of N-Glycanase 1 deficiency. To this purpose, an NGLY1-KO cell line was first generated and then used to investigate the expression of the gene variants after transient transfection. The expression of R390Q could be detected with the NGLY1 antibodies used, whereas this was not the case for R401\*.

The next step was to establish an activity assay to determine the enzyme activity of NGLY1 and its gene variants. For this purpose, a Venus construct, called ddVenus, was used, which fluoresces after deglycosylation by NGLY1. This allows conclusions to be drawn about NGLY1 enzyme activity, based on the measured fluorescence. The results showed that the enzyme activity was highly significantly reduced in both gene variants. In further experiments, the activity of R390Q could not be increased with betaine, while a minor increase in the activity was observed for R401\* upon use of 50  $\mu$ M Amlexanox after 48 hours, although this was not significant.

In addition, NRF1/NFE2L1 was shown to accumulate in the KO cells in a processed form, which could not be reversed upon a transient transfection of NGLY1 or the gene variants R390Q or R401\*.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AA	<i>engl. amino acid</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMFR	<i>engl. Autocrine Motility Factor Receptor</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AMX	Amlexanox
APS	Ammoniumpersulfat
Atf1	<i>engl. Activating Transcription Factor 1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	<i>engl. Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Creb	<i>engl. cAMP Response Element-binding Protein</i>
DDI2	<i>engl. DNA-Damage Inducible 1 Homolog 2</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>engl. Enhanced Chemiluminescence</i>
EDEM1	<i>engl. ER-degradation Enhancing Alpha-Mannosidase-Like Protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENGase	Endo-Beta-N-Acetylglucosaminidase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>engl. Fetal Calf Serum</i>
FOX2A	<i>engl. Forkhead Box Protein A2</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCP	glykosliertes Hepta-Cyclopeptid

GFAP	<i>engl. Glial Fibrillary Acid Protein</i>
HEK	<i>engl. Human Embryonic Kidney Cells</i>
HR23	Humanes RAD23
HRP	<i>engl. Horseradish Peroxidase</i>
KO	<i>engl. Knock-Out</i>
LB	<i>engl. Lysogeny Broth</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	<i>engl. Major Histocompatibility Complex Class I</i>
NFE2L1/NRF1	<i>engl. Nuclear Factor Erythroid-2-like 1/ Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 1</i>
NGLY1	N-Glycanase-1
NP-40	Nonidet P40
p62	Protein 62
PAW	<i>engl. PNGase and other wormproteins</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Proteaseinhibitor
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) Mononatriumsalz
PKC	Proteinkinase C
PUB	PNGase/UBA oder UBX-beinhaltende Proteine
RAD23	<i>engl. UV Excision Repair Protein RAD23 ursprünglich von "radiation sensitive 23"</i>
rSAP	Rekombinante Shrimp Alkaline Phosphatase
SAKS	Sphingolipid Acyltransferase
SDS	<i>engl. Sodium-Dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>engl. Sodium-Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SQSTM1	<i>engl. Sequestosome-1 Gene</i>

---

TBS-T	<i>engl. Tris-buffered Saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Transglutaminase
TGF- $\beta$	<i>engl. Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UBA	Ubiquitin-assoziiert
UBX	Ubiquitin-regulatorisch X
WB	<i>engl. Western Blot</i>
WT	Wildtyp

---

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Schematischer Aufbau der N-Glycanase 1</b> .....	2
<b>Abbildung 2: Beispielhaftes Transfektionsschema einer 12-Well-Platte</b> .....	28
<b>Abbildung 3: Funktionsprinzip des angewandten Fluoreszenzassays.</b> .....	29
<b>Abbildung 4: Western Blot der HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen mit Nachweis von NGLY1 in Lysaten.</b> .....	32
<b>Abbildung 5: Western Blot der HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (Non-KO und KO) mit Nachweis von NGLY1 in Lysaten nach Zugabe von MG132.</b> .....	33
<b>Abbildung 6: Fluoreszenzassay von Venus/ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren NGLY1-KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. NGLY1 Isoform 1 sowie +/- MG132.</b> .....	35
<b>Abbildung 7: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren NGLY1-KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. NGLY1 Isoform 1 sowie +/- MG132.</b> .....	36
<b>Abbildung 8: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. NGLY1 Isoform 1.</b> .....	37
<b>Abbildung 9: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren NGLY1-KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. Varianten R390Q und R401*.</b> .....	39
<b>Abbildung 10: Western Blot der HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen (parental und KO) mit Nachweis von NRF1 und NGLY1 in Lysaten.</b> .....	41
<b>Abbildung 11: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. der Variante R390Q und anschließender Behandlung mit Betain.</b> .....	42
<b>Abbildung 12: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. der Variante R401* und anschließender Medikamentenbehandlung mit Amlexanox (AMX) bzw. Ataluren (PTC124).</b> .....	44

---

<b>Abbildung 13: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 bzw. der Variante R401* und anschließender Medikamentenbehandlung mit unterschiedlichen Amlexanox-Konzentrationen (AMX).....</b>	<b>45</b>
<b>Abbildung 14: Detaillierte Ansicht des Fluoreszenzassays von ddVenus in NGLY1-KO-HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen mit Transfektion der Variante R401* und anschließender Medikamentenbehandlung mit unterschiedlichen Amlexanox-Konzentrationen (AMX).....</b>	<b>46</b>
<b>Abbildung 15: Fluoreszenzassay von ddVenus in HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293-Zellen, deren KO-Variante mit Transfektion des Leervektors pcDNA5 und anschließender Medikamentenbehandlung mit unterschiedlichen Amlexanox-Konzentrationen (AMX).....</b>	<b>48</b>

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien .....	9
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.....	11
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung .....	14
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits .....	15
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	16
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 7: DNA-Primer.....	17
Tabelle 8: Plasmide .....	18
Tabelle 9: Zelllinien .....	19
Tabelle 10: Nährmedien und deren Zusammensetzung .....	20
Tabelle 11: PCR Protokoll zur Klonierung.....	21
Tabelle 12: PCR Parameter (Klonierung).....	21
Tabelle 13: Protokoll für den Restriktionsverdau des PCR Produkts .....	22
Tabelle 14: Protokoll für den Mutagenese-Ansatz.....	23
Tabelle 15: PCR-Parameter zur Mutagenese .....	23
Tabelle 16: PCR-Parameter für Phire Tissue .....	27
Tabelle 17: PCR-Protokoll für Phire Tissue .....	27

## 11. Literaturverzeichnis

- Abbott, J., Tambe, M., Pavlinov, I., Farkhondeh, A., Nguyen, H. N., Xu, M., Pradhan, M., York, T., Might, M., Baumgärtel, K., Rodems, S., & Zheng, W. (2023). Generation and characterization of NGLY1 patient-derived midbrain organoids. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1039182>
- Abuduxikuer, K., Zou, L., Wang, L., Chen, L., & Wang, J. S. (2020). Novel NGLY1 gene variants in Chinese children with global developmental delay, microcephaly, hypotonia, hypertransaminasemia, alacrimia, and feeding difficulty. *Journal of Human Genetics*, 65(4). <https://doi.org/10.1038/s10038-019-0719-9>
- Adams, J., & Schaaf, C. P. (2018). Diagnosis and genetics of alacrima. In *Clinical Genetics* (Vol. 94, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/cge.13173>
- Allen, M. D., Buchberger, A., & Bycroft, M. (2006). The PUB domain functions as a p97 binding module in human peptide N-glycanase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35). <https://doi.org/10.1074/jbc.M601173200>
- Altrich-VanLith, M. L., Ostankovitch, M., Polefrone, J. M., Mosse, C. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Engelhard, V. H. (2006). Processing of a Class I-Restricted Epitope from Tyrosinase Requires Peptide N -Glycanase and the Cooperative Action of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 and Cytosolic Proteases . *The Journal of Immunology*, 177(8). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5440>
- Asahina, M., Fujinawa, R., Nakamura, S., Yokoyama, K., Tozawa, R., & Suzuki, T. (2020). Ngly1 -/-rats develop neurodegenerative phenotypes and pathological abnormalities in their peripheral and central nervous systems. *Human Molecular Genetics*, 29(10). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa059>
- Banning, A., Gülec, C., Rouvinen, J., Gray, S. J., & Tikkanen, R. (2016). Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37583>
- Banning, A., Schiff, M., & Tikkanen, R. (2018). Amlexanox provides a potential therapy for nonsense mutations in the lysosomal storage disorder Aspartylglucosaminuria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(3). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.014>

- Chiu, C. G., St.-Pierre, P., Nabi, I. R., & Wiseman, S. M. (2008). Autocrine motility factor receptor: A clinical review. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.1586/14737140.8.2.207>
- Craig, N. L. (1988). The mechanism of conservative site-specific recombination. In *Annual review of genetics* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.000453>
- Crawford, D. K., Mullenders, J., Pott, J., Boj, S. F., Landskroner-Eiger, S., & Goddeeris, M. M. (2021). Targeting G542X CFTR nonsense alleles with ELX-02 restores CFTR function in human-derived intestinal organoids. *Journal of Cystic Fibrosis*, *20*(3). <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.01.009>
- Dabaj, I., Sudrié-Arnaud, B., Lecoquierre, F., Raymond, K., Ducatez, F., Guerrot, A. M., Snanoudj, S., Coutant, S., Saugier-veber, P., Marret, S., Nicolas, G., Tebani, A., & Bekri, S. (2021). Ngly1 deficiency: A rare newly described condition with a typical presentation. *Life*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/LIFE11030187>
- Dalet, A., Robbins, P. F., Stroobant, V., Vigneron, N., Li, Y. F., El-Gamil, M., Hanada, K. I., Yang, J. C., Rosenberg, S. A., & Van Den Eynde, B. J. (2011). An antigenic peptide produced by reverse splicing and double asparagine deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1101892108>
- De Virgilio, M., Weninger, H., & Ivessa, N. E. (1998). Ubiquitination is required for the retro-translocation of a short-lived luminal endoplasmic reticulum glycoprotein to the cytosol for degradation by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(16). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9734>
- Doerks, T., Copley, R. R., Schultz, J., Ponting, C. P., & Bork, P. (2002). Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Research*, *12*(1). <https://doi.org/10.1101/gr.203201>
- Enns, G. M., Shashi, V., Bainbridge, M., Gambello, M. J., Zahir, F. R., Bast, T., Crimian, R., Schoch, K., Platt, J., Cox, R., Bernstein, J. A., Scavina, M., Walter, R. S., Bibb, A., Jones, M., Hegde, M., Graham, B. H., Need, A. C., Oviedo, A., ... Goldstein, D. B. (2014). Mutations in NGLY1 cause an inherited disorder of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Genetics in Medicine*, *16*(10). <https://doi.org/10.1038/gim.2014.22>
- Forcina, G. C., Pope, L., Murray, M., Dong, W., Abu-Remaileh, M., Bertozzi, C. R., & Dixon, S. J. (2022). Ferroptosis regulation by the NGLY1/NFE2L1 pathway.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.2118646119>
- Freeze, H. H. (2013). Understanding human glycosylation disorders: Biochemistry leads the charge. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 288, Issue 10). <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.429274>
- Freeze, H. H., Eklund, E. A., Ng, B. G., & Patterson, M. C. (2015). Neurological Aspects of Human Glycosylation Disorders. *Annual Review of Neuroscience*, 38. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034019>
- Fujihira, H., Asahina, M., & Suzuki, T. (2022). Physiological importance of NGLY1, as revealed by rodent model analyses. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 171, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/jb/mvab101>
- Galeone, A., Adams, J. M., Matsuda, S., Presa, M. F., Pandey, A., Han, S. Y., Tachida, Y., Hirayama, H., Vaccari, T., Suzuki, T., Lutz, C. M., Affolter, M., Zuberi, A., & Jafar-Nejad, H. (2020). Regulation of BMP4/Dpp retrotranslocation and signaling by deglycosylation. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.55596>
- Galeone, A., Han, S. Y., Huang, C., Hosomi, A., Suzuki, T., & Jafar-Nejad, H. (2017). Tissue-specific regulation of BMP signaling by *Drosophila* N-glycanase. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.27612>
- Ghaemmaghani, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., & Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959). <https://doi.org/10.1038/nature02046>
- Goodspeed, K., Feng, C., Laine, M., & Lund, T. C. (2021). Aspartylglucosaminuria: Clinical Presentation and Potential Therapies. In *Journal of Child Neurology* (Vol. 36, Issue 5). <https://doi.org/10.1177/0883073820980904>
- Gorman, G. S., Chinnery, P. F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D. R., Zeviani, M., & Turnbull, D. M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- Grotzke, J. E., Lu, Q., & Cresswell, P. (2013). Deglycosylation-dependent fluorescent proteins provide unique tools for the study of ER-associated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.1300328110>
- Haijes, H. A., de Sain-van der Velden, M. G. M., Prinsen, H. C. M. T., Willems, A. P., van der Ham, M., Gerrits, J., Couse, M. H., Friedman, J. M., van Karnebeek, C. D.

- M., Selby, K. A., van Hasselt, P. M., Verhoeven-Duif, N. M., & Jans, J. J. M. (2019). Aspartylglycosamine is a biomarker for NGLY1-CDDG, a congenital disorder of deglycosylation. *Molecular Genetics and Metabolism*, *127*(4).  
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.001>
- Han, S. Y., Pandey, A., Moore, T., Galeone, A., Duraine, L., Cowan, T. M., & Jafar-Nejad, H. (2020). A conserved role for AMP-activated protein kinase in NGLY1 deficiency. *PLoS Genetics*, *16*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009258>
- Harada, Y., Hirayama, H., & Suzuki, T. (2015). Generation and degradation of free asparagine-linked glycans. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 72, Issue 13). <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1881-7>
- Hirawat, S., Welch, E. M., Elfring, G. L., Northcutt, V. J., Paushkin, S., Hwang, S., Leonard, E. M., Almstead, N. G., Ju, W., Peltz, S. W., & Miller, L. L. (2007). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, *47*(4). <https://doi.org/10.1177/0091270006297140>
- Hirayama, H., Tachida, Y., Fujinawa, R., Matsuda, Y., Murase, T., Nishiuchi, Y., & Suzuki, T. (2024). Development of a fluorescence and quencher-based FRET assay for detection of endogenous peptide:N-glycanase/NGLY1 activity. *Journal of Biological Chemistry*, *300*(4). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107121>
- Hirayama, H., Tachida, Y., Seino, J., & Suzuki, T. (2022). A method for assaying peptide: N-glycanase/N-glycanase 1 activities in crude extracts using an N-glycosylated cyclopeptide. *Glycobiology*, *32*(2).  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwab115>
- Hirsch, C., Blom, D., & Ploegh, H. L. (2003). A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO Journal*, *22*(5).  
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg107>
- Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., & Nagata, K. (2009). Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(25). <https://doi.org/10.1074/jbc.M809725200>
- Isbell, H. S., & Frush, H. L. (1950). Effect of pH in the mutarotation and hydrolysis of glycosylamines. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 72, Issue 2).  
<https://doi.org/10.1021/ja01158a527>

- Kalfon, L., Baydany, M., Samra, N., Heno, N., Segal, Z., Eran, A., Yulevich, A., Fellig, Y., Mandel, H., & Falik-Zaccai, T. C. (2022). Congenital Hypotonia: Cracking a SAGA of consanguineous kindred harboring four genetic variants. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *10*(1). <https://doi.org/10.1002/mgg3.1849>
- Kario, E., Tirosh, B., Ploegh, H. L., & Navon, A. (2008). N-linked glycosylation does not impair proteasomal degradation but affects class I major histocompatibility complex presentation. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(1). <https://doi.org/10.1074/jbc.M706237200>
- Katiyar, S., Joshi, S., & Lennarz, W. J. (2005). The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(10). <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0345>
- Kitajima, K., Suzuki, T., Kouchi, Z., Inoue, S., & Inoue, Y. (1995). Identification and distribution of peptide N-glycanase (PNGase) in mouse organs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *319*(2). <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1309>
- Koizumi, S., Irie, T., Hirayama, S., Sakurai, Y., Yashiroda, H., Naguro, I., Ichijo, H., Hamazaki, J., & Murata, S. (2016). The aspartyl protease DDI2 activates Nrf1 to compensate for proteasome dysfunction. *ELife*, *5*(AUGUST). <https://doi.org/10.7554/eLife.18357>
- Kong, J., Peng, M., Ostrovsky, J., Kwon, Y. J., Oretsky, O., McCormick, E. M., He, M., Argon, Y., & Falk, M. J. (2018). Mitochondrial function requires NGLY1. *Mitochondrion*, *38*. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.07.008>
- LaLonde, D. P., & Bretscher, A. (2011). The UBX protein SAKS1 negatively regulates endoplasmic reticulum-associated degradation and p97-dependent degradation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(6). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.158030>
- Lam, C., Ferreira, C., Krasnewich, D., Toro, C., Latham, L., Zein, W. M., Lehky, T., Brewer, C., Baker, E. H., Thurm, A., Farmer, C. A., Rosenzweig, S. D., Lyons, J. J., Schreiber, J. M., Gropman, A., Lingala, S., Ghany, M. G., Solomon, B., MacNamara, E., ... Wolfe, L. (2017). Prospective phenotyping of NGLY1-CDDG, the first congenital disorder of deglycosylation. *Genetics in Medicine*, *19*(2). <https://doi.org/10.1038/gim.2016.75>
- Lam, C., Wolfe, L., Need, A., Shashi, V., & Enns, G. (1993). NGLY1-Related Congenital Disorder of Deglycosylation. In *GeneReviews*®.

- Lambertson, D., Chen, L., & Madura, K. (2003). Investigating the importance of proteasome-interaction for Rad23 function. In *Current Genetics* (Vol. 42, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0350-7>
- Li, G., Zhao, G., Zhou, X., Schindelin, H., & Lennarz, W. J. (2006). The AAA ATPase p97 links peptide N-glycanase to the endoplasmic reticulum-associated E3 ligase autocrine motility factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.0602747103>
- Li, G., Zhou, X., Zhao, G., Schindelin, H., & Lennarz, W. J. (2005). Multiple modes of interaction of the deglycosylation enzyme, mouse peptide N-glycanase, with the proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.0507155102>
- Maerz, S., Funakoshi, Y., Negishi, Y., Suzuki, T., & Seiler, S. (2010). The Neurospora peptide:N-glycanase ortholog PNG1 is essential for cell polarity despite its lack of enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045302>
- Makino, M., Kojima, T., Ohgushi, T., & Yamashina, I. (1968). Studies on enzymes acting on glycopeptides. *Journal of Biochemistry*, 63(2). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128760>
- McNeill, H., Knebel, A., Arthur, J. S. C., Cuenda, A., & Cohen, P. (2004). A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *Biochemical Journal*, 384(2). <https://doi.org/10.1042/BJ20041498>
- Miao, X., Wu, J., Chen, H., & Lu, G. (2022). Comprehensive Analysis of the Structure and Function of Peptide:N-Glycanase 1 and Relationship with Congenital Disorder of Deglycosylation. In *Nutrients* (Vol. 14, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/nu14091690>
- Mosse, C. A., Meadows, L., Luckey, C. J., Kittlesen, D. J., Huczko, E. L., Slingluff, C. L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Engelhard, V. H. (1998). The class I antigen-processing pathway for the membrane protein tyrosinase involves translation in the endoplasmic reticulum and processing in the cytosol. *Journal of Experimental Medicine*, 187(1). <https://doi.org/10.1084/jem.187.1.37>
- Mueller, W. F., Jakob, P., Sun, H., Clauder-Münster, S., Ghidelli-Disse, S., Ordonez, D., Boesche, M., Bantscheff, M., Collier, P., Haase, B., Benes, V., Paulsen, M., Sehr, P., Lewis, J., Drewes, G., & Steinmetz, L. M. (2020). Loss of N-glycanase 1

- alters transcriptional and translational regulation in K562 cell lines. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(5). <https://doi.org/10.1534/g3.119.401031>
- Mueller, W. F., Zhu, L., Tan, B., Dwight, S., Beahm, B., Wilsey, M., Wechsler, T., Mak, J., Cowan, T., Pritchett, J., Taylor, E., & Crawford, B. E. (2022a). GlcNAc-Asn is a biomarker for NGLY1 deficiency. *Journal of Biochemistry*, 171(2). <https://doi.org/10.1093/jb/mvab111>
- Mueller, W. F., Zhu, L., Tan, B., Dwight, S., Beahm, B., Wilsey, M., Wechsler, T., Mak, J., Cowan, T., Pritchett, J., Taylor, E., & Crawford, B. E. (2022b). GlcNAc-Asn is a biomarker for NGLY1 deficiency. *Journal of Biochemistry*, 171(2). <https://doi.org/10.1093/jb/mvab111>
- Need, A. C., Shashi, V., Hitomi, Y., Schoch, K., Shianna, K. V., McDonald, M. T., Meisler, M. H., & Goldstein, D. B. (2012). Clinical application of exome sequencing in undiagnosed genetic conditions. *Journal of Medical Genetics*, 49(6). <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100819>
- Needs, S. H., Bootman, M. D., Grotzke, J. E., Kramer, H. B., & Allman, S. A. (2022). Off-target inhibition of NGLY1 by the polycaspase inhibitor Z-VAD-fmk induces cellular autophagy. *FEBS Journal*, 289(11). <https://doi.org/10.1111/febs.16345>
- Northrop, A., Vangala, J. R., Feygin, A., & Radhakrishnan, S. K. (2020). Disabling the protease DDI2 attenuates the transcriptional activity of NRF1 and potentiates proteasome inhibitor cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010327>
- Ogbonmide, T., Rathore, R., Rangrej, S. B., Hutchinson, S., Lewis, M., Ojilere, S., Carvalho, V., & Kelly, I. (2023). Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy (SMA): A Review of Current Challenges and Safety Considerations for Onasemnogene Apeparvovec (Zolgensma). *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.36197>
- Owings, K. G., Lowry, J. B., Bi, Y., Might, M., & Chow, C. Y. (2018). Transcriptome and functional analysis in a Drosophila model of NGLY1 deficiency provides insight into therapeutic approaches. *Human Molecular Genetics*, 27(6). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy026>
- Pandey, A., Adams, J. M., Han, S. Y., & Jafar-Nejad, H. (2022). NGLY1 Deficiency, a Congenital Disorder of Deglycosylation: From Disease Gene Function to Pathophysiology. In *Cells* (Vol. 11, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/cells11071155>

- Pandey, A., & Jafar-Nejad, H. (2022). Tracing the NGLY1 footprints: Insights from *Drosophila*. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 171, Issue 2).  
<https://doi.org/10.1093/jb/mvab084>
- Park, S., Jang, I., Zuber, C., Lee, Y., Cho, J. W., Matsuo, I., Ito, Y., & Roth, J. (2014). ERADication of EDEM1 occurs by selective autophagy and requires deglycosylation by cytoplasmic peptide N-glycanase. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(2). <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1204-3>
- Phillips, B. P., Gomez-Navarro, N., & Miller, E. A. (2020). Protein quality control in the endoplasmic reticulum. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 65).  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.04.002>
- Roth, J., & Zuber, C. (2017). Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 147, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1513-9>
- Sauer, B. (1994). Site-specific recombination: developments and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(5). [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90068-X)
- Schwarz, F., & Aebi, M. (2011). Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 21, Issue 5).  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.08.005>
- Sharma, J., Du, M., Wong, E., Mutyam, V., Li, Y., Chen, J., Wangen, J., Thrasher, K., Fu, L., Peng, N., Tang, L., Liu, K., Mathew, B., Bostwick, R. J., Augelli-Szafran, C. E., Bihler, H., Liang, F., Mahiou, J., Saltz, J., ... Bedwell, D. M. (2021). A small molecule that induces translational readthrough of CFTR nonsense mutations by eRF1 depletion. *Nature Communications*, 12(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24575-x>
- Stanclift, C. R., Dwight, S. S., Lee, K., Eijkenboom, Q. L., Wilsey, M., Wilsey, K., Kobayashi, E. S., Tong, S., & Bainbridge, M. N. (2022). NGLY1 deficiency: estimated incidence, clinical features, and genotypic spectrum from the NGLY1 Registry. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13023-022-02592-3>
- Stuut, T., Popescu, O., & Oviedo, A. (2021). N-Glycanase 1 Deficiency Is a Rare Cause of Pediatric Neurodegeneration With Neuronal Inclusions and Liver Steatosis. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.19126>
- Suzuki, T. (2005). A simple, sensitive in vitro assay for cytoplasmic deglycosylation by peptide: N-glycanase. *Methods*, 35(4). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.10.008>

- Suzuki, T., Huang, C., Harada, Y., Hosomi, A., Masahara-Negishi, Y., Seino, J., Fujihira, H., Funakoshi, Y., Suzuki, T., & Dohmae, N. (2015). Endo- $\beta$ -n-acetylglucosaminidase forms N-GlcNAc protein aggregates during ER-associated degradation in NGLY1-defective cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(5).  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414593112>
- Suzuki, T., Kitajima, K., Emori, Y., Inoue, Y., & Inoue, S. (1997). Site-specific de-N-glycosylation of diglycosylated ovalbumin in hen oviduct by endogenous peptide: N-glycanase as a quality control system for newly synthesized proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(12). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6244>
- Suzuki, T., Kitajima, K., Inoue, Y., & Inoue, S. (1995). Carbohydrate-binding property of peptide:N-glycanase from mouse fibroblast L-929 cells as evaluated by inhibition and binding experiments using various oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(25). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15181>
- Suzuki, T., Park, H., Anderson Till, E., & Lennarz, W. J. (2001). The PUB domain: A putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *287*(5).  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5688>
- Suzuki, T., Park, H., Hollingsworth, N. M., Sternglanz, R., & Lennarz, W. J. (2000). PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide: N-glycanase. *Journal of Cell Biology*, *149*(5). <https://doi.org/10.1083/jcb.149.5.1039>
- Suzuki, T., Park, H., & Lennarz, W. J. (2002). Cytoplasmic peptide: N -glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions . *The FASEB Journal*, *16*(7). <https://doi.org/10.1096/fj.01-0889rev>
- Suzuki, T., Seko, A., Kitajima, K., Inoue, Y., & Inoue, S. (1993). Identification of Peptide:N-Glycanase Activity in Mammalian-Derived Cultured Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *194*(3).  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1938>
- Tachida, Y., Hirayama, H., & Suzuki, T. (2023). Amino acid editing of NFE2L1 by PNGase causes abnormal mobility on SDS-PAGE. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1867*(12). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2023.130494>

- Takahashi, N. (1977). Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 76(4).  
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90982-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90982-2)
- Talsness, D. M., Owings, K. G., Coelho, E., Mercenne, G., Pleinis, J. M., Partha, R., Hope, K. A., Zuberi, A. R., Clark, N. L., Lutz, C. M., Rodan, A. R., & Chow, C. Y. (2020). A drosophila screen identifies nkcc1 as a modifier of ngly1 deficiency. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.57831>
- Tomlin, F. M., Gerling-Driessen, U. I. M., Liu, Y. C., Flynn, R. A., Vangala, J. R., Lentz, C. S., Clauder-Muenster, S., Jakob, P., Mueller, W. F., Ordoñez-Rueda, D., Paulsen, M., Matsui, N., Foley, D., Rafalko, A., Suzuki, T., Bogoyo, M., Steinmetz, L. M., Radhakrishnan, S. K., & Bertozzi, C. R. (2017a). Inhibition of NGLY1 Inactivates the Transcription Factor Nrfl and Potentiates Proteasome Inhibitor Cytotoxicity. *ACS Central Science*, 3(11).  
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00224>
- Tomlin, F. M., Gerling-Driessen, U. I. M., Liu, Y. C., Flynn, R. A., Vangala, J. R., Lentz, C. S., Clauder-Muenster, S., Jakob, P., Mueller, W. F., Ordoñez-Rueda, D., Paulsen, M., Matsui, N., Foley, D., Rafalko, A., Suzuki, T., Bogoyo, M., Steinmetz, L. M., Radhakrishnan, S. K., & Bertozzi, C. R. (2017b). Inhibition of NGLY1 Inactivates the Transcription Factor Nrfl and Potentiates Proteasome Inhibitor Cytotoxicity. *ACS Central Science*, 3(11).  
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00224>
- Tong, S., Ventola, P., Frater, C. H., Klotz, J., Phillips, J. M., Muppidi, S., Dwight, S. S., Mueller, W. F., Beahm, B. J., Wilsey, M., & Lee, K. J. (2023). NGLY1 deficiency: a prospective natural history study. *Human Molecular Genetics*, 32(18), 2787–2796. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddad106>
- Uma Maheswari, T. N., & Shanmugasundaram, P. (2013a). Amlexanox in treatment of aphthous ulcers: A systematic review. *Journal of Pharmacy Research*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.033>
- Uma Maheswari, T. N., & Shanmugasundaram, P. (2013b). Amlexanox in treatment of aphthous ulcers: A systematic review. *Journal of Pharmacy Research*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.033>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S.

- (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Yang, K., Huang, R., Fujihira, H., Suzuki, T., & Yan, N. (2018). N-glycanase NGLY1 regulates mitochondrial homeostasis and inflammation through NRF1. *Journal of Experimental Medicine*, 215(10). <https://doi.org/10.1084/JEM.20180783>
- Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2016). Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 26, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>
- Ye, Y., & Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrm2780>
- Yokoi, M., & Hanaoka, F. (2017). Two mammalian homologs of yeast Rad23, HR23A and HR23B, as multifunctional proteins. In *Gene* (Vol. 597). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.027>
- Yoshida, Y., Asahina, M., Murakami, A., Kawawaki, J., Yoshida, M., Fujinawa, R., Iwai, K., Tozawa, R., Matsuda, N., Tanaka, K., & Suzuki, T. (2021). Loss of peptide:N-glycanase causes proteasome dysfunction mediated by a sugar-recognizing ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.2102902118>
- Zhao, G., Zhou, X., Wang, L., Li, G., Kisker, C., Lennarz, W. J., & Schindelin, H. (2006). Structure of the mouse peptide N-glycanase-HR23 complex suggests co-evolution of the endoplasmic reticulum-associated degradation and DNA repair pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19). <https://doi.org/10.1074/jbc.M600137200>
- Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J. R., & Mohammed, S. (2013). Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *Journal of Proteome Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1021/pr300630k>
- Zhou, X., Zhao, G., Truglio, J. J., Wang, L., Li, G., Lennarz, W. J., & Schindelin, H. (2006). Structural and biochemical studies of the C-terminal domain of mouse peptide-N-glycanase identify it as a mannose-binding module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46). <https://doi.org/10.1073/pnas.0602954103>

Zhu, L., Tan, B., Dwight, S. S., Beahm, B., Wilsey, M., Crawford, B. E., Schweighardt, B., Cook, J. W., Wechsler, T., & Mueller, W. F. (2022). AAV9-NGLY1 gene replacement therapy improves phenotypic and biomarker endpoints in a rat model of NGLY1 Deficiency. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.09.015>

## 12. Publikationsverzeichnis

Banning, A., Hoeren, L., Atallah, I., Orczyk, R., Jacquier, D., Ballhausen, D., Tikkanen, R. Structural and Functional Characterization of N-Glycanase-1 Pathogenic Variants. *Cells*. 2025 Jul 7;14(13):1036. doi: 10.3390/cells14131036. PMID: 40643555; PMCID: PMC12248763.

### 13. Ehrenwörtliche Erklärung

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. 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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 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

## 14. Danksagung

Im Anschluss möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion, in welcher Form auch immer, unterstützt und motiviert haben.

Allen voran möchte ich mich (erneut) bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Ritva Tikkanen bedanken. Es ist nicht selbstverständlich nach einer bereits absolvierten Promotion erneut das Vertrauen zu bekommen ein weiteres Mal promovieren zu dürfen. Unabhängig von der Fragestellung konnte ich mich jederzeit mit meinen Anliegen an sie wenden und wurde stets gut bereut.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank auch Dr. Antje Banning, die mich als direkte Betreuerin durch meine gesamte Laborzeit und Korrekturphase begleitet hat. Auch den anderen Mitgliedern der AG Tikkanen möchte ich meinen Dank für die tolle Unterstützung aussprechen: Dr. Anna Zakrzewicz, Benedikt Beckert, Dr. Miroslava Didiasova, Ralf Füllkrug und Simone Kegel.

Besonderer Dank gilt meiner Frau Annika, die mich erfolgreich bereits durch meine erste Promotionsphase begleitet hat. Danke für deine Geduld und deine Nachsicht mit mir. Ich weiß, dass ich sogar bei einer dritten Promotion auf dich zählen könnte.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mich schon immer bei meinen Zielen unterstützt und motiviert hat und das weiterhin tut.