

**Personalisierte Therapieansätze für p.Q137\*- und  
p.R116Q-Varianten bei Aspartylglukosaminurie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von Rommel, Tabea C.

Gießen (2022)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Biochemisches Institut

Gutachterin und Betreuerin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: PD Dr. Clemens Kamrath

Tag der Disputation: 07.06.2023

1	Einleitung .....	1
1.1	Lysosomale Speicherkrankheiten.....	1
1.2	Aspartylglukosaminurie (AGU) .....	2
1.2.1	Klinisches Bild .....	2
1.2.2	Diagnostik .....	3
1.2.3	Therapie.....	4
1.2.4	Differentialdiagnosen.....	6
1.3	Lysosomen.....	6
1.4	Aspartylglukosaminidase (AGA) .....	7
1.4.1	Das Protein und seine Funktion .....	7
1.4.2	Prozessierung und Proteinstruktur .....	8
1.4.3	Molekularbiologie .....	10
1.4.4	Bekannte krankheitsauslösende AGA-Varianten .....	10
1.5	<i>Missense</i> -Varianten.....	11
1.6	<i>Nonsense</i> -Varianten.....	12
1.6.1	Relevante Aspekte der Translation.....	12
1.6.2	<i>Nonsense</i> -vermittelter mRNA-Abbau (NMD) .....	13
1.7	Ziele der Arbeit.....	14
2	Material .....	15
2.1	Material und Geräte.....	15
2.2	Medikamente, Chemikalien, Lösungen und Puffer .....	17
2.3	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	25
2.4	Primer .....	27
2.5	Plasmide .....	28
2.6	Enzyme.....	28
2.7	Humane Zelllinien und Bakterienstämme .....	29
3	Methoden .....	30
3.1	Zellbiologische Methoden.....	30
3.1.1	Kultivierung .....	30
3.1.2	Passagierung .....	30
3.1.3	Einfrieren von Zellkulturen.....	30
3.1.4	Transfektion .....	30
3.1.5	Stabile Transfektion .....	31
3.1.6	Immunfluoreszenz.....	31
3.1.6.1	Lysotracker .....	31
3.1.6.2	Immunfluoreszenzfärbung.....	32
3.2	Molekulargenetische Methoden.....	32

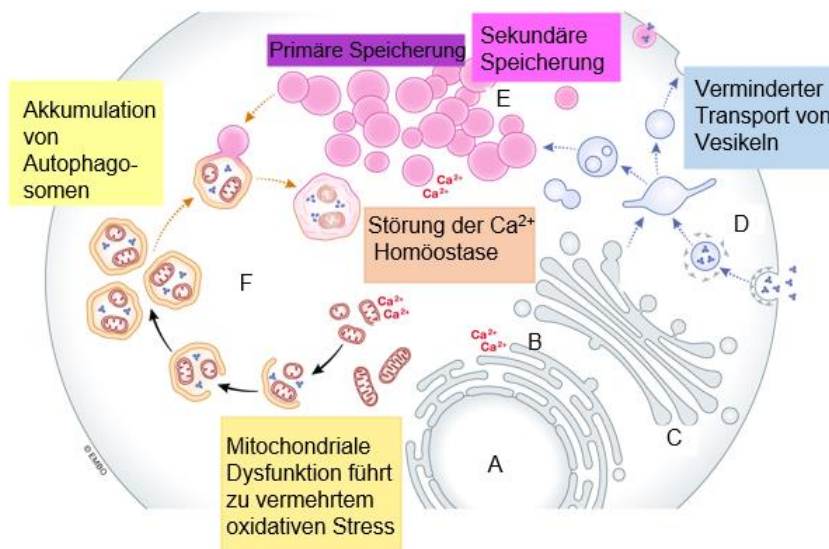
3.2.1	Transformation.....	33
3.2.2	Midi-Präparation.....	33
3.2.3	Gewinnung von Zellysaten .....	33
3.2.4	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford.....	34
3.2.5	SDS-PAGE und Western Blot .....	34
3.2.5.1	Vorbereitung der Proben.....	34
3.2.5.2	Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE .....	34
3.2.5.3	Transfer und Blotting.....	35
3.2.5.4	Proteindetektion .....	35
3.2.6	AGA Aktivitätsmessung.....	36
3.2.7	Mutagenese .....	36
3.2.7.1	PCR .....	36
3.2.7.2	DpnI-Verdau.....	37
3.2.8	Luciferaseassay .....	37
3.2.9	RT-qPCR .....	38
3.2.9.1	Zellernte.....	38
3.2.9.2	RNA Isolierung.....	38
3.2.9.3	DNase-Verdau .....	38
3.2.9.4	Konzentrationsbestimmung.....	39
3.2.9.5	Reverse Transkription .....	39
3.2.9.6	Real time PCR .....	39
3.3	Ethikvotum .....	39
3.4	Statistik .....	40
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Charakterisierung der Nonsense-Variante p.Q137*.....	41
4.1.1	Mikroskopische Anatomie erkrankter p.Q137*/ AGU <sub>Fin-Major</sub> -Fibroblasten	41
4.1.2	Relative Menge an AGA-mRNA von p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> -Patientenfibroblasten.....	43
4.1.3	AGA-Grundaktivität von p.Q137* in transfizierten Zellen .....	44
4.1.4	Prozessierung von AGA in p.Q137* transfizierten Zellen.....	45
4.2	Behandlung von p.Q137* transfizierten Zellen.....	46
4.2.1	Behandlung von p.Q137* transient transfizierter Zellen.....	46
4.2.2	Behandlung von p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> ko-transfizierten Zellen.....	47
4.2.3	Behandlung von p.Q137* stabil transfizierten Zellen .....	50
4.3	Behandlung von p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten .....	51
4.3.1	Aktivitätsanalyse .....	52
4.3.2	RT-qPCR-Analyse der relativen AGA mRNA-Menge.....	54
4.3.3	Mikroskopische Anatomie von behandelten Patientenfibroblasten .....	56

4.4	Klonierung der AGA-Luciferase-Fusion in pcDNA3 Plasmide.....	58
4.5	Luciferaseassay und Western Blot der AGA-Luciferase-Fusion .....	58
4.6	Charakterisierung der <i>Missense</i> -Variante p.R116Q .....	60
4.6.1	AGA-Restaktivität in p.R116Q transfizierten Zellen .....	60
4.7	Behandlung von p.R116Q transfizierten Zellen .....	61
4.7.1	Prozessierung und Behandlung von p.R116Q transient transfizierten Zellen .....	61
4.7.2	Behandlung von p.R116Q stabil transfizierten Zellen .....	63
4.7.3	Ko-Transfektion von p.R116Q/Wildtyp .....	65
5	Diskussion.....	68
5.1	Therapieoptionen für die AGU-Variante p.Q137*.....	68
5.1.1	Molekulare Auswirkungen der Variante p.Q137* .....	68
5.1.2	Pharmakologische Induktion von <i>Readthrough</i> .....	69
5.1.3	Wirkung der Aminoglykoside .....	71
5.1.4	Wirkung von Ataluren/PTC124 .....	72
5.1.5	Wirkung von Amlexanox.....	74
5.1.5.1	Luciferase-Methode .....	76
5.1.6	Wirkung von Koffein .....	77
5.2	Therapieoptionen für die AGU-Variante p.R116Q .....	79
5.2.1	Molekulare Auswirkungen der Variante p.R116Q.....	79
5.2.1.1	Vergleich der Varianten p.R116Q und p.R116W .....	80
5.2.1.2	Vergleich der Varianten p.R116Q und AGU <sub>Fin-Major</sub> .....	81
5.2.2	Wirkung von Betain .....	81
5.2.3	Wirkung von Trehalose .....	82
5.2.4	Synergistischer Effekt auf p.R116Q durch Koexpression mit Wildtyp-AGA .....	84
5.3	Ausblick.....	85
6	Summary.....	87
7	Zusammenfassung.....	88
8	Abkürzungsverzeichnis .....	89
9	Abbildungsverzeichnis.....	90
10	Tabellenverzeichnis.....	93
11	Literaturverzeichnis .....	94
12	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation .....	105
13	Danksagung.....	106
14	Stipendium und öffentlicher Vortrag .....	107

# 1 Einleitung

## 1.1 Lysosomale Speicherkrankheiten

Lysosomale Speicherkrankheiten sind eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, deren Phänotyp und Pathologie bereits im 19. Jahrhundert beschrieben wurden (Parenti et al. 2021). Es handelt sich um Defekte verschiedener Komponenten der lysosomalen Funktion. Die meisten dieser Erkrankungen betreffen lysosomale Hydrolasen. Neuere Forschung hat gezeigt, dass der Abbau von Makromolekülen nicht die einzige Funktion von Lysosomen darstellt. Vielmehr handelt es sich um dynamische Elemente, die in multiple zelluläre Signalwege eingebunden sind. Daher kommt es bei lysosomalen Speicherkrankheiten nicht nur zur Ablagerung des primären Substrates, sondern zur Beeinflussung von komplexen pathogenetischen Signalwegen (Parenti et al. 2021).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen einer lysosomalen Speicherkrankheit, modifiziert nach Parenti et al. 2021.** Die Akkumulation von Substraten, die nicht abgebaut werden können, beeinflusst die Zelle auf multiple Art und Weise. Neben der Speicherung des primären Substrates kommt es zur Ablagerung sekundärer Substanzen, die nicht mit dem primären Substrat in direkter Verbindung stehen. Des Weiteren kommt es zu einem verminderten Fluss sowie einer gehemmten Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen, so dass die Autophagosomen akkumulieren. Der Kalziumhaushalt wird in Lysosomen, dem ER und den Mitochondrien gestört, so dass es vermehrt zur mitochondrialen Dysfunktion kommt, die zu erhöhtem oxidativen Stress führt. Bedingt durch die lysosomale Speicherkrankheit entstehen abweichende Zusammensetzungen von Membranen, die zur abnormen Fusion und

Transport von Vesikeln führen. A: Zellkern, B: Endoplasmatisches Retikulum, C: Golgi-Apparat, D: Endozytose, E: Lysosomen, F: Zyklus der Autophagie.

## 1.2 Aspartylglukosaminurie (AGU)

Die Aspartylglukosaminurie (AGU) ist eine seltene, rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, bei der es zur Ablagerung von Glykoasparaginen in den Lysosomen kommt. Es handelt sich somit um eine generalisierte Stoffwechselerkrankung, die insbesondere mit neuropsychiatrischen Symptomen sowie strukturellen Veränderungen in verschiedenen Geweben einhergeht. Die AGU verläuft progressiv, führt zu einer verkürzten Lebenserwartung und ist bis heute nicht heilbar.

Die AGU wurde erstmalig 1968 anhand einer britischen Familie mit zwei Kindern, die an einer verzögerten geistigen Entwicklung litten, sowie nach einer Screening-Studie in Finnland beschrieben (Pollitt et al. 1968; Palo 1967). Seitdem ist eine hohe Prävalenz in der finnischen Bevölkerung beobachtet worden. Außerhalb von Finnland werden einzelne, aber steigende Fälle von AGU berichtet. Über 300 AGU-Patienten sind weltweit bekannt, von denen etwa 200 aus Finnland stammen. Es handelt sich um die häufigste lysosomale Speicherkrankheit, die durch eine Störung des Abbaus von Glykoproteinen entsteht (Arvio und Mononen 2016).

### 1.2.1 Klinisches Bild

Charakteristisch für das klinische Bild der AGU ist der progrediente Verlauf der Erkrankung, der sich bei weiblichen Patienten etwas milder darstellt. Nach zunächst normalem Schwangerschaftsverlauf und Geburtsparametern erfolgt eine regelrechte Entwicklung bis zum 2. oder 3. Lebensjahr. Als erstes Frühsymptom wird häufig ein Wachstumsschub mit Zunahme des Kopfumfanges beobachtet. Assoziiert ist dieser mit dem vermehrten Auftreten von umbilikalen und inguinalen Hernien, Infektionen der Atemwege sowie Makrozephalie. (Arvio et al. 1999). Das Leitsymptom stellt die progressive geistige Behinderung dar. Diese zeigt sich in der Frühphase in einer verlangsamten Sprachentwicklung, schlechten koordinativen Fähigkeiten und Hyperaktivität. Des Weiteren lässt sich in der frühen symptomatischen Phase bei einigen Patienten eine Veränderung der Persönlichkeit beobachten (Arvio et al. 1993a; Arvio et al. 1993b). Den Höhepunkt des kognitiven Niveaus scheinen AGU-Patienten noch vor dem 11. Lebensjahr zu erreichen, obwohl geistige Fähigkeiten darüber hinaus noch entwickelt werden können (Harjunen et al. 2020).

Da es sich bei der AGU um eine generalisierte Erkrankung handelt, zeigt sie im Krankheitsverlauf ein weites Spektrum an Symptomen mit der Beteiligung multipler Organsysteme. Ein charakteristisches Phänomen ist die Abnahme des in der Frühphase erhöhten Kopfumfangs (Arvio et al. 2005). Häufige Symptome sind muskuloskelettale Abnormalitäten wie beispielsweise eine Makrozephalie und ungewöhnlich dünne Röhrenknochen. Dismorphologien der orofazialen Strukturen sowie das vermehrte Auftreten von Erkrankungen im oralen Bereich, wie Karies, Gingivahyperplasie und orale Candidose sind bei fast allen erwachsenen Patienten zu finden (Arvio et al. 1998b). Laborchemisch wurden Leukozytopenien beobachtet. Des Weiteren wurden charakteristische Eisenanreicherungen im Thalamus bei Patienten im Schädel-MRT detektiert (Tokola et al. 2019; Sairanen et al. 2020). Zusätzlich kommt es in Assoziation mit der AGU zum Auftreten weiterer Erkrankungen: Es leiden etwa 1/3 der erwachsenen Patienten an epileptischen Anfällen, bei 20% kommt es zum Auftreten von psychiatrischen Erkrankungen und 5% leiden an rheumatoider Arthritis (Arvio et al. 1993b; Arvio et al. 1998a; Ambrosetto und Santucci 2009).

Die Krankheit schreitet progressiv fort, so dass im Erwachsenenalter die meisten Patienten schwerbehindert sind. Die Phase vor dem Tod ist oft von einer starken Fatigue bis hin zur Dystonie gekennzeichnet. Die häufigste Todesursache sind bakterielle Infektionen der Atemwege (Arvio und Mononen 2016). Die Lebenserwartung erkrankter Männer lag 2002 um das 45., erkrankter Frauen um das 50. Lebensjahr, verbessert sich allerdings in den letzten Jahrzehnten (Arvio und Arvio 2002).

### 1.2.2 Diagnostik

Liegt der Verdacht einer AGU vor, sollte eine Untersuchung von im Urin ausgeschiedenen Oligosacchariden vorgenommen werden. Dies ist eine einfache, nicht-invasive Screening- Methode, um den Verdacht einer AGU zu erhärten bzw. diese auszuschließen (Mononen et al. 1988; Xia et al. 2013). Liegt eine erhöhte Konzentration von Aspartylglukosaminen vor, wird die Diagnose entweder über die Bestimmung der AGA-Aktivität in einem Enzymassay in Leukozyten, Fibroblasten oder im Serum gesichert, oder es erfolgt heutzutage direkt die Genom- oder Exom- Sequenzierung (Mononen et al. 1994a; Kaartinen und Mononen 1990; Goodspeed et al. 2021).

Zur pränatalen Identifizierung der Erkrankung reicht die Analyse der Amnionflüssigkeit nicht aus. Stattdessen muss die Bestimmung der AGA-Aktivität in kultivierten Amnionzellen oder Chorionzotten erfolgen, um eine verlässliche Aussage über das Vorliegen der Erkrankung zu treffen (Aula et al. 1984; Aula et al. 1989; Mononen et al.

1988). Neonatal gibt es die Möglichkeit einer Diagnosestellung durch die AGA-Aktivitätsmessung im Nabelschnurserum (Mononen et al. 1994b). Da Träger der AGU keine deutlich erniedrigten AGA-Aktivitätswerte in Leukozyten aufweisen, ist für ihre Identifizierung eine DNA-Analyse in Form einer Sequenzierung notwendig (Mononen et al. 1994a; Hietala et al. 1996). Die auf diese Weise identifizierten, krankheitsverursachenden Genvarianten können ebenfalls genutzt werden, um personalisierte Therapieansätze zu erforschen.

Eine Gemeinsamkeit mit anderen lysosomalen Speicherkrankheiten ist das Vorhandensein von lysosomalen Veränderungen, die in allen Zelllinien der AGU-Patienten in der Mikroskopie detektiert werden können.

### 1.2.3 Therapie

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine kurative Therapie der AGU bekannt. Ein wichtiger Bestandteil der Behandlung der Patienten ist daher die supportive Therapie. Treten Begleiterkrankungen wie epileptische Anfälle, rheumatoide Arthritis oder Infektionen auf, sollten diese nach den allgemeinen Leitlinien therapiert werden (Arvio und Mononen 2016). Patienten, die an epileptischen Anfällen litten, zeigten ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit Carbamazepin (Arvio et al. 1993b). Weiterhin sollten unterstützende Maßnahmen erfolgen, wie die Anbindung an eine Logopädie sowie Physiotherapie. Ergo- und Musiktherapie können helfen, die Sozialkompetenz sowie die Selbstständigkeit der Patienten zu wahren bzw. zu verbessern. Eine ärztliche Aufklärung der Patienten sowie ihrer Angehörigen insbesondere über den Krankheitsverlauf kann helfen, mit der Erkrankung umzugehen. So kann es beispielsweise hilfreich sein zu wissen, dass manisch-apathische Perioden zwar auftreten können, aber meist nicht über das junge Erwachsenenalter hinaus reichen (Arvio und Mononen 2016).

Bisherige experimentelle Therapieversuche zeigten unterschiedliche Resultate. In der Vergangenheit wurde die Möglichkeit einer Knochenmarktransplantation exploriert. Diese konnte in mehreren klinischen Fallstudien keine positiven Ergebnisse zeigen (Arvio et al. 2001; Ringdén et al. 2006). Des Weiteren wurde der Ansatz einer Enzyersatztherapie verfolgt. Hierzu konnte in *in vitro*-Versuchen gezeigt werden, dass rekombinantes humanes AGA in Fibroblasten und Lymphozyten zu einer Korrektur des Enzymdefekts führt (Mononen et al. 1995). Im Mausmodell wurde beobachtet, dass rekombinantes humanes AGA biologisch aktiv ist und im nicht-neuronalen Gewebe die pathophysiologischen Charakteristika der AGU korrigieren konnte. Allerdings wurde bei intravenöser Applikation im ZNS lediglich eine Verbesserung der AGA-Aktivität um 10%,

sowie eine verminderte Glukosaminablagerung erfasst (Dunder et al. 2000). Da die ZNS-Symptomatik allerdings ein zentrales Problem der AGU darstellt, ist insbesondere hier eine gute Wirksamkeit essenziell. Die Passage der Blut-Hirnschranke stellt also eine wichtige Hürde der Enzymersatztherapie, wie auch anderer möglicher Medikamente, dar und könnte über eine intrathekale Applikation umgangen werden. Diese ist im Vergleich zur oralen Medikamentengabe allerdings eine klinisch aufwendige, risikoreiche Intervention. Des Weiteren ist kritisch zu beachten, dass die Herstellung von rekombinanten humanen AGA technisch anspruchsvoll sowie teuer ist, so dass eine flächendeckende klinische Therapie schwer zu realisieren ist (Arvio und Mononen 2016; Dunder et al. 2010). In neuerer Zeit zeigte die Behandlung von Patientenfibroblasten in der Zellkultur mit kleinen molekularen Komponenten, dass diese Substanzen als pharmakologische Chaperone fungieren und therapeutische eingesetzt werden könnten (Banning et al. 2016). Eine klinische Studie mit der Substanz Cystadane lief in Finnland für 4 Jahre, und die Ergebnisse werden derzeit evaluiert (EudraCT Number: 2017-000645-48).

Eine weitere experimentelle Therapieoption, die derzeit für verschiedene seltene Erbkrankheiten in Entwicklung ist und vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat, ist die Gentherapie (Naldini 2015). Die AGU ist ein geeigneter Kandidat, insbesondere da gezeigt wurde, dass ein Teil des exprimierten AGA-Enzyms von den Zellen sezerniert wird und über den Mannose-6-Phosphat-Weg von anderen Zellen aufgenommen werden kann (Enomaa et al. 1995), so dass eine Behandlung in nicht-transduzierten erkrankten Zellpopulationen möglich wird (Sands und Davidson 2006). Mit Adeno-assoziiertem Viren vom Serotyp 9 (AAV9) wurde ein *in vivo*-Gentransfer im Mausmodell in verschiedenen lysosomalen Speicherkrankheiten erforscht (Saraiva et al. 2016; Chen et al. 2021). Adeno-assoziierte Viren sind einzelsträngige DNA-Viren, die zur Familie der Parvoviridae gehören. AVV sind weder pathogen, noch können sie virale Proteine kodieren, sich integrieren oder replizieren, so dass sie als sicher angesehen werden und geeignete Vektoren zur Gentherapie darstellen (Choudhury et al. 2017; Sands und Davidson 2006; Saraiva et al. 2016). Da AAV9 in großen Mengen und hohen Konzentrationen isoliert werden können, ist sowohl eine intravenös, als auch intrathekal Applikation möglich, um in das ZNS zu gelangen (Chen et al. 2021; Saraiva et al. 2016). Im letzten Jahr testeten Chen et al. AAV9/AGA-Vektoren im AGA-Knockout-Mausmodell, welches ein geeignetes genetisches Modell darstellt und den menschlichen AGU-Phänotyp imitiert. Die vorklinische Studie zeigte insbesondere bei intrathekaler Applikation eine vermehrte AGA-Aktivität, eine Elimination des AGA-Substrates in Körperflüssigkeiten, sowie strukturelle Verbesserungen im ZNS (Chen et al. 2021).

Herausforderungen der Gentherapie bestehen beispielsweise in der humoralen Immunantwort, die eine mögliche Re-administration erschwert. Studien zeigten, dass durch Anti-AAV-Kapsid-Antikörper die Effektivität der Re-administration gehemmt wird (Zaiss und Muruve 2005; Peden et al. 2004). Des Weiteren besteht das Risiko durch AAV-Vektoren Tumorgenese auszulösen, wie es im Mausmodell bereits beobachtet wurde (Donsante et al. 2001).

#### 1.2.4 Differentialdiagnosen

Das Leitsymptom der AGU ist eine im Kindesalter beginnende, progrediente geistige Behinderung. Im Allgemeinen ist die geistige Entwicklungsverzögerung mit einer Prävalenz von 2% ein verbreitetes Symptom, das sich in einer Vielzahl von Erkrankungen zeigt. Sowohl endogene als auch exogene Ätiologien, wie beispielsweise ein maternaler C<sub>2</sub>-Abusus in der Schwangerschaft, können vorliegen. Chromosomenaberrationen wie die Trisomie 21, gefolgt von strukturellen ZNS-Fehlbildungen, stellen die häufigsten Ursachen für eine geistige Entwicklungsverzögerung dar.

Andere lysosomale Speicherkrankheiten, die ebenfalls mit einer progredienten geistigen Einschränkung einhergehen, stellen wichtige Differentialdiagnosen dar: Die Salla-Krankheit ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die ebenfalls in Finnland gehäuft vorkommt. Es handelt sich um eine seltene Erkrankung, die sich klinisch von der AGU durch Symptome wie Nystagmus, Ataxie, muskuläre Hypotonie unterscheidet. Ebenfalls kommen einige Subtypen der neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen als Differentialdiagnose in Betracht, insbesondere CLN3 (Arvio und Mononen 2016).

#### 1.3 Lysosomen

Lysosomen sind Zellorganellen, deren Hauptaufgabe es ist, Makromoleküle abzubauen. Da diese Funktion für alle Zellen von außerordentlicher Bedeutung ist, kommen sie ubiquitär in Körperzellen vor, ausgenommen sind Erythrozyten. Die abzubauenden Moleküle stammen entweder aus dem Extrazellulärraum (Endozytose), oder es handelt sich um zelleigenes Material (Autophagie) (Hamer et al. 2012). Der Abbau wird vornehmlich durch über 50 verschiedene Hydrolasen realisiert, welche im sauren Milieu arbeiten (Xu und Ren 2015). Eine dieser ist die Aspartylglukosaminidase. Der lysosomale pH von circa 4,5 wird durch H<sup>+</sup>-ATPasen erreicht, welche in die Biomembran der Organellen integriert sind. In die Membran sind außerdem verschiedene Transporter integriert, welche die Spaltprodukte wieder aus den Lysosomen befördern, sowie

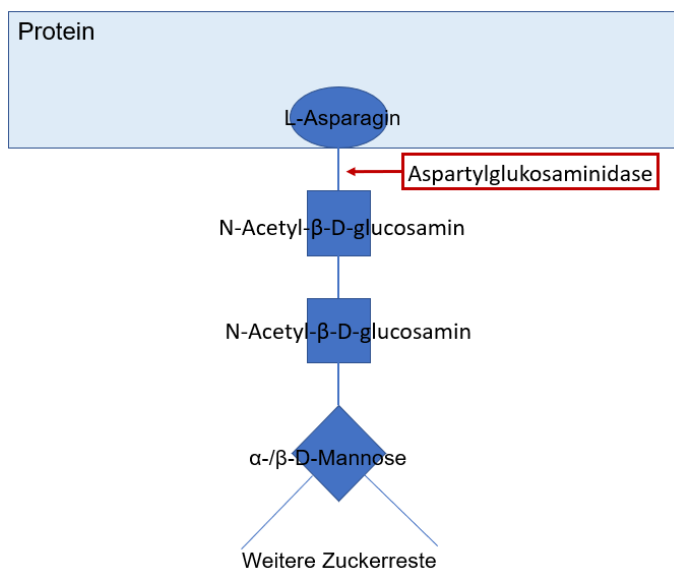
Glykoproteine, deren Funktion es vermutlich ist, die Biomembran vor der hohen Protonenkonzentration sowie vor dem Abbau durch die lysosomalen Hydrolasen zu schützen (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

## 1.4 Aspartylglukosaminidase (AGA)

### 1.4.1 Das Protein und seine Funktion

Ursache der AGU ist die mangelhafte Aktivität des lysosomalen Enzyms Aspartylglukosaminidase (AGA, 1-aspartamido-beta-N-acetylglucosamine Amidohydrolase). Es handelt sich um eine Glykoasparaginase, deren fehlerhafte Funktion zu einer Störung des Abbaus von Glykoasparaginen und anderen Glykokonjugaten führt, welche eine Glykoasparagin-Gruppe am reduzierenden Ende aufweisen (Pollitt et al. 1968).

Glykoproteine bestehen meist aus einem Oligosaccharid, welches am N-Acetylglucosamin-Rest über eine N-glykosidische Bindung mit dem L-Asparaginrest der Polypeptidkette verbunden ist. AGA, welches erstmalig 1965 in der Epidermis von Schafen identifiziert wurde, spaltet die N-glykosidische Bindung der Aspartylglucosamine (2-acetamido-1-( $\beta$ '-L-aspartamido)-1, 2-didesoxyglucose) durch Hydrolyse erst nach Abbau des Peptids (Tikkanen et al. 1996a; Mononen et al. 1993; Murakami und Eylar 1965).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozessierung von Oligosacchariden.**

Die Aspartylglukosaminidase (AGA) spaltet die N-glykosidische Bindung zwischen dem L-Asparagin und dem N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosamin (GlcNAc) durch Hydrolyse nach Abbau des Proteins. Die Verbindungen zwischen den verschiedenen Zuckerresten, die sich

verzweigen und weiter aufspannen, werden durch andere Enzyme, meist ebenfalls Hydrolasen, gespalten.

Da AGA seine katalytische Wirkung durch ein Threonin (Thr206) entfaltet, welches als N-terminaler Rest an der  $\beta'$ -Untereinheit lokalisiert ist, gehört AGA zur Familie der N-terminalen nukleophilen (NTN) Hydrolasen (Brannigan et al. 1995). Die  $\alpha$ -Aminogruppe von Thr206 erhöht als Base die Nukleophilie der OH-Gruppe des Threonins, so dass es zur kovalenten Bindung dieser mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des Glycoasparagin-Substrates kommt (Tikkanen et al. 1996a). Beim Übergangszustand der Enzym-Substrat-Verbindung entsteht eine negativ geladene Carbonyl-Sauerstoff-Verbindung, das so genannte Oxyanion-Loch, welches durch die Alkoholgruppe von Thr257 stabilisiert wird (Oinonen et al. 1995). Durch freiwerdende Kohlenhydrate bricht die kovalente Bindung zwischen Enzym und Produkt auf. Die  $\alpha$ -Aminogruppe von Thr206 ist nicht protoniert und steht zur erneuten Katalyse zur Verfügung (Tikkanen et al. 1996b). Als Produkte entstehen eine Asparaginsäure und ein Aminoglycan, der im weiteren Verlauf in Ammoniak und Oligosaccharid aufgespalten wird (Mononen et al. 1993).

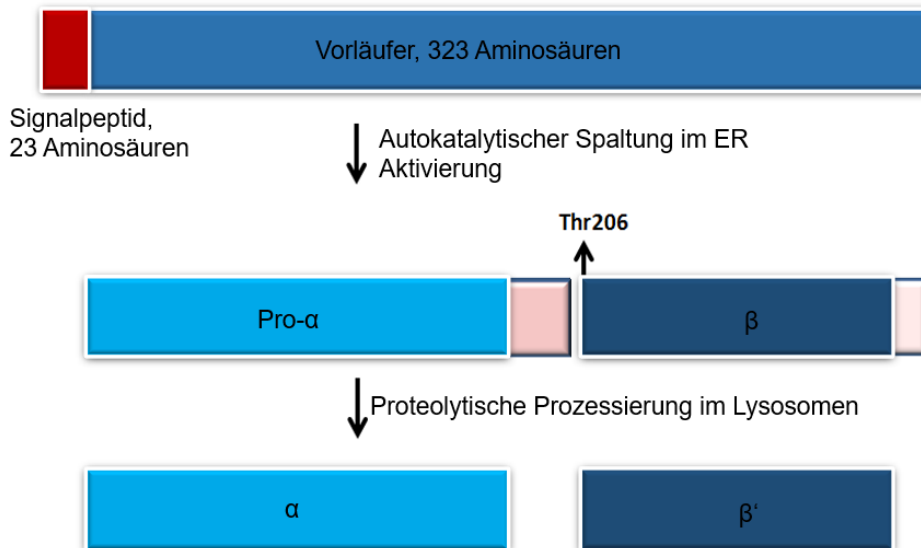
#### 1.4.2 Prozessierung und Proteinstruktur

AGA wird, wie alle N-terminalen nukleophilen Hydrolasen, zunächst als Vorläuferprotein synthetisiert und anschließend autoproteolytisch prozessiert und aktiviert. Nach Abspaltung des Signalpeptids wird der Vorläufer an zwei Asparaginresten N-glykosyliert (Tikkanen et al. 1995). Das Vorläuferprotein dimerisiert nach der Synthese noch während der Faltung im endoplasmatischen Retikulum. Es folgt die autoproteolytische Spaltung der Vorläuferpeptide zwischen Asp205 und Thr206, welches eine entscheidende katalysierende Rolle in der Spaltung spielt (Riikonen et al. 1996). Durch diese Spaltung der Vorläuferpeptide wird das Enzym aktiviert. Die Reorganisation der AGA-Untereinheiten ergibt eine heterotetramere  $\alpha\beta\alpha$ -Sandwichstruktur. (Tikkanen et al. 1996a; Ikonen et al. 1993). Die entstandene 27 kDa pro- $\alpha$ - und 17 kDa  $\beta$ -Untereinheit werden im sauren Kompartiment am C-terminalen Ende weiter prozessiert. Dabei entsteht die  $\alpha$ -Untereinheit mit einer Masse von 24 kDa, sowie die  $\beta'$ -Untereinheit, die 14 kDa misst (Tikkanen et al. 1996b).

Die finale  $(\alpha\beta)_2$ -Proteinstruktur des aktiven AGAs besitzt eine Größe von  $50 \times 50 \times 70 \text{ \AA}$  (Oinonen et al. 1995). Der Kern dieser Domäne bildet ein vorwiegend antiparallel organisiertes acht-strängiges  $\beta$ -Faltblatt, welches zwischen  $\alpha$ -Helices liegt. AGA besitzt 9 Cysteinreste, welche 4 Disulfidbrücken bilden, die sich alle innerhalb der jeweiligen Untereinheiten befinden. Der enge Zusammenhalt zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit

wird also nicht durch die Disulfidbrücken, sondern durch eine Vielzahl an Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen gesichert (Oinonen et al. 1995).

Wie oben beschrieben, entfaltet AGA seine katalytische Wirkung durch ein Threonin (Thr206), welches den N-terminalen Rest der  $\beta'$ -Untereinheit bildet. Dieses ist tief in der trichterförmigen Tasche des aktiven Zentrums lokalisiert, welches durch Seitenketten beider Untereinheiten gebildet wird (Oinonen et al. 1995). Das heterotetramere AGA enthält zwei aktive Zentren, eins in jedem  $\alpha$ - $\beta$ -Dimer (Oinonen et al. 1995). Eine korrekte Faltung des Proteins ist für die Entstehung des aktiven Zentrums notwendig und somit für die Ausführung der Funktion essentiell (Saarela et al. 1998).



**Abbildung 3: Proteolytische Spaltung des Vorläufers in die Untereinheiten, modifiziert nach Banning et al. 2018.** AGA wird im ER als Vorläufer synthetisiert, welcher aus 346 Aminosäuren besteht. Nach Abspaltung des 23 Aminosäuren umfassenden Signalpeptids erfolgt die autokatalytische Spaltung in eine 27 kDa pro- $\alpha$ - und eine 17 kDa  $\beta$ -Untereinheit. Das Threonin an der 206. Aminosäurestelle, welches sowohl für die autokatalytische Spaltung als auch für die enzymatische Funktion von zentraler Rolle ist, befindet sich N-terminal an der  $\beta$ -Untereinheit. Die weitere proteolytische Prozessierung findet in den Lysosomen statt, bei der die finale  $\alpha$ -Untereinheit (24 kDa) und eine  $\beta'$ -Untereinheit (14 kDa) entstehen.

### 1.4.3 Molekularbiologie

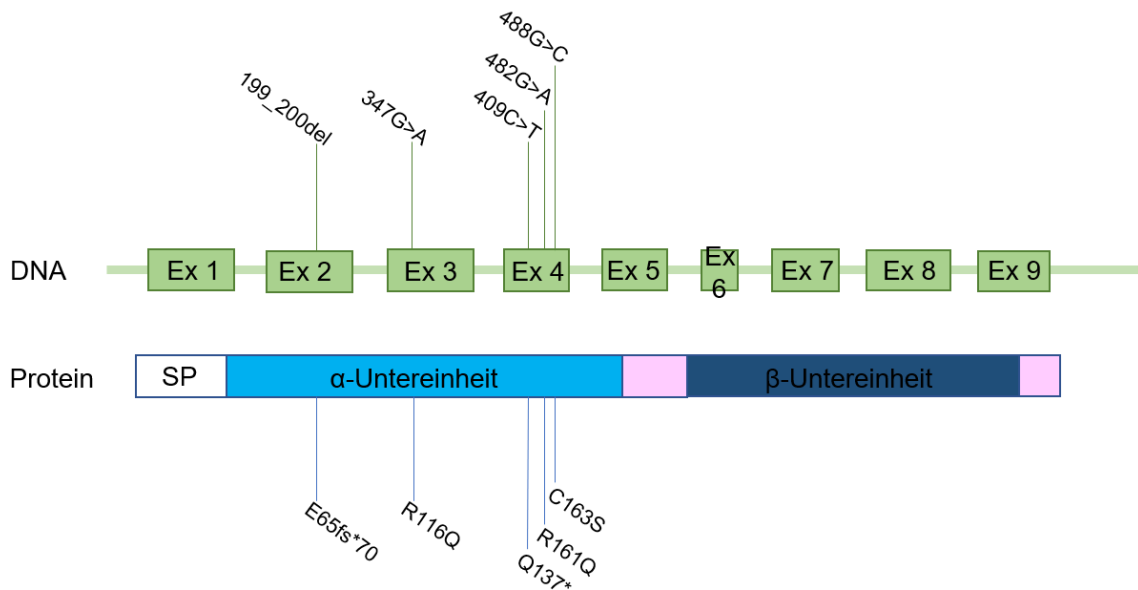
Die Gensequenz, welche für AGA kodiert, befindet sich in der Chromosomen-Region 4q32-33 (Grön et al. 1990; Park et al. 1991). Sie ist eine evolutionär hoch konservierte Genregion (Liu et al. 1996). Das Gen erstreckt sich über 13 Kilobasen und besteht aus 9 Exons. Sowohl die 5'- als auch die 3'-untranslatierten Regionen des Gens werden nicht durch Introns unterbrochen (Park et al. 1991). Die 5'-Promotorregion ähnelt der anderer lysosomaler Hydrolasen. Sie besitzt eine GC-reiche Insel, welche für Haushaltsgene typisch ist (Uusitalo et al. 1997). Exon 5 kodiert die posttranslationale Spaltstelle für die Bildung der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten sowie Thr206 des aktiven Zentrums (Park et al. 1991). Das offene Leseraster umfasst 1041 Basenpaare, welche in der Translation in eine Kette mit 346 Aminosäuren übersetzt wird. Die N-terminalen 23 Aminosäuren bilden das Signalpeptid, so dass der Vorläufer 323 Aminosäuren umfasst und eine Masse von 42 kDa besitzt (Aronson 1999).

### 1.4.4 Bekannte krankheitsauslösende AGA-Varianten

Es sind mehr als 30 krankheitsverursachende Varianten des AGA-Gens bekannt und im Human Gene Mutation Database zusammengefasst. Bei circa 50% handelt es sich um *Missense*-Varianten, daneben kommt es zu *Nonsense*-, oder *Splicing*-Varianten. Eine klare Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp wurde bisher noch nicht beschrieben (Stenson et al. 2014).

**AGU<sub>Fin-major</sub>:** Die AGU<sub>Fin-major</sub>-Variante ist zu 98% verantwortlich für die AGU Fälle in Finnland (Syvanen et al. 1992). Es handelt sich um zwei Punktmutationen: Zum einen wird an der 161 Aminosäurestelle ein Arginin in ein Glutamin umgewandelt (R161Q), zum anderen ersetzt ein Serin an der 163. Stelle ein Cystein (C163S). Durch den Verlust des Cysteins kommt es zur Zerstörung einer Disulfidbrücke und zur Konformationsänderung (McCormack et al. 1995). Dies hat zur Folge, dass das Vorläuferprotein nicht in seine Untereinheiten aufgespalten werden kann. Durch diesen Mechanismus führt die Variante zum nahezu vollständigen Verlust der AGA-Proteinfunktion (Fisher und Aronson 1991).

**AGU<sub>Fin-minor</sub>:** Hierbei handelt es sich um eine Deletion von 2 Basenpaaren auf dem 2. Exon. AGU<sub>Fin-minor</sub> ist bei 1,5% der finnischen PatientInnen ursächlich. Es tritt in der Regel in heterozygoten Patienten in Verbindung mit AGU<sub>Fin-major</sub> auf (Isoniemi et al. 1995).



**Abbildung 4: Darstellung der krankheitsauslösenden AGA-Varianten  $AGU_{Fin-Major}$  und  $AGU_{Fin-Minor}$  sowie der in dieser Arbeit untersuchten Varianten  $c.347G>A$ ;  $p.R116Q$  und  $c.409C>T$ ;  $p.Q137^*$ .** Veränderungen der Nukleotide werden oberhalb des gezeichneten DNA-Strangs im jeweiligen Exon, hier abgekürzt mit Ex, dargestellt. Exon 1 umfasst 127 Basenpaare und kodiert das Signalpeptid, hier abgekürzt mit SP, sowie einen Teil der  $\alpha$ -Untereinheit. Das 2. Exon umfasst 154 Basenpaare und trägt die Variante  $AGU_{Fin-Minor}$ . Exon 3 und 4 besitzen je 113 Basenpaare. Die in dieser Arbeit untersuchte Variante  $c.347G>A$  ist im 3. Exon lokalisiert und führt in der Aminosäurekette zur Substitution  $p.R116Q$ . Exon 4 trägt sowohl die Variante  $c.409C>T$ ;  $p.Q137^*$ , welche ebenfalls in dieser Dissertation erforscht wird, sowie  $AGU_{Fin-Major}$ , die aus zwei Substitutionen besteht, die sich in der Aminosäurekette als  $R161Q$  und  $C163S$  äußern. Beide in dieser Arbeit untersuchte Varianten, wie auch der  $AGU_{Fin-Major/Minor}$  betreffen die  $\alpha$ -Untereinheit. Das 5. Exon umfasst 115 Basenpaare und kodiert die posttranslationale Spaltstelle für die Bildung der  $\alpha/\beta$ -Untereinheiten. Das 6. Exon ist mit 76 Basenpaaren das kürzeste Exon, während das 7. Exon 108, das 8. Exon 134 und das 9. Exon 101 Basenpaare umfassen.

### 1.5 Missense-Varianten

Als *Missense*-Variante werden Punktmutationen bezeichnet, die zur Veränderung des Codons der mRNA führen, so dass es zum Einbau einer anderen Aminosäure kommt. Alle Basen einer mRNA können von einer solchen Punktmutation betroffen sein. Die Folgen der Substitution sind abhängig von der Funktion und der Position der jeweiligen Aminosäure. Ist das aktive Zentrum betroffen oder kann sich das Protein nicht mehr richtig falten kann es zum vollständigen Verlust der Proteinfunktion kommen. Ähnelt die neu eingesetzte Aminosäure in ihren molekularen Eigenschaften der ursprünglichen

Aminosäure, kann die Proteinfunktion teilweise erhalten bleiben. Die Mehrheit der krankheitsauslösenden Varianten von Erberkrankungen im Allgemeinen wird durch *Missense*-Varianten verursacht. Im Bereich der AGU ist der Anteil von *Missense*-Varianten im Vergleich zu *Nonsense*- oder *Splicing*-Varianten noch höher (Banning et al. 2018).

## 1.6 *Nonsense*-Varianten

*Nonsense*-Variante bezeichnen jene Veränderungen eines Gens, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation durch eine Punktmutation führen, die ein beliebiges Triplet in ein Stopcodon umwandelt (Chang et al. 2007). Als Produkt entsteht in der Transkription eine meist instabile mRNA, die durch den *Nonsense*-vermittelten mRNA-Abbau (NMD) abgebaut wird, sowie in der Translation eine verkürzte Aminosäurekette. *Nonsense*-Varianten stellen die Ursache für viele genetische Erkrankungen, wie auch maligne Tumore dar. Bei mindestens 2400 Erkrankungen wurde eine *Nonsense*-Variante als Ursache bereits identifiziert (Peltz et al. 2013). Durch die Fortschritte der Genomsequenzierung wurde festgestellt, dass etwa 11% der vererbten genetischen Störungen durch in-frame *Nonsense*-Varianten verursacht werden (Mort et al. 2008). Im Bereich der AGU ist der Anteil der *Nonsense*-Varianten deutlich niedriger (Saarela 2001; Banning et al. 2018).

### 1.6.1 Relevante Aspekte der Translation

Die Translation beschreibt die Synthese einer Aminosäurekette durch das Ablesen der mRNA an Ribosomen. Sie lässt sich in drei wesentliche Phasen unterteilen: Initiation, Elongation und Termination. 61 Triplets codieren für 21 proteinogene Aminosäuren. Der aktivierte eukaryotische Initiationsfaktor 2 (eIF-2) bindet als erster Initiationsfaktor die mit Methionin beladene Start-tRNA und bildet zusammen mit Guanosintriphosphat (GTP) und der kleinen ribosomalen Untereinheit den 43S-Präinitiationskomplex. Die 5'-Kappe der mRNA wird von eIF-4 gebunden und lagert sich an den 43S-Präinitiationskomplex, so dass der 48S-Präinitiationskomplex entsteht. Der Startpunkt auf der mRNA ist durch das Triplet AUG gekennzeichnet, welches durch die Start-tRNA erkannt wird. Durch GTP-Hydrolyse wird eIF-2 freigesetzt. Der fertige Initiationskomplex entsteht nun durch Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit zum 80S-Ribosomen und die Elongation beginnt. An der P-Stelle des Ribosoms befindet sich die wachsende Aminosäurekette, während an der A-Stelle das Triplet decodiert und die neue Aminosäure angehängt wird. Die tRNA tritt als ternärer Komplex mit dem Elongationsfaktor 1A (eEF-1A) sowie GTP an die A-Stelle. Dieser Prozess wird durch

zwei getrennte Kontrollverfahren überprüft, die Konformationsänderungen bewirken und durch die irreversible Hydrolyse von GTP durch eEF-1A separiert werden (Nagel-Wolfrum et al. 2016). Die Beendigung der Translation wird durch eines von drei Stopcodons eingeleitet. Erreicht UAA, UGA oder UAG die A-Stelle des Ribosoms, so wird die Translation beendet (Bidou et al. 2012). Der eukaryotische release factor 1 (eRF-1) erkennt und bindet an Stelle der tRNA das Stopcodon, und es kommt in Abhängigkeit von eRF3 zur Abspaltung der Aminosäurekette durch ein Wassermolekül von der tRNA, welche an der P-Stelle mit der Aminosäurekette verbunden war (Keeling et al. 2014).

### 1.6.2 Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau (NMD)

Der *Nonsense*-vermittelte mRNA-Abbau (NMD) ist ein Kontrollmechanismus der mRNA, der in Eukaryoten nachgewiesen wurde. Das Qualitätskontrollsystem verhindert, dass eine mRNA, die ein vorzeitiges Stopcodon enthält, translatiert wird und C-terminal verkürzte, fehlerhafte Proteine entstehen, die für die Zelle potenziell schädlich sind (Frischmeyer und Dietz 1999). Der Kontrollmechanismus besteht aus drei Hauptfaktoren: UPF1 (*up-frameshift protein 1*), UPF2, UPF3 (Kurosaki und Maquat 2016; Leeds et al. 1991). UPF1 ist eine ATP-abhängige RNA-Helikase, welche durch den Translations-Terminationskomplex mit der mRNA assoziiert. Durch die Helikase-Aktivität kann der Überwachungskomplex mit dem Terminationskomplex interagieren und die mRNA überprüfen. Getriggert wird der NMD in den meisten Fällen durch den *Exon-Junction Complexes* (EJC). EJC ist ein Proteinkomplex, der beim Splicing der prä-mRNA 20-24 Nukleotide vor einer Exon-Exon-Verbindung die mRNA bindet. Bei der ersten Translation löst sich der EJC von der mRNA ab. Befindet sich ein vorzeitiges Stopcodon mehr als 50 Nukleotide vor einem EJC, bleibt der EJC mit der mRNA verbunden und triggert durch Rekrutierung von UPF3 den NMD (Bidou et al. 2012). Es kommt zu einer Konformationsänderung der mRNA, welche zur Entfernung der Cap-Struktur, zum Abbau des Poly-A-Schwanzes und zum 5'→3'-Abbau der mRNA durch Exonukleasen führt (Kurosaki und Maquat 2016; Frischmeyer und Dietz 1999; Ruiz-Echevarría et al. 1998). Befindet sich ein vorzeitiges Stopcodon im letzten Exon, so dass auf dieses keine weitere Exon-Exon-Verbindung folgt, so kann der NMD über die lange Distanz zwischen Stopcodon und dem Poly-A-Schwanz bindenden PABPC1 aktiviert werden. Allerdings ist eine Aktivierung des NMDs in dieser Situation deutlich unwahrscheinlicher (Kurosaki und Maquat 2016; Hurt et al. 2013).

Reguliert wird der NMD über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von UPF1. Die Phosphorylierung erfolgt durch SMG1, welches zur Gruppe der Phosphatidylinositol

Kinase (PIK)-verwandte-Kinase Familie gehört (Wilkinson 2003). SMG1 wird seinerseits durch SMG9 und SMG8 reguliert und kann durch verschiedene Substanzen gehemmt werden (Yamashita et al. 2009; Denning et al. 2001). Die Dephosphorylierung erfolgt durch einen Enzymkomplex, welcher unter anderem aus SMG5 und SMG6 besteht (Chang et al. 2007).

### 1.7 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist zunächst die Charakterisierung der neuentdeckten AGA-Varianten c.409 C>T; p.Q137\* und c.347G>A; p.R116Q. Beide Varianten waren vorher noch nicht in der Literatur beschrieben. Patientenfibroblasten und Überexpression in HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden genutzt, um zu erforschen wie die Varianten auf die Aktivität, Expression und Prozessierung des AGA-Enzyms wirken. Da bei der *Nonsense*-Variante p.Q137\* ein Abbau der mRNA durch den NMD zu erwarten ist, wurde die mRNA ebenfalls untersucht.

In einem zweiten Schritt sollten verschiedene Therapieoptionen in Zellkulturmodellen exploriert werden. Das Ziel für die Variante p.Q137\* ist die Hemmung des NMDs, sowie das Überlesen des *Nonsense*-Codons an den Ribosomen. Die Herausforderung der Variante p.R116Q stellt dagegen die korrekte Faltung und Prozessierung der vollständig translatierten Aminosäurekette dar.

## 2 Material

### 2.1 Material und Geräte

Tabelle 1: Auführung der verwendeten Materialien und Geräte.

<b>Material/Gerät</b>	<b>Hersteller und Niederlassung</b>
6/12 Well-Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg, DE
Biometra-T-personal Thermocycler	Biometra, Göttingen, DE
CFX Connect Real-Time System	BioRad, München, DE
Deckgläschen, 15 mm Durchmesser	Menzel, Braunschweig, DE
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf, DE
Eppendorfgefäß (2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL, 0,2 mL)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Filterpapier	Whatman, Dassel, DE
Konfokales Laser-Scanning-Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss LSM710	Carl Zeiss, Jena, DE
Frischhaltefolie	Papstar, Kall, DE
Glaskolben	Schott-AG, Mainz, DE
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Hitzeblock	Laborgeräte München, München, DE
Inkubationsschrank 37°C	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg, DE
Kryogefäße	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich

Material

Lichtmikroskop Motic AE31	Otto E. Kobe, Marburg, DE
Nitrozellulosemembran	Whatmann, Dassel, DE
Objektträger	Roth, Karlsruhe, DE
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Brampton, Kanada
Pipetten (2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl, 5, 10 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Pipettierhilfe accu jet®	Brand, Wertheim, DE
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße (0,5 ,1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Röntgenfilm	FUJIFILM, Düsseldorf, DE
Schüttler	Edmud Bühler, Bodelshausen, DE
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK
Spannungsquelle (Elektrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, DE
Tecan infinite M 200	Tecan, Crailsheim, DE
Ultraschall Homogenisator (Sonoplus)	Bandelin, Berlin, DE
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen, DE
Waage Toledo PB602- S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
Western-Blotsystem Criterion Blotter	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE

Zell Inkubator 37°C, Brutschrank	Sanyo, Moricuchi, Osaka, Japan
Zellkultur-Flaschen TPP	TPP, Trasdingen, CH
Zellkultur-Platten (10 cm)	TPP, Trasdingen, CH
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Zentrifuge Micro 220 R und Universal 320 R	Hettich, Kirchlengern, DE
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	15 ml von Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE, 50 ml von Falcon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA- USA

## 2.2 Medikamente, Chemikalien, Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Aufführung der zu Therapieversuchen in der Zellkultur verwendeten Medikamente, sowie deren Endkonzentrationen.

<b>Medikament</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller und Niederlassung</b>
Amlexanox	25 µM, 50µM	Cayman, Biomol GmbH, Hamburg, Germany
Ataluren/PTC124	17mM	Carbosynth, Newbury, UK
Betain	10 mM	Roth, Karlsruhe, DE
Koffein	7,5 mM	TCI, Heuchelheim, DE
G418	100 µg/mL	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Gentamicin	250 µg/mL	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
Trehalose	100 mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE

Tabelle 3: Aufführung der verwendeten Lösungen und Chemikalien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller und Niederlassung</b>
3 Aminophtalhydrazide (Luminol)	Honeywell Fluka Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA- USA
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, DE
Agarose	Roth, Karlsruhe, DE
Agar-Pulver	Roth, Karlsruhe, DE
AMC (7-Amino-4-methylcoumarin)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, DE
APS (Ammoniumpersulfat)	Applichem, Darmstadt, DE
Asp-AMC (L-Aspartic acid $\beta$ -(7-amido-4-methylcoumarin))	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Beetle-Juice	PJK GmbH, Kleinbittersdorf, DE
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe DE
Bradford Reagenz	BioRad, München, DE
Bradford Standardreihe	BioRad, München, DE
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, DE
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA, Cölbe, DE
Sybr Green Mix	BioRad, München, DE
Cumarinsäure	Roth, Karlsruhe, DE
CutSmartpuffer	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Digitonin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Roth, Karlsruhe, DE

Material

Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, DE
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe, DE
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DNA-Marker	New England Biolabs, Frankfurt, DE
dNTPs	Roth, Karlsruhe, DE
DTT (Dithiothreitol)	Applichem, Darmstadt, DE
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe, DE
EGTA (pH 8) (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe, DE
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Fötale Kälberserum	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
Glycin	Roth, Karlsruhe, DE
Glycerol	Roth, Karlsruhe, DE
Glycerin	Roth, Karlsruhe, DE
LB broth	Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
Lysis-Juice 2	PJK GmbH, Kleinbittersdorf, DE
Macsfectin	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, DE

Material

Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, DE
Methanol (MeOH)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt, DE
NP-40	Roth, Karlsruhe, DE
Opti-MEM+ GlutaMAX	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA- USA
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
PCR-Puffer 10x	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
PFA (Paraformaldehyd)	Roth, Karlsruhe, DE
Pipes (pH 6,8)	Applichem, Darmstadt, DE
Ponceau S	Applichem, Darmstadt, DE
Proteinaseinhibitor-Coctail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Proteinmarker, Gelelektrophorese	BioRad, München, DE
Puffer für reverse Transkriptase	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Renilla-Juice	PJK GmbH, Kleinbittersdorf, DE
RNasin	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Röntgenentwickler	Calbe Chemie GmbH, Calbe, DE
Röntgenfixierer	Calbe Chemie GmbH, Calbe, DE
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, DE
SDS (Natrium- Dodecylsulfat)	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE

Material

Strep-Tactin	IBA GmbH, Göttingen, DE
TEMED (Tetramethylethyldiamin, 1,2- Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe, DE
Tris	Applichem, Darmstadt, DE
Tris-Base	Applichem, Darmstadt, DE
Trizol	Roth, Karlsruhe, DE
Trockenmilchpulver	Roth, Karlsruhe, DE
Tween	Roth, Karlsruhe, DE
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, DE
Zeocin	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe, DE

Tabelle 4: Aufführung der verwendeten hergestellten Lösungen und Puffer, sowie deren Zusammensetzung.

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Konzentration</b>
Blockierungspuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween 20)  Trockenmilchpulver	  5%
Blocklösung- Fluoreszenzversuche	PBS BSA Digitonin	 1% 0,1%
Blottingpuffer	Glycin  Tris-Base  MeOH	  192 mM  25 mM  10%

Material

---

DMEM ++	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose  Fötales Kälberserum  Penicillin/Streptomycin  (Penicillin 10 000 U/mL + Streptomycin 10 000 µg/mL)	  10%  1%
ECL (verstärkte Chemilumineszenz Lösung)	Tris HCl pH 8,5  Luminol (3-Aminophthalhydrazide)  Cumarinsäure	100 mM  1,25 mM  0,2 mM
Fixierungspuffer	Pipes (pH 6,8)  MgCl <sub>2</sub>  EGTA (pH 8)  PFA	80 mM  2 mM  5 mM  4%
Glycerol-Stock-Puffer	Glycerol  MgSO <sub>4</sub>  Tris-HCl (pH 8)	65%  0,1 M  25 mM
Immunfluoreszenz Stripping Lösung (pH 2,9)	NaCl  Essigsäure	300 mM  200 mM
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	Glycin  Tris-Base  SDS	192 mM  25 mM  0,1%
LB (Luria/Miller) Agar	Agar- Pulver	15 g

Material

	LB Medium	1 L
LB (Luria/Miller) Medium	LB broth	20 g
	dd H <sub>2</sub> O	1 L
McIlvain's Phosphat Citrat Puffer, pH (4,5)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M	18,2 mL
	Zitronensäure 1 M	5,5 mL
	H <sub>2</sub> O	76,4 mL
McIlvain's Phosphat Citrat Puffer, pH (6,5)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M	28,4 mL
	Zitronensäure 1 M	2,9 mL
	H <sub>2</sub> O	68,7 mL
PBS (Phosphat- gepufferte Salzlösung)	NaCl	150 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
Ponceau-Färbelösung	Ponceau S	1%
	Essigsäure	5%
Proteinladepuffer 4x	Tris HCl (pH 6,8)	50 mM
	SDS	2%
	Glycerin	10%
	Bromphenolblau	0,10%
	DTT	10 mM
	β-Mercaptoethanol	20%
SDS Polyacrylamidgel Sammelgel (4%)	Tris (pH 6,8)	4,2%
	SDS	0,1%

Material

Trenngel (10%/ 15%)	Acrylamid	4%
	TEMED	0,1%
	APS	0,5%
	Tris (pH 8,0)	12,5%
	SDS	0,1%
	Acrylamid	10%/ 15%
	TEMED	0,1%
Lysepuffer	APS	0,5%
	Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
	NaCl	0,15 M
	EDTA	2 mM
TBST (Tris buffered saline+ Tween 20)	NP-40	1%
	Tris-HCl (pH 7,4)	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween	0,05%
TE (Tris buffered EDTA)	Tris	10 mM
	EDTA	0,1 mM

2.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung Western Blot</b>	<b>Verdünnung Immunfluoreszenz</b>	<b>Hersteller und Niederlassung</b>
AGA Antikörper	Kaninchen	1:5000	1:150 in Blocklösung	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ritva Tikkanen
AGA Antikörper, Santa Cruz	Maus	1:1000	/	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
GADPDH	Maus	1:10 000	/	Abcam via Biozol, Eching, DE
LAMP 3	Maus	/	1:150 in Blocklösung	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Firefly- Luciferase Antikörper	Maus	1:500	/	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Strep-Tag Antikörper	Maus	1:2000	/	Novagen, Darmstadt, DE

Tabelle 6: Aufführung der verwendeten Sekundärantikörper.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung Western Blot</b>	<b>Verdünnung Immunfluoreszenz</b>	<b>Hersteller und Niederlassung</b>
Alexa488, Anti-Maus	Esel	/	1:300 in Blocklösung	Alexa, Thermo Fisher scientific, Schwerte, DE
Cy3, Anti- Kaninchen	Esel	/	1:300 in Blocklösung	Dianova, Hamburg, DE
HRP, Anti- Maus	Esel	1:10000	/	Dako, Hamburg, DE
HRP, Anti- Kaninchen	Esel	1:10000	/	Dako, Hamburg, DE

Tabelle 7: Aufführung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
DAPI (4,6-Diamidin-2- phenylindoldihydrochlorid)	1:1000	Merck, Darmstadt, DE
Lysotracker	1:40 000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.4 Primer

Tabelle 8: Aufführung der zur Mutagenese verwendeten Primer, sowie deren Sequenzen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' zu 3')</b>
AGA Q137* forward	GTCAGCCACCACATTTGCTTAAAGTATGGGGTTTAT CAATG
AGA Q137* reverse	GTCAGCCACCACATTTGCTTAAAGTATGGGGTTTAT CAATG

Tabelle 98: Aufführung der zur qPCR verwendeten Primer, deren Sequenz, Lokalisation, sowie der Produktgröße in Basenpaaren.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' zu 3')</b>	<b>Exon</b>	<b>Produkt (Basenpaare)</b>
AGA forward	ATGGCCGTGTAGGAGACTCACC	7,8	123
reverse	ACAGCTTGGTAGCTTGGCAGGA	8,9	
B2M forward	AGATGAGTATGCCTGCCGTGTG	2	105
reverse	TGCGGCATCTTCAAACCTCCA	3	
Rpl13a forward	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	7	126
reverse	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	8	
Ywhaz forward	AGGTTGCCGCTGGTGATGAC	2	121
reverse	GGCCAGACCCAGTCTGATAGGA	3	

## 2.5 Plasmide

Tabelle 10: Aufführung der verwendeten Plasmide.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Restriktionsenzym</b>
pcDNA 3	Ampicillin/ Neomycin	Invitrogen, Karlsruhe, DE	BamHI, XhoI
pEXPR-IBA103	Ampicillin/ Neomycin	IBA GmbH, Göttingen, DE	XbaI, BamHI
Renilla-Luciferase (PRL-TK)	Ampicillin	Promega, Mannheim, DE	

## 2.6 Enzyme

Tabelle 9: Aufführung der angewandten Enzyme.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller und Niederlassung</b>
BamHI-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
DNase-I-Endonuklease	New England Biolabs, Frankfurt, DE
DpnI-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Pfu-Turbo-Polymerase	Agilent (ehemals Stratagene), Wladbronn, DE
Reverse Transkriptase (M-MuLV) 200 000 U/mL	New England Biolabs, Frankfurt, DE
Trypsin	Invitrogen (Thermo), Karlsruhe, DE
XbaI-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE
XhoI-Restriktionsenzym	New England Biolabs, Frankfurt, DE

## 2.7 Humane Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 10: Auführung der angewandten Zellen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Ursprung, Information</b>	<b>Quelle</b>
E. Coli (Escherichia coli)	XL1-Blue-Stamm zur Vermehrung der Plasmidkonstrukte	Agilent (ehemals Stratagene), Waldbronn, DE
Fibroblasten der Variante AGU <sub>Fin-Major</sub>	Dermale Fibroblasten Katalog-ID: GM00568	Coriell Institute for Medical Research Camden, NJ-USA
Fibroblasten der Variante p.Q137X	Dermale Fibroblasten aus einer Hautbiopsie der an AGU erkrankten Patientin	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ritva Tikkanen
Fibroblasten, Wildtyp	Humane Fibroblasten, immortalisiert	Zur Verfügung gestellt von Dr. Steven Grey, wie beschrieben in (Mussche et al. 2013).
HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney)	Humane, embryonale Nierenzellen	ATTC, Teddington, U.K.

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung der verwendeten Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in Zellkultur-Flaschen mit 5 ml DMEM++ (Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/l Glukose). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde dem Medium 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Der Zusatz von 10% FCS (Fötäles Kälberserum) diente dem Anreichern des Nährmediums mit Wachstumsfaktoren.

##### 3.1.2 Passagierung

Zur Passagierung wurde das Zellmedium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch eine Trypsinlösung vom Boden der Platte gelöst. Die Reaktion der Trypsinpeptidase konnte durch die im FCS enthaltenen Trypsininhibitoren mit 1 mL DMEM++ nach 2 Minuten gestoppt werden. Nach Resuspendierung konnten die Zellen ausgesät werden, etwa 10% der Lösung wurden in einer Erhaltungskultur beibehalten.

##### 3.1.3 Einfrieren von Zellkulturen

Diese Methode wurde verwendet um HEK293T-AGA-KO-Zellen, die stabil mit p.R116Q- bzw. p.Q137\*-Konstrukten transfiziert worden waren, langfristig aufzubewahren. Im ersten Schritt wurden die wegzufrierenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Reaktion wurde mit Medium gestoppt, und die Zellen in 15 mL Gefäße überführt. Um die Zellen vom Medium zu trennen, wurden sie für 5 Minuten bei 1000 RPM zentrifugiert. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen mit FCS+ 10% DMSO resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Das DMSO diente der Vermeidung von Kristallen, die das Wasser beim Einfrieren bilden würde. In dieser Form konnten die Zellen bei -150°C eingefroren und langfristig aufbewahrt werden.

##### 3.1.4 Transfektion

Ziel dieser Methode war es, Plasmiden, welche bestimmte Zielgene enthielten, in eukaryotische Zellen- in diesem Fall HEK293T-AGA-KO-Zellen einzubringen, so dass diese die Zielgene ablesen und das Zielenzym überexprimierten.

Dazu wurden 400 ng DNA in 100 µL Opti-MEM verdünnt und mit Macsfectin-Reagenz (1,6 uL in 100 uL Opti-MEM) vermischt sowie 20 Minuten inkubiert. Das Macsfectin-Reagenz besitzt eine kationische Eigenschaft, wodurch es in der Lage ist, die DNA zu umhüllen, welche durch Phosphatgruppen negativ geladen ist. Im nächsten Schritt wurde die DNA auf die Zellen gegeben. Durch die Lipideigenschaft des Macsfectin-Reagenzes kam es zu lipophilen Wechselwirkungen zwischen dem Reagenz und der ebenso lipophilen Lipiddoppelschicht der Zelle und zur Fusionierung, so dass die Plasmid-DNA in das Zellinnere gelangte.

Zur Vorbereitung mussten die Zellen am Tag vor der Transfektion auf einer 12-Well-Platte ausgesät werden, vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die transient transfizierten Zellen konnten am nächsten Tag behandelt und auf 6-Well-Platten überführt, sowie drei Tage später geerntet werden.

### 3.1.5 Stabile Transfektion

Ziel dieser Methode war es, Plasmide, welche die Mutation c.409 C>T; p.Q137\* bzw. c.347G>A; p.R116Q besitzen, stabil in HEK-293T-AGA-Ko zu transfizieren. Die Transfektion folgte wie oben beschrieben, allerdings wurde zusätzlich 40 ng DNA eines Plasmids mit Zeocin (pTert) Resistenz ko-transfiziert. Da die Zellen im Folgenden mit 0,001 mg/mL Zeocin auf einer Platte (r=5 cm) kultiviert wurden, erfolgte eine positive Selektion, bei der die Zellen, welche die DNA nur transient aufgenommen hatten, abstarben. Die Zellen, welche die Resistenz und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die DNA mit der gewünschten Variante stabil durch homologe Rekombination in ihr Genom aufnehmen konnten, überlebten. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, und die toten Zellen wurden entfernt, bis sich vereinzelt Kolonien überlebender Zellen gebildet hatten.

### 3.1.6 Immunfluoreszenz

#### 3.1.6.1 Lysotracker

Um die Fibroblasten später unter einem Lasermikroskop beurteilen zu können, wurden sie auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag behandelt. Bei einer Konfluenz von etwa 80% erfolgte in einem ersten Schritt eine 30-minütige Inkubation in 0,5 mL Medium mit 5 µM Lysotracker pro Well. Lysotracker besteht aus einem Fluorophor, welches mit einer schwachen Base verknüpft ist und bei neutralem pH-Wert nur teilweise protoniert wird, so dass es Zellmembranen durchdringen kann und spezifisch die sauren

Lysosomen markiert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen, und es folgte die Fixierung. Diese konnte durch Paraformaldehyd (4% PFA) erreicht werden, welches 10 Minuten in den Wells inkubierte. Ferner wurde 3x mit PBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurden die Deckgläschen aus den Wells genommen, in H<sub>2</sub>O vorsichtig gewaschen, abgetrocknet und auf Objektträger gelegt, auf die zuvor ein kleiner Tropfen Roti-Mount Fluor Care mit DAPI appliziert worden war. Der Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid) bildet Komplexe mit der doppelsträngigen DNA, so dass die Zellkerne gefärbt wurden.

### 3.1.6.2 Immunfluoreszenzfärbung

Auch für die Immunfluoreszenzfärbung mittels Antikörper müssen die Zellen auf den Deckgläschen vorher fixiert werden. Dies erfolgte im ersten Schritt mit 4% PFA wie oben beschrieben. Alsdann wurden die Deckgläschen in einer mit Parafilm ausgelegten Glasschale auf einen Tropfen Blocklösung gelegt und mindestens 10 Minuten inkubiert. Die Blocklösung wurde aus PBS mit 1% BSA, sowie 0,1% Digitonin angesetzt. Das Rinderserumalbumin (BSA) sättigt unspezifische Proteinbindungsstellen ab und verhindert so unspezifische Bindungen der Antikörper, während das Digitonin die Zellmembran permeabilisiert. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit dem Primäantikörper. Dieser wurde zuvor in der entsprechenden Konzentration in Blocklösung angesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS inkubierte der Sekundäantikörper wieder um eine Stunde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS konnten die Deckgläschen wie oben beschrieben eingedeckelt werden.

## 3.2 Molekulargenetische Methoden

Plasmide, welche die AGU-Varianten p.Q137\* und p.R116Q beinhalteten, wurden von der AG Tikkanen zur Verfügung gestellt. Neben pcDNA3-Vektoren kamen pEXPR-IBA103-Plasmide zur Verwendung. Diese enthalten eine zusätzliche Sequenz, welche das Strep-Tag codiert. Bei Strep-Tag handelt es sich um verändertes Streptavidin, welches in dieser Form eine Größe von 28 Aminosäuren bzw. 3 kDa aufweist. Dieses geht eine starke, nichtkovalente Bindung mit Biotin ein, die für die Detektion mit dem Antikörper oder mittels Streptactin verwendet werden kann.

Eine Mutagenese musste lediglich in Vorbereitung auf das Luciferaseassay durchgeführt werden und wird in Zusammenhang mit dieser Versuchsreihe thematisiert (Kapitel 3.2.7).

### 3.2.1 Transformation

Ziel dieser Methode war es, die Übertragung von DNA-Plasmiden in kompetente XL-1-blue (E. coli Bakterienzellen), so dass diese die DNA vervielfältigen. Die Transformation erfolgte mit den zur Verfügung gestellten Vektoren DNA-pEXPR-IBA103 und pcDNA3, welche jeweils die Variante p.R116Q bzw. p.Q137\* im AGA-Gen besaßen. Des Weiteren wurde eine Transformation nach der Mutagenese mit pcDNA3-Vektoren durchgeführt, die 3 Klone der AGA-Luciferase-Fusion beinhalteten (Kapitel 3.2.7).

Zu Beginn wurden 10 ng Plasmid-DNA zu 100 µL kompetenten Bakterienzellen gegeben. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien erfolgte bei einer 30-minütigen Inkubation auf Eis und einem zusätzlichen Hitzeschock für 90 Sekunden bei 45°C. Daraufhin wurden die transformierten Zellen eine Minute auf Eis inkubiert, bevor 1 mL LB-Medium hinzugefügt wurde. Dieses enthielt kein Antibiotikum, so dass sich die Bakterienzellen ohne Selektionsdruck während einer 45-minütigen Inkubation vermehren konnten. Schließlich wurden die transformierten Zellen auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert, wo die Bakterien unter Selektionsdruck über Nacht bei 37°C inkubierten.

### 3.2.2 Midi-Präparation

Ziel der Methode war das Vervielfältigen der Plasmid-DNA, die zuvor in XL-1-blue transformiert wurden. Durch die Reproduktion der E. coli kam es zur Vermehrung der Plasmid-DNA. Mittels Zellyse, Waschen und Elution wurde die Plasmid-DNA zugänglich. Anschließend wurde diese in 200 µL TE (Tris buffered EDTA solution) gelöst und stand für die folgenden Versuche bereit. Die genaue Durchführung erfolgte nach dem Benutzermanuskript „NucleoBond Xtra Midi EF“ der Firma Machery-Nage GmbH & Co, Düren, DE.

### 3.2.3 Gewinnung von Zelllysaten

Um eine Aktivitätsmessung oder einen Western Blot durchführen zu können, mussten die Zellen zuvor geerntet werden. Dies erfolgte 2 Tage nach Behandlung der Zellen und wurde auf Eis durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde das Zellmedium entfernt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Lysepuffercocktail, bestehend aus Lysepuffer und Proteinaseinhibitor, auf die Zellen gegeben. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen, inkubierten diese 30 Minuten im Lysepuffercocktail. Um die Ausbeute der langsam wachsenden Fibroblasten zusätzlich zu verbessern, wurden diese anschließend eingefroren und wieder aufgetaut, sowie 6

Sekunden mit Ultraschall behandelt. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 15 000 RPM und 4°C fielen die Zelltrümmer am Boden des Eppendorfgefäßes aus. Der Überstand (das Lysat), welches die Proteine beinhaltet, konnte in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden und stand für weitere Versuche bereit.

### 3.2.4 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford

Um die Proteinkonzentration vieler Lysatproben zu messen, wurde eine Proteinmessung nach Bradford in einer Multiwellplatte durchgeführt. Je 10 µL der verdünnten Lysate wurden in 200 µl 1:5 verdünnter Bradfordlösung pipettiert. Bei einer Wellenlänge von 595 nm erfolgte anschließend die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration am Plattenphotometer.

### 3.2.5 SDS-PAGE und Western Blot

Ziel dieser Methode ist es, Proteine nach der Auftrennung nach Größe auf eine Membran zu übertragen, um sie anschließend mit spezifischen Antikörpern zu detektieren.

#### 3.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Nachdem Lysate hergestellt und die Proteinkonzentrationen (s.o.) bestimmt wurden, wurden Proteinproben mit gleichmäßiger Konzentration geschaffen. Diese bestanden aus Lysat, H<sub>2</sub>O und einem Puffer, der unter anderem Dithiothreitol (DTT) und Natrium-Dodecylsulfat (SDS) enthielt (siehe Tabelle 4). Die Funktion des SDS, sowie des DTT war es, die höheren Proteinstrukturen zu zerstören, so dass sich die Proteine in ihrer linearen Primärstruktur, der Aminosäuresequenz, befanden. So konnten die Proteine in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt werden. Das DTT erreicht dies durch Reduktion der Disulfidbrücken. Dem anionischen Detergens SDS gelingt es durch Auflösung der hydrophoben Wechselwirkungen die Denaturierung der Proteine herbeizuführen. Die Proben wurden anschließend 5 Minuten bei 95°C abgekocht.

#### 3.2.5.2 Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE

Bevor mit der SDS-PAGE begonnen werden konnte, musste das Gel gegossen werden: Die Polyacrylamidkonzentration beträgt für die AGA-Proteinsegmente 15%. Die Vernetzung der Acrylamid- Monomere wird durch Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED herbeigeführt. Das Sammelgel (4%) wurde durch die Kämme, die auch die Taschen für die Proben bilden, vom O<sub>2</sub> der Raumluft geschützt.

Die Proteinproben bildeten SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Eigenladungen der Proteine waren somit überdeckt, so dass die Proteine während der SDS-PAGE durch die anionische Eigenschaft des SDS nur noch nach ihrer Molekülmasse zur Anode wanderten. Die SDS-PAGE lief mit 15 mA pro Gel während des Sammelgels (4%) und mit 20 mA während des Trenngels (15%).

#### 3.2.5.3 Transfer und Blotting

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte im Nassblot, dessen Aufbau dem Sandwichprinzip entspricht. Auf die Nitrozellulosemembran wurde das Gel gelegt, welches zu diesem Zeitpunkt die Proteine enthielt. Darüber und darunter befanden sich Filterpapiere, welche sich wiederum zwischen zwei Schwämmen befanden, welche zwischen zwei Plastikgittern eingeklemmt wurden. Das fertige „Sandwich“ wurde senkrecht in die Blotbox gesteckt, welche mit Blotpuffer befüllt wurde. Das Blotting erfolgte bei 400 mA für 90 Minuten.

#### 3.2.5.4 Proteindetektion

Nach dem Western Blot befanden sich die Proteine auf einer Nitrozellulosemembran. Um dies zu überprüfen, wurde direkt nach dem Blot eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Die rote Farbe lagerte sich an die Proteine und machte sie sichtbar. Die Färbung wurde anschließend gewaschen und hatte keine Auswirkung auf die Proteindetektion mit Antikörpern.

Als nächster Schritt folgte das Blockieren der unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran. Dies war nötig, da an die Membran nicht nur die gewünschten Proteine aus dem Gel binden, sondern auch andere Proteine. So hätten auch die Nachweisantikörper überall an die Membran gebunden, nicht nur an ihre spezifischen Proteine. Hierzu wurde eine Lösung aus 5% Trockenmilchpulver in TBST verwendet, welche mindestens 30 Minuten auf der Membran verblieb, bevor über Nacht der Erstantikörper inkubierte. Nach circa 16 Stunden folgten drei Waschschriffe à 10 Minuten in TBST bevor es anschließend zur Markierung mittels Spezies-spezifischen Zweitantikörper kam. Diese indirekte Antikörpermarkierung hat unter anderem den Vorteil, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Fc-Teil eines Primärantikörpers binden können, und führt zu einer Verstärkung des Signals.

Am Fc-Teil der Sekundärantikörper befand sich das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP), welches das Substrat in Anwesenheit von  $H_2O_2$  umsetzt. Dies gibt ein Signal (Licht), welches auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wurde.

### 3.2.6 AGA Aktivitätsmessung

Ziel dieser Methode ist es, die Aktivität des Zielenzym AGA zu messen. Dazu wurde das Substrat Asp-AMC (L-Aspartic acid  $\beta$ -(7-amido-4-methylcoumarin)) mit der Konzentration 50  $\mu$ M in McIlvain's Puffer pH 6,5 angesetzt. Anschließend inkubierten je 20  $\mu$ L dieser Lösung mit 10  $\mu$ L Zellysat bei 37°C. Jedes Lysat wurde als Triplikat pipettiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden nach 24 Stunden 200  $\mu$ L McIlvain's pH 4,5 hinzugefügt. Die Fluoreszenz wurde sogleich durch das Plattenphotometer Tecan infinite M 200 bei einer Exzitation von 355 nm und Emission von 460 nm ermittelt. Zuletzt erfolgte die Berechnung der Aktivitäten mit Hilfe einer Standardkurve, ermittelt durch AMC in Konzentrationen zwischen 0 bis 20  $\mu$ M zuzüglich 50  $\mu$ M Asp-AMC in McIlvain's Puffer pH 6,5. Die Aktivität wurde berechnet in  $\mu$ mol umgesetzt Substrat pro g Protein.

Da das verwendete Medikament Amlexanox eine Eigenfluoreszenz bei der Behandlung von HEK293T-AGA-KO-Zellen zeigt, die mit der Amlexanox-Konzentration korreliert, wurde in diesem Fall zusätzlich 10  $\mu$ L Lysat plus 20  $\mu$ L McIlvains pH 6,5 gemessen und bei der Auswertung mit der Aktivität verrechnet. Bei Fibroblasten scheint die Eigenfluoreszenz keine Rolle zu spielen. Dies beruht vermutlich darauf, dass sie weniger Amlexanox aufnehmen und im Vergleich zu den Tumorzellen einen anderen Stoffwechsel aufweisen (Banning et al. 2018).

### 3.2.7 Mutagenese

Ziel dieser Methode war der Einbau der Punktmutationen c.409 C>T; p.Q137\*in ein DNA-Plasmid, welches bereits ein Fusionskonstrukt aus Wildtyp-AGA und Firefly-Luciferase beinhaltet. Das Firefly-Luciferasegen war ohne eigenes Startcodon nach dem AGA-Gen gekoppelt, so dass nur wenn AGA abgelesen wurde, das Luciferasegen transkribiert werden konnte. Das Plasmid, welches das Fusionskonstrukt besaß und als Ausgangskonstrukt für die Mutagenese verwendet wurde, stellte die AG Tikkanen zur Verfügung.

#### 3.2.7.1 PCR

Die Primer (siehe Tabelle 8), welche die gewünschte Variante c.409 C>T; p.Q137\*enthielten, wurden in H<sub>2</sub>O zu einer Gebrauchslösung aufgelöst, so dass sie eine Konzentration vom 10  $\mu$ M erreichten. Der PCR-Ansatz bestand aus: 40,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 100 ng Plasmid-DNA, die mutiert werden soll, 5  $\mu$ L 10x PCR-Puffer, je 1  $\mu$ L Primergebrauchslösung forward/reverse, 0,3  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U Pfu-Turbo-Polymerase.

Das PCR-Programm setzte sich aus einer Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, Annealing bei 60°C für 1 Minute, sowie der Synthese bei 68°C für 12 Minuten zusammen. Es wurden 19 Zyklen durchgeführt.

### 3.2.7.2 DpnI-Verdau

Nach einer Ethanolfällung musste die gereinigte, mutierte DNA von den nicht mutierten Anfangs-Plasmiden getrennt werden. Da nur die Anfangs-Plasmide methyliert waren, konnten sie durch das Restriktionsenzym DpnI verdaut werden. Dazu wurde die Probe (22,5 µL nach Ethanolfällung) mit 2,5 µL 10x CutSmart-Puffer und 20 U DpnI für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 10 Minuten bei 80°C. Anschließend erfolgte die Vervielfältigung mittels Transformation der pcDNA3-Vektoren, die 3 Klone der AGA-Luciferase-Fusion beinhalteten. Zur Kontrolle des Erfolgs wurde eine Sequenzierung durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg, DE vollzogen.

### 3.2.8 Luciferaseassay

Ziel dieser Methode war es festzustellen, ob auf ribosomaler Ebene ein Überlesen des *Nonsense-Codon* der Variante p.Q137\* induzieren werden konnte. 400 ng der Plasmid-DNA, welche in der Mutagenese hergestellt worden war und das Fusionskonstrukt aus p.Q137\*-AGA und Firefly-Luciferase besaß, wurde in HEK-AGA-KO-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurden in die gleichen Zellen 30 ng eines Kontrollplasmids, welches eine Renilla-Luciferase (pRL-TK) codiert, transfiziert. Da die beiden Luciferasen unterschiedliche Substanzen umsetzen (Firefly: Luciferin, Renilla: Coelenterazine (CTZ)), konnte die Renillaluciferase bei der Auswertung als Kontrolle für den Erfolg der Transfektion, der Zellausbeute sowie zur Normalisierung verwendet werden.

Die Zellen wurden am Tag nach der Transfektion behandelt und am folgenden Tag mit Lysis-Juice 2 geerntet, sowie bei -20°C eingefroren. Nach erneutem Auftauen, Vortexen und Zentrifugieren, bei dem sich die Zelltrümmer im Pellet ansammeln, wurden die Lysate in einem neuen Eppendorfgefäß aufgefangen, und die Messung konnte erfolgen. Dazu wurden zu 20 µL Lysat 85 µL Juice, welches das jeweilige Substrat enthält, direkt vor der Chemilumineszenzmessung zugegeben (Firefly: Beetle-Juice, Renilla: Renilla-Juice). Die Luciferasen oxidierten ihre jeweiligen Substrate, wodurch Photonen frei wurden, die bei einer Wellenlänge von 560 nm durch das Tecan infinite M 200 gemessen werden konnten. War jedoch ein *Nonsense-Codon* im AGA-Gen vorhanden, das nicht überlesen wurde und zu einem Abbruch der Translation führte, so war keine Luciferase vorhanden, die das Substrat hätte umsetzen können.

### 3.2.9 RT-qPCR

Ziel dieser Methode ist Aussagen über die Anwesenheit bzw. die relative Menge an AGA-mRNA in den erkrankten Zellen zu treffen. Dazu wurde in der RT-qPCR AGA-cDNA vervielfacht und quantitativ bestimmt.

#### 3.2.9.1 Zellernte

Die Fibroblasten wurden am Tag nach der Aussaat behandelt. Etwa 48 Stunden darauf folgte die Zellernte. Diese wurde nach Absaugen des Mediums und einem Waschschrift mit PBS durch 800 µL Trizol auf jedem Well realisiert. Die durch das Trizol gelösten und zerstörten Zellen wurden anschließend in Eppendorfgefäße überführt und konnten bei -80°C eingefroren werden.

#### 3.2.9.2 RNA Isolierung

Das Phenol, welches als Teil des Trizols in die Proben gelangt ist, muss in einem ersten Schritt entfernt werden. Dazu wurden den Proben nach dem Auftauen 160 µL Chloroform hinzugefügt. Zum Vermischen der Lösungen wurden die Eppendorfgefäße kurz geschüttelt und 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach anschließender Zentrifugation befand sich unten in den Gefäßen eine rote, Phenol-enhaltende Phase, mittig folgte eine weiße Interphase, oben befand sich eine farblose Phase, die die RNA enthielt und im Folgenden in neue Eppendorfgefäße überführt wurde. Es wurden 400 µL Isopropanol zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der erneuten Zentrifugation fiel die RNA nun im Pellet aus. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde durch Zugabe von 800 µL 75% Ethanol und erneuter Zentrifugation gereinigt. Anschließend wurde das RNA-Pellet 15 Minuten an der Raumluft getrocknet und in 25 µL H<sub>2</sub>O wieder gelöst.

#### 3.2.9.3 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau ist nötig, da die isolierte RNA noch nicht frei von DNA ist. Zu der gelösten RNA wurden 19,5 µL H<sub>2</sub>O, 1 U DNase und 5 µL 10x Reaktionspuffer gegeben. Zur Aktivierung der DNase wurden die Proben für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,25 µL 0,2 M EDTA hinzugefügt und die DNase wurde bei 75°C inaktiviert.

#### 3.2.9.4 Konzentrationsbestimmung

Durch das Plattenphotometer wurden die RNA- Konzentrationen der verschiedenen Proben ermittelt. Dazu wurde die Messplatte mit H<sub>2</sub>O zunächst genullt, anschließend wurden 2 µL der jeweiligen Probe auf die Platte pipettiert und die Konzentrationen gemessen. So konnte ein Pipettierschema erstellt werden, um einheitlich 1,2 oder 3 µg RNA in cDNA umzuschreiben. Die höher konzentrierten Proben wurden mit H<sub>2</sub>O verdünnt, so dass alle Proben die gleiche RNA-Konzentration erreichten.

#### 3.2.9.5 Reverse Transkription

Zu 19,5 µL der vorbereiteten Proben gleicher Konzentration wurden 150 fmol Oligonukleotide hinzu pipettiert. Zu Beginn der reversen Transkription wurden die Proben für 4 Minuten auf 72°C erhitzt, so dass bestehende Sekundärstrukturen aufgeschmolzen wurden. Anschließend wurde der Reaktionsmix hinzugegeben. Dieser enthielt pro Probe: 0,3 µM dNTP, 20 U RNAsin, 4,5 µL 10x Puffer für die Reverse Transkriptase, 100 U der Reversen Transkriptase (M-MuLV), sowie 15,5 µL H<sub>2</sub>O, so dass ein Gesamtvolumen von 45 µL entstand. Die Biometra-T-personal inkubierte anschließend die Proben für 2 Stunden bei 37°C. Die Transkriptase wurde bei 94°C für 10 Minuten inaktiviert.

#### 3.2.9.6 Real time PCR

Der PCR-Ansatz bestand aus 0,8 µL der cDNA, die mit 3,8 µL H<sub>2</sub>O verdünnt wurde, sowie je 4 pM forward bzw. reverse Primers des jeweiligen Gens und 5 µL des Sybr Green Mixes. Außer dem Zielgen AGA wurden *B2M*, *Ywhaz*, sowie das ribosomale Gen *Rp13a* als Referenzgene untersucht (Siehe Tabelle 9).

Das Programm, welches das BIORAD CFX Connect Real-Time System durchführte, beinhaltete zunächst eine einmalige Denaturierung bei 95°C für 2 min und anschließend 40 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt für 10 s bei 95°C, einem Annealingschritt für 20 s bei 60°C und einem Syntheseschritt für 20 s bei 72°C.

### 3.3 Ethikvotum

Die Nutzung der Patientenfibroblasten wurde durch die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin genehmigt (AZ 144/21). Die Sorgeberechtigten der Patientin wurden durch die behandelnde Ärztin aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung zu den durchgeführten Untersuchungen.

### 3.4 Statistik

Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Statistische Vergleiche wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten T-Test oder ANOVA auf Signifikanz getestet. Die statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism Software (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

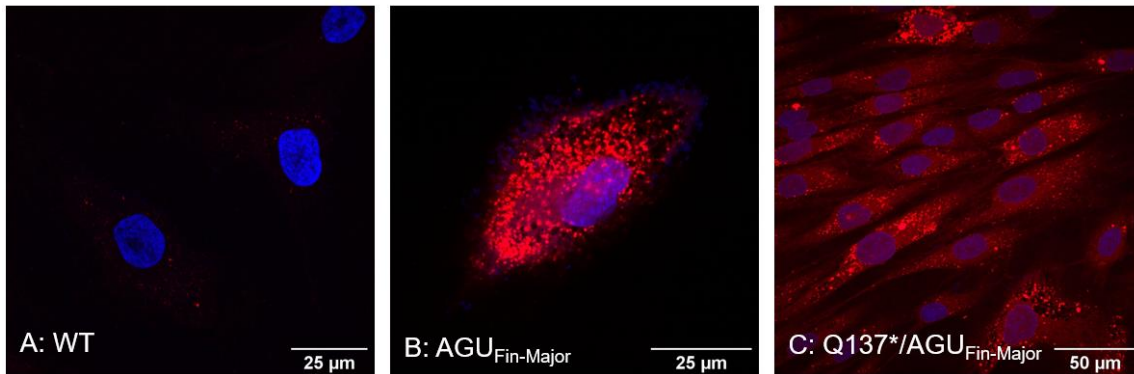
### 4.1 Charakterisierung der Nonsense-Variante p.Q137\*

c.409 C>T; p.Q137\* ist eine Nonsense-Variante der Aspartylglukosaminidase, bei der ein Glutamin an der 137. Stelle der Aminosäuresequenz durch ein vorzeitiges Stopcodon ersetzt wird. Die Variante ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und wurde bei einer heterozygoten Patientin (geb. 2005) in Kombination mit AGU<sub>Fin-Major</sub> entdeckt. Ich habe mich mit der Charakterisierung der Variante in den Punkten Aktivität, Prozessierung und Stabilität der mRNA, sowie der Frage, welche Folgen die Variante auf Patientenfibroblasten hat, befasst. Ziel der Charakterisierung war, Ansatzpunkte für eine mögliche pharmakologische Therapie für Patienten, welche die Variante p.Q137\* tragen, zu identifizieren.

#### 4.1.1 Mikroskopische Anatomie erkrankter p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten

Die Auswirkungen der heterozygoten Variante p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> auf betroffene Zellen wurden anhand von Patientenfibroblasten unter dem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Zum Vergleich wurden Wildtyp- sowie homozygoten AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten herangezogen. Drei Tage nach der Aussaat der Fibroblasten auf Deckgläschen erfolgte die 30-minütige Inkubation mit Lysotracker, welche zu einer Rotmarkierung der Lysosomen führte. Die Zellkerne erscheinen durch den Fluoreszenz-Farbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid) blau (Abbildung 5).

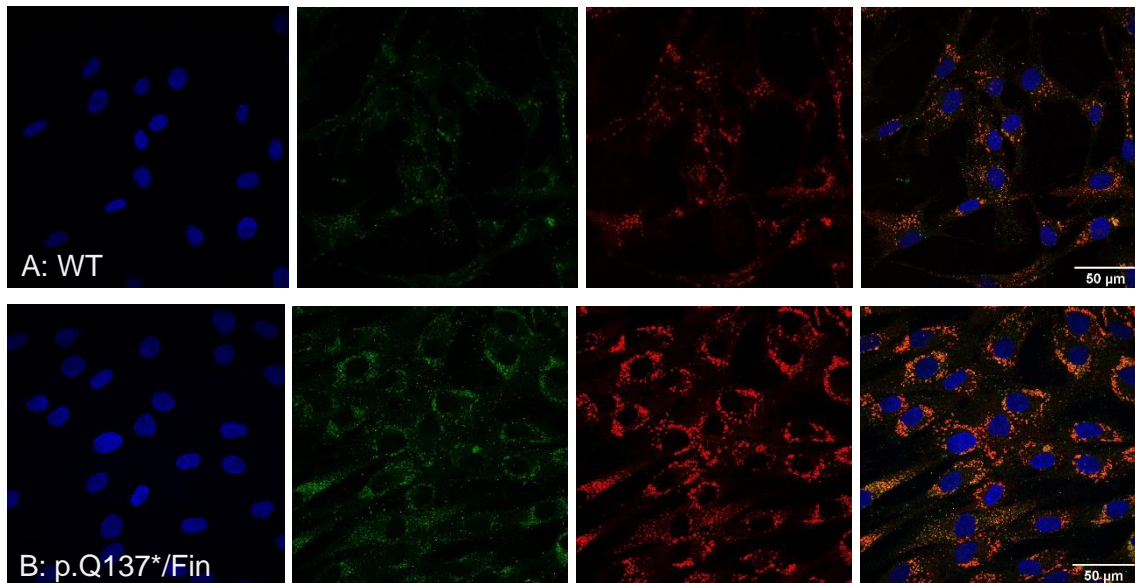
Die in Abbildung 5A dargestellten Wildtyp-Fibroblasten zeigen außer dem blau gefärbten Nukleus vereinzelte, periphere Lysosomen, die nicht akkumulieren und deshalb nur schwer zu erkennen sind. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl die homozygoten AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten als auch die heterozygoten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten (Abbildung 5B bzw. 5C) viele, schwierig abzugrenzende Lysosomen. Diese verteilen sich in der gesamten Zelle und akkumulieren in großen Ansammlungen. Des Weiteren erscheint die Morphologie der Lysosomen verändert. Diese zeigen einen heterogenen Phänotyp mit großer Varianz der Lysosomen-Größe. Durch das morphologisch deutlich veränderte Erscheinungsbild der Lysosomen in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten wird bildhaft die lysosomale Speicherkrankheit visualisiert.



**Abbildung 5: Lysosomale Abnormalitäten in  $AGU_{Fin-Major}$  und  $p.Q137^*/AGU_{Fin-Major}$  Patientenfibroblasten.** Die Kultivierung erfolgte auf Deckgläschen. Die Fibroblasten wurden für 30 Minuten mit Lysotracker inkubiert und mit Paraformaldehyd (4% PFA) fixiert. Rotfärbung ist ein Zeichen für Lysosomen. Zellkerne wurden durch DAPI blau markiert. Teil A zeigt Wildtyp-Fibroblasten (WT), B zeigt homozygote  $AGU_{Fin-Major}$  Fibroblasten, C zeigt  $p.Q137^*/AGU_{Fin-Major}$  Patientenfibroblasten. Die Abbildung entspricht einer repräsentativen Darstellung aus drei Experimenten.

Um weitere Aussagen über die Lokalisation von AGA in der Zelle treffen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen vorgenommen. Die Kultivierung erfolgte für 3 Tage auf Deckgläschen. AGA wurde mit einem anti-AGA-Antikörper aus Kaninchen nachgewiesen (Cy3, rot), während die Lysosomen durch Anti-Lamp3 aus Maus grün (Alexa488) gefärbt wurden.

In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass  $p.Q137^*/AGU_{Fin-Major}$ -AGA in den Lysosomen lokalisiert ist. Dies wird durch die Gelbfärbung verdeutlicht, welche durch das Übereinanderlegen der AGA-Rotfärbung mit der Lysosomen-Grünfärbung entsteht. Es ist festzuhalten, dass die Mehrheit des AGAs, welches in heterozygoten  $p.Q137^*/AGU_{Fin-Major}$  Fibroblasten translatiert wird, die Lysosomen erreicht und nicht in Organellen des frühen sekretorischen Weges, wie dem ER, abgebaut wird.



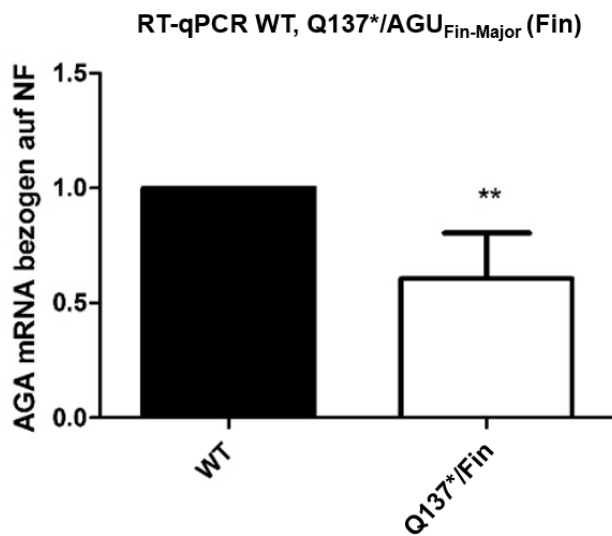
**Abbildung 6: Lysosomale AGA-Lokalisation in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten.** Die Wildtyp (A)- und p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (B) -Fibroblasten wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit Paraformaldehyd (4%PFA) fixiert. Die Nuclei wurden durch DAPI (blau) markiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der Lysoisomen erfolgte durch Anti-Lamp3 (Maus) und Alexa488-Anti-Maus-Antikörper (grün). AGA erscheint durch Anti-AGA (Kaninchen) und Cy3-Anti-Kaninchen-Antikörper rot. Die rechte Reihe zeigt die Färbungen übereinandergelegt. Dies entspricht einer repräsentativen Darstellung aus drei Experimenten.

#### 4.1.2 Relative Menge an AGA-mRNA von p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Patientenfibroblasten

Der *Nonsense*-vermittelte mRNA-Abbau (NMD) erkennt mRNA, die ein *Nonsense*-Codon trägt. Der NMD bewirkt den Abbau dieser mRNA noch bevor es zur Translation an den Ribosomen kommt. Um zu überprüfen, inwieweit die p.Q137\*-mRNA vom NMD betroffen ist, wurden RT-qPCR-Versuche durchgeführt. Die p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Patientenfibroblasten wurden für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA translatiert. Diese wurde vervielfacht und quantitativ bestimmt, um Aussagen über die relative Menge an nicht abgebauter AGA-mRNA in den erkrankten Zellen treffen zu können. Es wurden p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> mit Wildtyp-Fibroblasten (Positivkontrolle) verglichen.

Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigen, dass in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Patientenfibroblasten durchschnittlich 60,7% AGA-mRNA vorhanden ist (Abbildung 7). Die Reduktion der mRNA-Menge ist hochsignifikant ( $p \leq 0,01$ ) bezogen auf den Wildtyp. Zu berücksichtigen ist die Heterozygotie der Patientenzellen: mRNA, welche vom Allel der *Missense*-

Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> stammt, wird nicht von NMD abgebaut und stellt vermutlich den Großteil der AGA-mRNA in den heterozygoten Zellen dar.



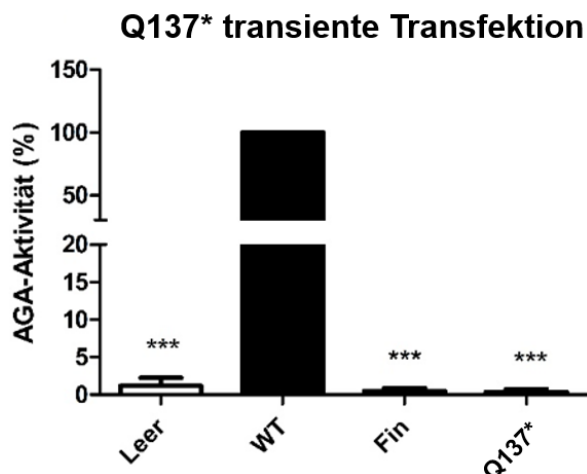
**Abbildung 7: Verminderte relative Menge an AGA-mRNA in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Fibroblasten.** Ernte und Isolierung der RNA der Fibroblasten erfolgten 72 Stunden nach ihrer Aussaat. Die RNA wurde anschließend zu cDNA umgeschrieben, mit welcher die RT-qPCR durchgeführt wurde. Die Graphik zeigt den Mittelwert sowie die Standardabweichung, n=6. Die Analyse erfolgte durch einen ungepaarten, zweiseitigen T-Test. Der Wert mit  $p < 0,01$  ist hochsignifikant (\*\*), gegen Wildtyp (WT).

#### 4.1.3 AGA-Grundaktivität von p.Q137\* in transfizierten Zellen

Im Vorfeld zu diesen Experimenten wurden von der AG Tikkanen AGA-Knock-Out-HEK293T-Zellen durch CRISPR/Cas9- vermittelte Genomveränderungen hergestellt (Kapahnke et al. 2016). Des Weiteren wurden Expressionskonstrukte mit den Varianten p.Q137\* und p.R116Q in pcDNA3- und pEXPR-IBA-103-Vektoren durch Mutagenese produziert. HEK293T-AGA-KO-Zellen und die Expressionskonstrukte wurden von der AG Tikkanen für die Experimente dieser Dissertation zur Verfügung gestellt.

Um einen Eindruck der vorhandenen AGA-Restaktivität der Variante p.Q137\* zu gewinnen, wurden AGA-Aktivitätsassays von zuvor transient transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen erstellt. HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden einen Tag nach der Aussaat mit p.Q137\*-AGA-, Wildtyp-AGA- bzw. Leer-Plasmiden (Positiv- und Negativkontrolle) transfiziert und drei Tage später geerntet und lysiert. Der Wildtyp diente als Positivkontrolle und Referenzwert von 100%. Als Negativkontrolle wurde die Transfektion mit dem pcDNA3-Leervektor durchgeführt. Wie Abbildung 8 zeigt, erreichte

das p.Q137\*-AGA im Mittelwert eine relative Aktivität von 0,4% und ist somit höchst signifikant gegenüber der AGA-Aktivität einer gesunden Zelle eingeschränkt. Ferner wurde die AGA-Aktivität von AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin) beobachtet, die ebenfalls eine höchstsignifikant verminderte relative Aktivität von 0,5% aufwies.



**Abbildung 8: Keine AGA-Restaktivität in AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin)- und p.Q137\*-transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen.** AGA-Knock-out-Zellen wurden 24 Stunden nach ihrer Aussaat mit 400 ng Plasmid-DNA transfiziert und nach weiteren 72 Stunden geerntet. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen bei  $n \geq 4$ . Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Das Ergebnis ist höchst signifikant (\*\*\*)  $p < 0,001$  gegen Wildtyp (WT).

#### 4.1.4 Prozessierung von AGA in p.Q137\* transfizierten Zellen

Im Western Blot wurde überprüft, ob es bei der Variante p.Q137\* zu einer Synthese des Vorläuferproteins sowie einer Prozessierung in die Untereinheiten kommt. Einen Tag nach der Aussaat von HEK293T-AGA-KO-Zellen erfolgte die Transfektion mit p.Q137\*-AGA-, Wildtyp-AGA- bzw. Leer-Plasmiden. Nach drei weiteren Tagen wurden die Zellen geerntet und lysiert.

Der Western Blot, dargestellt in Abbildung 9A, unterstreicht die Abwesenheit von physiologischen AGA. Es sind keine Signale von Proben der p.Q137\* transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen sichtbar. Der Wildtyp (WT) zeigt dagegen das physiologische Muster. In der SDS-Page hat der Vorläufer eine Masse von 42 kDa. Dieser wird zunächst autokatalytisch in die pro- $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten mit 27 bzw. 17 kDa gespalten. In den Lysosomen erfolgt die proteolytische Prozessierung in die  $\alpha$ - und  $\beta'$ -Untereinheiten mit

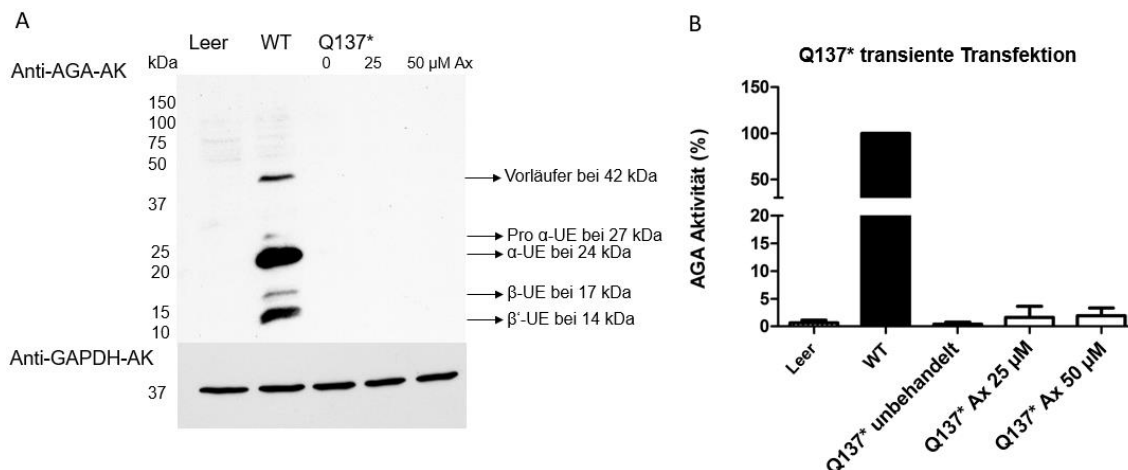
24 bzw. 14 kDa. Die Negativkontrolle (Leer) zeigt keine Signale. Die Detektion des Haushaltsproteins GAPDH, welches für die Glykolyse notwendig ist, wird als Ladekontrolle bei 37 kDa herangezogen.

## 4.2 Behandlung von p.Q137\* transfizierten Zellen

### 4.2.1 Behandlung von p.Q137\* transient transfizierter Zellen

Mit transient transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen wurde eine Versuchsreihe mit dem Pharmakon Amlexanox gestartet. Amlexanox soll ein Überlesen des *Nonsense*-Codons an den Ribosomen induzieren sowie den NMD hemmen, so dass mehr p.Q137\*-AGA-mRNA zur Verfügung steht. Die Behandlung der Zellen mit 25 bzw. 50 µM Amlexanox erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion. Diese Werte stammen aus der Literatur und sind üblicherweise eingesetzte Konzentrationen (Banning et al. 2018). Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet sowie Lysate hergestellt, mit welchen Western Blots sowie AGA-Aktivitätsassays angefertigt wurden. Die Durchführung mit Wildtyp-Plasmid (WT) stellt die Positivkontrolle dar, während HEK293T-AGA-KO-Zellen, welche mit der pcDNA3-Leervektor transfiziert wurden, als Negativkontrolle (Leer) dienen.

Wie Abbildung 9A illustriert, sind in der Probe des Wildtyps der nicht-prozessierte Vorläufer sowie die einzelnen AGA-Untereinheiten (UE) vorhanden. Proben, welche aus p.Q137\* transfizierten Zellen stammen, zeigen keine Signale. Ebenso bewirkte eine Behandlung mit 25 bzw. 50 µM Amlexanox weder eine Produktion des AGA-Vorläufers noch der Untereinheiten. Die Analyse der AGA-Aktivität zeigte eine geringe Erhöhung der Aktivität von 0,4% (unbehandelt) auf 1,6% bzw. 1,9% durch die Behandlung mit 25 bzw. 50 µM Amlexanox. Diese Werte beziehen sich auf die Positivkontrolle (100% Wildtyp) und liegen unter dem Signifikanzniveau.



**Abbildung 9: Keine Synthese oder Prozessierung des AGA-Vorläufers in p.Q137\* transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen im Western Blot, sowie keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität in durch die Behandlung mit Amlexanox.** HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden mit 400 ng Plasmid-DNA vom Wildtyp (WT) und p.Q137\* transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 25 bzw. 50 μM Amlexanox (Ax) für weitere 48 Stunden. A: Der Western Blot zeigt die Expressionsprodukte der Proben. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper. B: Die AGA-Aktivitätsassays zeigen keine signifikante Steigerung der p.Q137\*-AGA-Aktivität durch die Behandlung mit Amlexanox. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=6.

#### 4.2.2 Behandlung von p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> ko-transfizierten Zellen

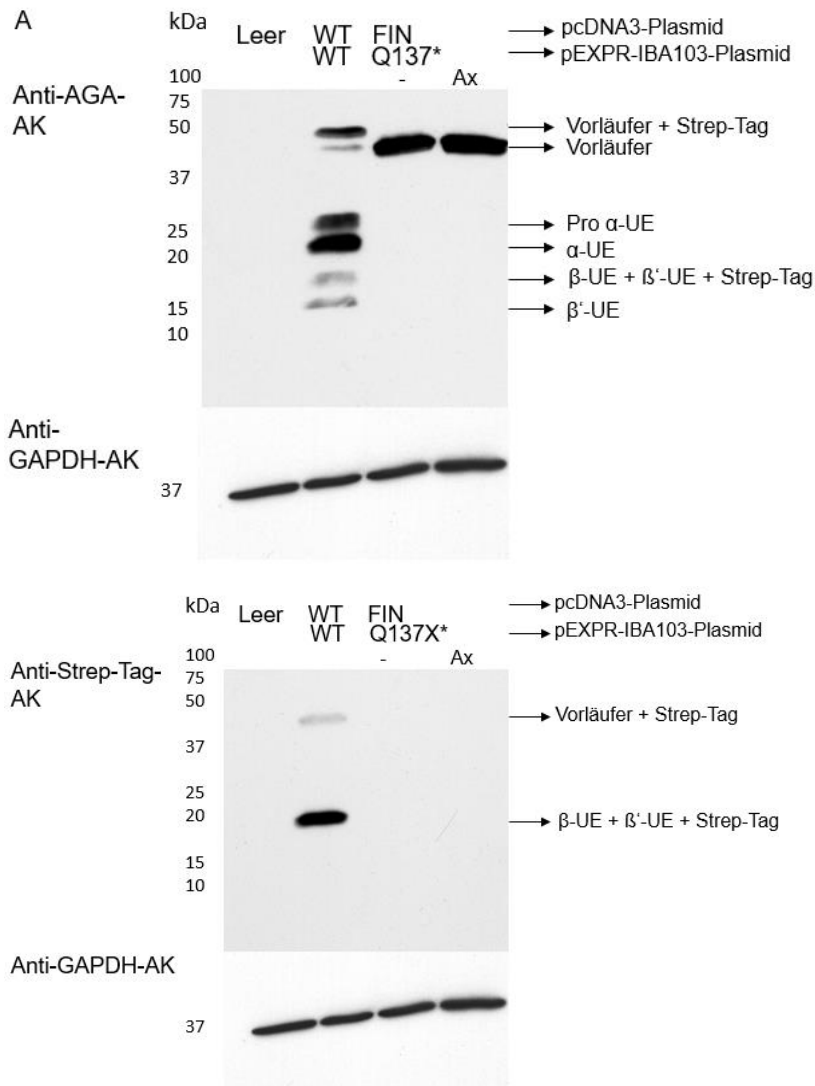
Im Folgenden wurden Doppel-Transfektion mit zwei verschiedenen Expressionsplasmiden vorgenommen, um den Umständen der heterozygoten Patientin näherzukommen und einen möglichen Effekt der unterschiedlichen Varianten aufeinander zu untersuchen. Vorherige Studien zeigten, dass die Anwesenheit von Wildtyp-AGA, durch einen synergistischen Effekt eine Prozessierung der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> induzieren kann (Banning et al. 2016). Durch die Therapie der Variante p.Q137\* mit Amlexanox könnte eine geringe Menge Wildtyp-AGA produziert werden. HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden simultan mit je 200 ng p.Q137\*-Plasmid-DNA sowie AGU<sub>Fin-Major</sub>-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 25 μM Amlexanox. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen lysiert, und AGA-Aktivitätsassays sowie Western Blots hergestellt.

Um im Western Blot nachvollziehen zu können, von welchem Gen ein mögliches Protein stammt, wurde die AGU<sub>Fin-Major</sub> in einem pcDNA3-Plasmid ohne Tag transfiziert, während

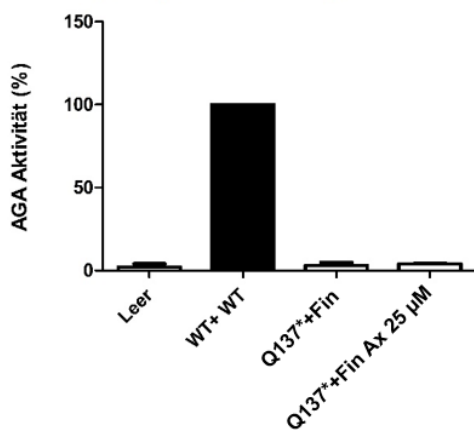
p.Q137\*im pEXPR-IBA103-Plasmid (Twin-Strep-Tag) transfiziert wurde. Durch ribosomale Translation des AGAs im IBA-Plasmid entsteht eine zusätzliche Aminosäurefolge am C-Terminus, das Twin-Strep-Tag. Es befindet sich zunächst am Vorläufer, später an der prozessierten  $\beta$ -Untereinheit. Das Strep-Tag erlaubt eine Detektion mittels Anti-Strep-Tag-Antikörper oder Strep-Tactin und verursacht einen Größenunterschied der AGA-Proteine von etwa 3 kDa. Die Positivkontrolle erfolgte ebenfalls als Ko-Transfektion von Wildtyp-AGA im IBA- sowie im pcDNA3-Vektor.

In Abbildung 10A zeigt der Wildtyp (WT) durch Detektion mittels Anti-AGA-Antikörper den Vorläufer (42 kDa) und die einzelnen AGA-Untereinheiten, sowie den durch den Tag vergrößerten Vorläufer bei 45 kDa. Die Negativkontrolle (Leer) erfolgte durch Transfektion eines leeren Vektors, welcher im Blot keine Signale zeigte. p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (p.Q137\*/Fin) zeigt bei der Detektion ein deutliches Signal auf der Höhe des Vorläufers (42 kDa). Da diese die Größe des Vorläufers ohne Tag aufweist, ist sie auf die Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass der Vorläufer durch Fehlfaltung akkumuliert und dementsprechend als deutliches Signal erscheint. Eine Prozessierung in Form von Signalen der Untereinheiten ist nicht ersichtlich. Ebenso ist durch die Detektion mittels Strep-Tag-Antikörper, im unteren Teil der Abbildung 10A, keine Signale sichtbar, die auf die Variante p.Q137\* zurückzuführen wären. Durch die Behandlung mit Amlexanox ist im Western Blot keine Änderung des Musters festzustellen.

Die Aktivitätsanalyse der unbehandelten doppel-transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen, gezeigt in Abbildung 10B, ergab einen Wert von 3,1% bezogen auf den Wildtyp. Dieser konnte durch die Behandlung mit 25  $\mu$ M Amlexanox nicht signifikant gesteigert werden (3,9%).



**B Ko-Transfektion Q137\*+Fin**



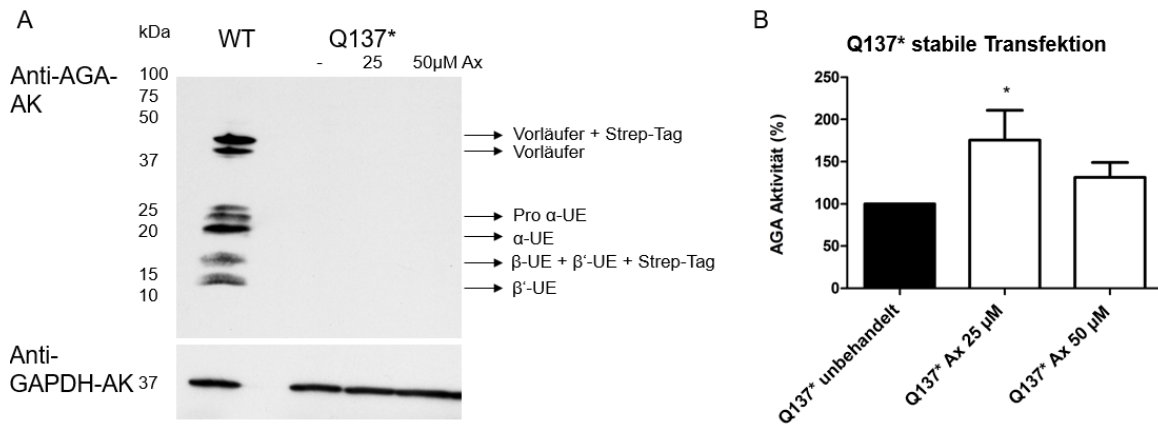
**Abbildung 10: Keine Prozessierung von AGA-Protein oder Steigerung der AGA-Aktivität in p.Q137\*/AGUFin-Major ko-transfizierten Zellen durch die Behandlung mit Amlexanox.** HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden sowohl mit 200 ng pcDNA3-Plasmid als auch pEXPR-IBA-103-Plasmid-DNA ko-transfiziert. Die transiente Ko-Transfektion

erfolgte in den Kombinationen p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin)-, Wildtyp/Wildtyp (WT/WT) -, sowie Leer-Vektoren. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 25 µM Amlexanox für weitere 48 Stunden. A: Der Western Blot zeigt die Expressionsprodukte der Proben. Es ist weder eine Prozessierung des AGU<sub>Fin-Major</sub> Vorläufers noch eine Synthese von AGA-Protein der Variante p.Q137\* durch Amlexanox zu beobachten. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper. Der Strep-Tag-Antikörper detektierte ausschließlich pEXPR-IBA-103-Konstrukte. B: Das AGA-Aktivitätsassay zeigte keine signifikante Steigerung der AGA Aktivität durch die Behandlung mit Amlexanox. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=3.

#### 4.2.3 Behandlung von p.Q137\* stabil transfizierten Zellen

Als nächster Schritt stellte ich mir die Frage, ob bzw. wie weit das Pharmakon Amlexanox, welches bisher zu einer geringen AGA-Aktivitätssteigerung führte, in einem anderen System eine Steigerung der AGA-Aktivität herbeiführen kann. Zur Herstellung der stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden diese mit 400 ng p.Q137\*-AGA-Plasmid-DNA, sowie 40 ng eines Leervektors mit Zeocin-Resistenz transfiziert. Durch die anschließende Behandlung mit Zeocin wurden jene Zellen selektiert, welche die Plasmid-DNA stabil in ihr Genom aufgenommen hatten. Durch die RT-qPCR wurde die stabile Transfektion der Variante p.Q137\*\* in die Zellen nachgewiesen. Die stabil transfizierten Zellen wurden für den Versuch ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 25 bzw. 50 µM Amlexanox für weitere 48 Stunden. Aus den Zelllysaten wurden Western Blots und AGA-Aktivitätsassays durchgeführt. Die Eigenfluoreszenz von Amlexanox wurde ermittelt und aus der Aktivitätsanalyse (vgl. 3.2.6.) herausgerechnet.

Abbildung 11B zeigt, dass Amlexanox im stabilen Zellsystem eine Verbesserung der AGA-Aktivität herbeiführte. Die Aktivität der unbehandelten, stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen wurde auf 100% festgelegt. Die Behandlung mit 25 µM Amlexanox ergab eine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität auf 175,6%. Ebenso führten 50 µM Amlexanox eine AGA-Aktivitätsänderung auf 131,3% herbei. Allerdings scheint der Western Blot nicht sensibel genug, bzw. die Aktivitätssteigerung zu schwach zu sein, um eine Veränderung in Abbildung 11A darzustellen. Trotz Behandlung der p.Q137\* stabil transfizierten Zellen sind weder AGA-Vorläufer noch Untereinheiten zu beobachten.



**Abbildung 11 A: Keine Synthese oder Prozessierung des AGA-Vorläufers in p.Q137\* stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen im Western Blot. B: Steigerung der AGA-Aktivität in p.Q137\* durch die Behandlung mit Amlexanox im Aktivitätsassay.** HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden mit 400 ng pcDNA3-Vektoren, welche die Variante p.Q137\* trugen, stabil transfiziert. Die Behandlung mit 25 bzw. 50 μM Amlexanox erfolgte 24 Stunden nach der Aussaat, für weitere 48 Stunden. A: Im Western Blot wurde zur Veranschaulichung der Wildtyp der transient ko-transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen neben den p.Q137\*-Proben aufgetragen. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper. B: Unbehandelte Proben der Variante p.Q137\*, wurden im Aktivitätsassay auf 100% gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=3. Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Der Wert  $p < 0,05$  ist signifikant (\*) gegen p.Q137\* stabil (unbehandelt).

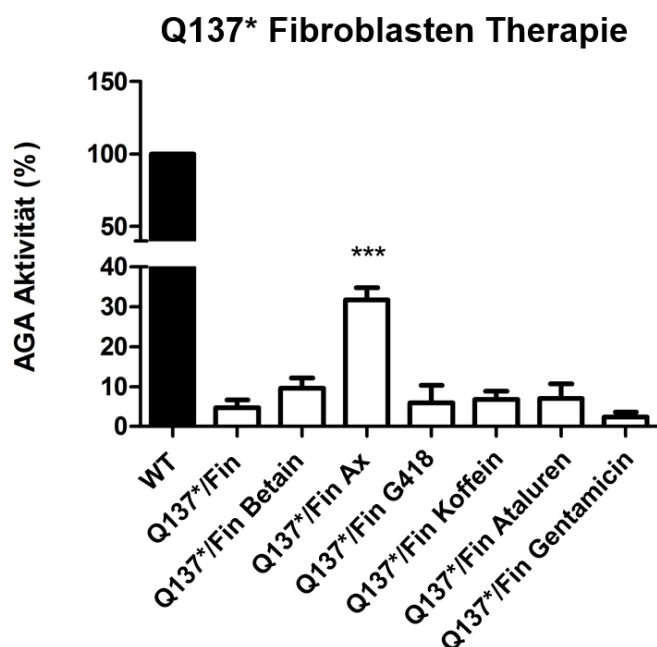
#### 4.3 Behandlung von p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten

Versuche mit dermalen Fibroblasten der heterozygoten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientin wurden mit verschiedenen Pharmaka durchgeführt, die in der Literatur eine Hemmung des NMDs oder ein *Readthrough* von vorzeitigen Stopcodon an den Ribosomen induzieren konnten. Die folgende Versuchsreihe befasst sich mit der Frage, ob und wie dies in den Patientenfibroblasten erreicht werden kann, um die AGA-Aktivität zu steigern. Die Proteinmenge des endogenen AGAs war zu gering, um dieses mittels Western Blot nachzuweisen. Die Fluoreszenz-basierte Aktivitätsmessung durch das Tecan infinite M 200 Plattenphotometer ist allerdings empfindlich genug, um kleinere Mengen AGA präzise zu detektieren.

### 4.3.1 Aktivitätsanalyse

Heterozygote p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten wurde 24 Stunden nach ihrer Aussaat mit 10 mM Betain, 25 µM Amlexanox, 100 µg/mL G418, 7,5 mM Koffein, 17 mM Ataluren PTC124, bzw. 250 µg/mL Gentamicin behandelt. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Zellernte und Lyse. Die AGA-Aktivität von Wildtyp-Fibroblasten diente als Positivkontrolle und Referenzwert von 100% AGA-Aktivität.

Abbildung 12 zeigt den Effekt der verschiedenen Pharmaka auf die heterozygoten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten. Die unbehandelten Patientenfibroblasten der Variante p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> zeigten eine AGA-Restaktivität von 4,8% bezogen auf Wildtyp-Fibroblasten. Diese wurde durch die Behandlung mit Amlexanox auf 31,7% vom Wildtyp höchstsignifikant gesteigert. Die anderen Pharmaka bewirkten keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität. Deskriptiv konnten allerdings zum Teil leichte Verbesserungen beobachtet werden: Durch die Behandlung mit Betain, ein pharmakologisches Chaperon, wurde eine Aktivität von 9,5% beobachtet. Koffein, welches den NMD hemmt, führte zu einer AGA-Aktivität von 6,8%. Durch Ataluren, welches wie die Aminoglykoside einen Readthrough induzieren soll, wurde eine Aktivität von 7,0% beobachtet. Die Aminoglykoside G418 und Gentamicin führten zu einer Veränderung der Aktivität auf 6,0% bzw. 2,4%.



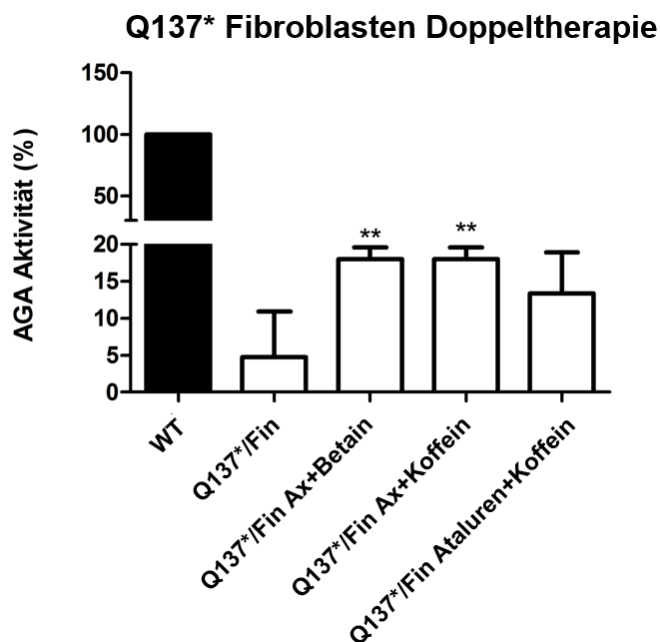
**Abbildung 12: Veränderungen der AGA-Aktivität in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin) Fibroblasten durch verschiedene Pharmaka.** AGA-Aktivitätsassays wurden mit Lysaten von Patientenfibroblasten durchgeführt, welche 24 Stunden nach der Aussaat

mit 10 mM Betain, 25  $\mu$ M Amlexanox (Ax), 100  $\mu$ g/mL G418, 7,5 mM Koffein, bzw. 17  $\mu$ M Ataluren/PTC124, bzw. 250  $\mu$ g/mL Gentamicin behandelt wurden. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Zellernte und Zelllyse. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen,  $n \geq 3$ . Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Der Wert  $p < 0,001$  ist höchstsignifikant (\*\*\*) gegen p.Q137\*/Fin unbehandelt.

Da die getesteten Pharmaka unterschiedliche Ansatzpunkte und molekulare Wirkmechanismen aufweisen, wurde in der nächsten Versuchsreihe eine Kombination von je zwei Pharmaka getestet. Diese erfolgte wiederum durch Aktivitätsassays von vorher behandelten und lysierten Patientenfibroblasten. Versuche mit den Antibiotika Gentamicin und G418 wurden nicht weiterverfolgt, da sie als Langzeittherapie an Patienten auf Grund ihres Nebenwirkungsprofils nicht geeignet sind. Die Kombination Amlexanox und Betain wurde gewählt, da Betain in vorherigen Studien sehr gute Ergebnisse bei der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> zeigte (Banning et al. 2016). Kombiniert wurde das pharmakologische Chaperon mit Amlexanox, welches die besten Ergebnisse als Monotherapeutikum gezeigt hat.

Des Weiteren wurde Koffein mit Amlexanox bzw. Ataluren kombiniert. Koffein wirkt ausschließlich auf die Stabilität der *Nonsense*-mRNA und hat keinen direkten Effekt auf die Translation. Ein möglicher *Readthrough* könnte durch Amlexanox bzw. Ataluren induziert werden und durch die stabilisierte mRNA effektiv in Kraft treten.

Abbildung 13 zeigt, dass alle Kombinations-Behandlungen die AGA-Aktivität im Vergleich zur Aktivität der unbehandelten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten (4,8%) steigerten. Allerdings wurde der Effekt, der durch die Monotherapie mit Amlexanox beobachtet wurde in keiner Kombination übertroffen. Die Behandlung mit Amlexanox und Betain hob die Aktivität auf 18,1% vom Wildtyp signifikant an. Amlexanox in Kombination mit Koffein bewirkte eine hochsignifikante Zunahme der Aktivität auf 27,0%, während die Kombination Ataluren mit Koffein die Aktivität auf 13,7% anhob, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.



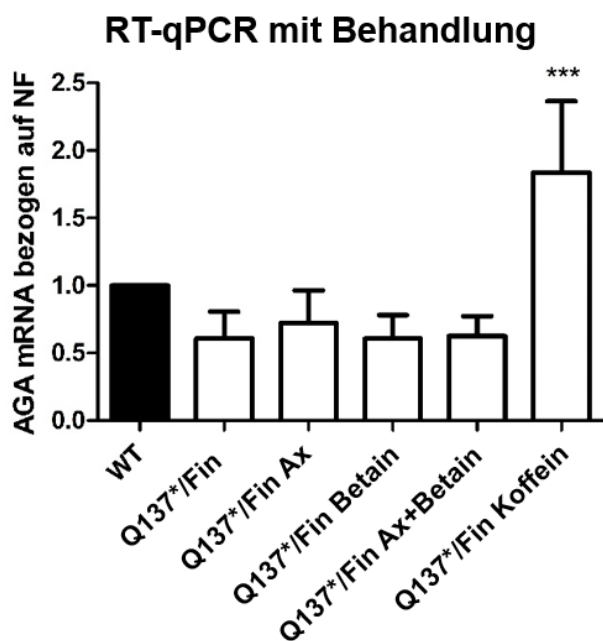
**Abbildung 13: Veränderungen der AGA-Aktivität in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin) Fibroblasten durch Kombinationstherapie mit verschiedenen Pharmaka.** Die AGA-Aktivitätsassays erfolgten mit Lysaten von Patientenfibroblasten, welche 24 Stunden nach der Aussaat mit einer Kombinationstherapie behandelt wurden. 10 mM Betain wurden mit 25 µM Amlexanox (Ax) verabreicht, bzw. 25 µM Amlexanox mit 7,5 mM Koffein, bzw. 17 µM Ataluren mit 7,5 mM Koffein. Ernte und Lyse wurden nach weiteren 48 Stunden durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=3. Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Der Werte  $p < 0,5$  bzw.  $p < 0,001$  sind signifikant (\*) bzw. höchstsignifikant (\*\*\*) gegen p.Q137\*/Fin (unbehandelt).

#### 4.3.2 RT-qPCR-Analyse der relativen AGA mRNA-Menge

Um zu überprüfen ob bzw. wie weit es durch pharmakologische Therapie gelingt, den *Nonsense*-vermittelten Abbau (NMD) zu hemmen und damit die AGA-mRNA-Menge zu steigern, wurden RT-qPCR-Versuche durchgeführt. Es wurden die Medikamente Amlexanox, Betain, Koffein sowie eine Kombination aus Amlexanox und Betain getestet. p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten wurden 24 Stunden nach ihrer Aussaat behandelt, sowie nach weiteren 48 Stunden geerntet. Nach Isolierung der RNA wurde diese zu cDNA reversetranskribiert, mit welcher die RT-qPCR durchgeführt wurde. Wildtyp-Fibroblasten wurden als Positivkontrolle und Referenz von 100% herangezogen.

Durch die Behandlung mit Amlexanox konnte die relative AGA-mRNA-Menge von 60,7% auf 72,2% in Bezug auf den Wildtyp gesteigert werden. Die Steigerung der Gesamt-

AGA-mRNA um 11,5% ist deskriptiv festzuhalten, da sie das Signifikanzniveau nicht erreicht. Zu berücksichtigen ist, dass AGA-mRNA der Missense-Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> nicht vom NMD abgebaut wird und so stabil wie WT-mRNA ist. Vermutlich stammt ein Großteil der AGA-mRNA in den heterozygoten Zellen vom Allel mit der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub>. Nur der Anteil, welcher von der *Nonsense*-Variante p.Q137\* stammt, bietet die Möglichkeit einer Steigerung der mRNA-Menge durch Hemmung des NMDs. Durch die Therapie mit Betain (60,6%) sowie der Kombination aus Betain und Amlexanox (62,6%) ist keine signifikante Steigerung der mRNA zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist durch die Behandlung mit Koffein eine höchst signifikante Steigerung der mRNA-Menge auf 183,4% vom Wildtyp zu beobachten.



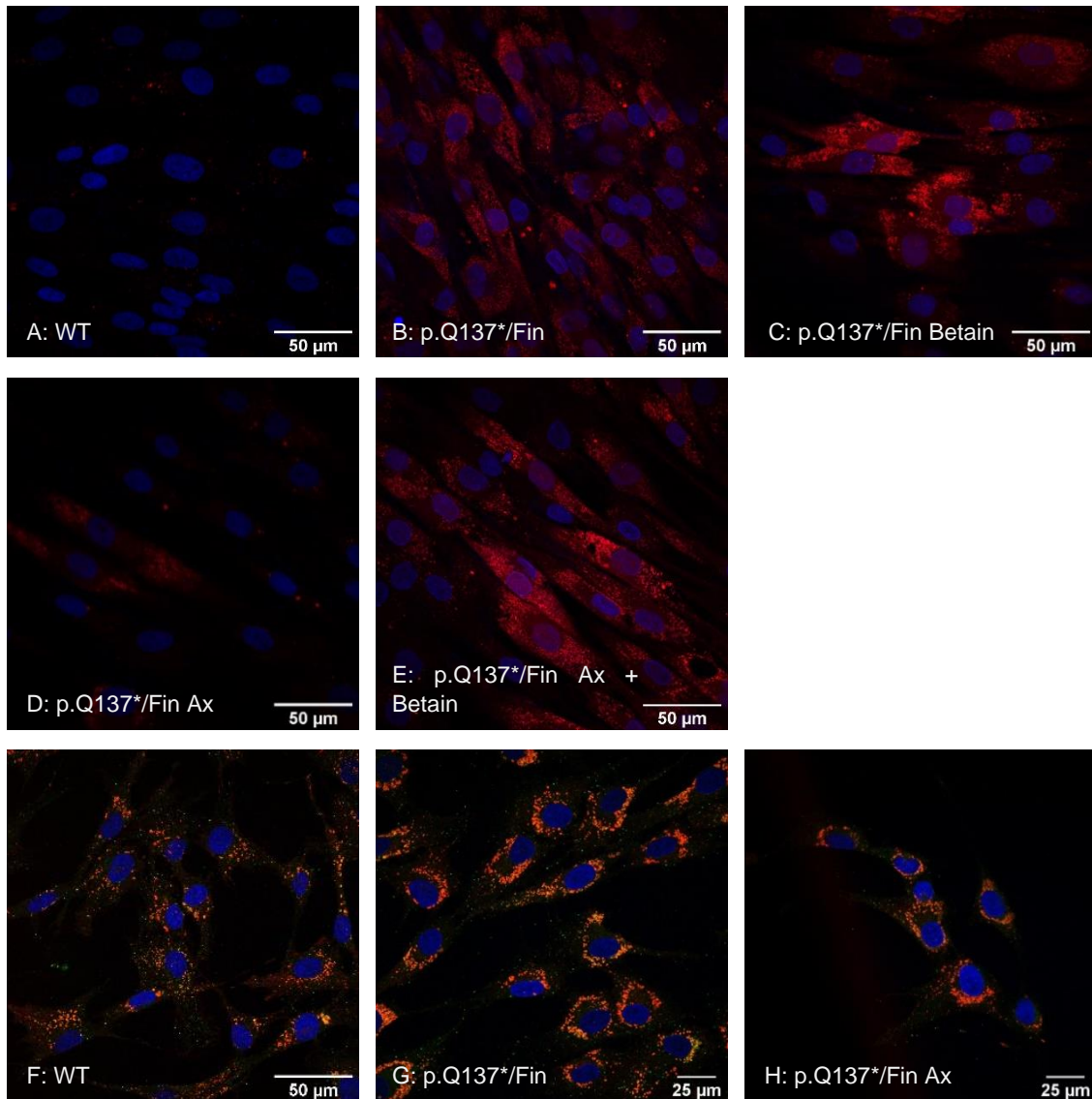
**Abbildung 14: Änderung der relativen Menge an AGA-mRNA in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin)-Fibroblasten durch die Behandlung mit Amlexanox und Koffein.** Die Fibroblasten wurden 24 Stunden nach ihrer Aussaat mit 25 µM Amlexanox, bzw. 10 mM Betain, bzw. Amlexanox/Betain-Kombination, bzw. 7,5 mM Koffein behandelt. Die Zellernte und Isolierung der RNA erfolgten nach weiteren 48 Stunden. Diese wurde zu cDNA transkribiert, mit welcher die RT-qPCR durchgeführt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=3. Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Der Wert p<0,001 ist höchstsignifikant (\*\*\*) gegen p.Q137\*/Fin (unbehandelt).

#### 4.3.3 Mikroskopische Anatomie von behandelten Patientenfibroblasten

Durch die positiven Ergebnisse der Aktivitätsanalyse stellte sich die Frage, ob die verbesserte AGA-Aktivität in der Morphologie der Zellen und Lysosomen visualisiert werden kann.

Heterozygote p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten wurden auf Deckgläschen kultiviert und 24 Stunden nach der Aussaat mit 25 µM Amlexanox, bzw. 10 mM Betain behandelt. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Fixierung mittels Paraformaldehyd (4%PFA). Die Zellkerne erscheinen durch den Fluoreszenz-Farbstoff DAPI blau. Durch Färbung mittels Lyotracker (Abb.15 A-E) erscheinen die Lysosomen rot. Des Weiteren wurden Immunfluoreszenzfärbungen vorgenommen (F-H): AGA wurde mit einem anti-AGA Antikörper aus Kaninchen nachgewiesen (Cy3, rot), während die Lysosomen durch Anti-Lamp3 (aus Maus) grün (Alexa488) gefärbt wurden. Befindet sich AGA in den Lysosomen, entsteht ein gelber Eindruck. Wildtyp-Fibroblasten dienen als Vergleich.

Abbildung 15 zeigt, dass es nicht möglich ist, ein klares Ergebnis aus den gewonnenen Bildern zu generieren, da die Fibroblasten zu heterogen in ihrer Lyotracker-Verteilung bzw. Immunfluoreszenzfärbung sind. Es sind einige Zellen zu sehen, welche durch die Behandlung eine Reduktion an Lysosomen und AGA aufweisen. Andere hingegen scheinen auf die Pharmaka nicht anzusprechen. Auch durch mehrfaches Wiederholen der Versuche wurde keine einheitliche Tendenz ersichtlich.



**Abbildung 15: Keine Änderung der abnormalen Morphologie von p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Fibroblasten durch die Behandlung mit Amlexanox und Betain.** Darstellung der Wildtyp (WT) bzw. p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin)- Fibroblasten, welche mittels LysoTracker (A-E) bzw. Immunfluoreszenz (F-H) gefärbt wurden. Die Kultivierung erfolgte auf Deckgläschen. Die Behandlung mit 25 µM Amlexanox (AX) bzw. 10 mM Betain wurde 48 Stunden vor der Fixierung mittels Paraformaldehyd (4%PFA) durchgeführt. Die Nuclei wurden durch DAPI blau markiert. In A-E wurden die Fibroblasten für 30 Minuten mittels LysoTracker inkubiert. Rotfärbung ist ein Zeichen für Lysosomen. Die Immunfluoreszenzfärbung (F-H) der Lysosomen erfolgte durch Anti-Lamp3 (Maus) und Alexa488-Anti-Maus-Antikörper (grün). AGA erscheint durch Anti-AGA (Kaninchen) und Cy3-Anti-Kaninchen-Antikörper rot. Die Abbildung entspricht einer repräsentativen Darstellung aus drei Experimenten.

#### 4.4 Klonierung der AGA-Luciferase-Fusion in pcDNA3 Plasmide

Um mit Hilfe der Luciferase-Aktivitätsanalyse den *Readthrough* am AGA-*Nonsense*-Codon untersuchen zu können, war es zunächst nötig, eine AGA-Luciferase-Fusion als DNA-Konstrukt zu generieren. Es wurden drei unterschiedliche Klone, d.h. Plasmid-DNA von drei verschiedenen Bakterienkolonien, gewählt. Die erfolgreiche Klonierung von AGA-Q137\* und AGA-WT, fusioniert an Firefly-Luciferase, wurde anhand der Sequenzierungsergebnisse bestätigt.

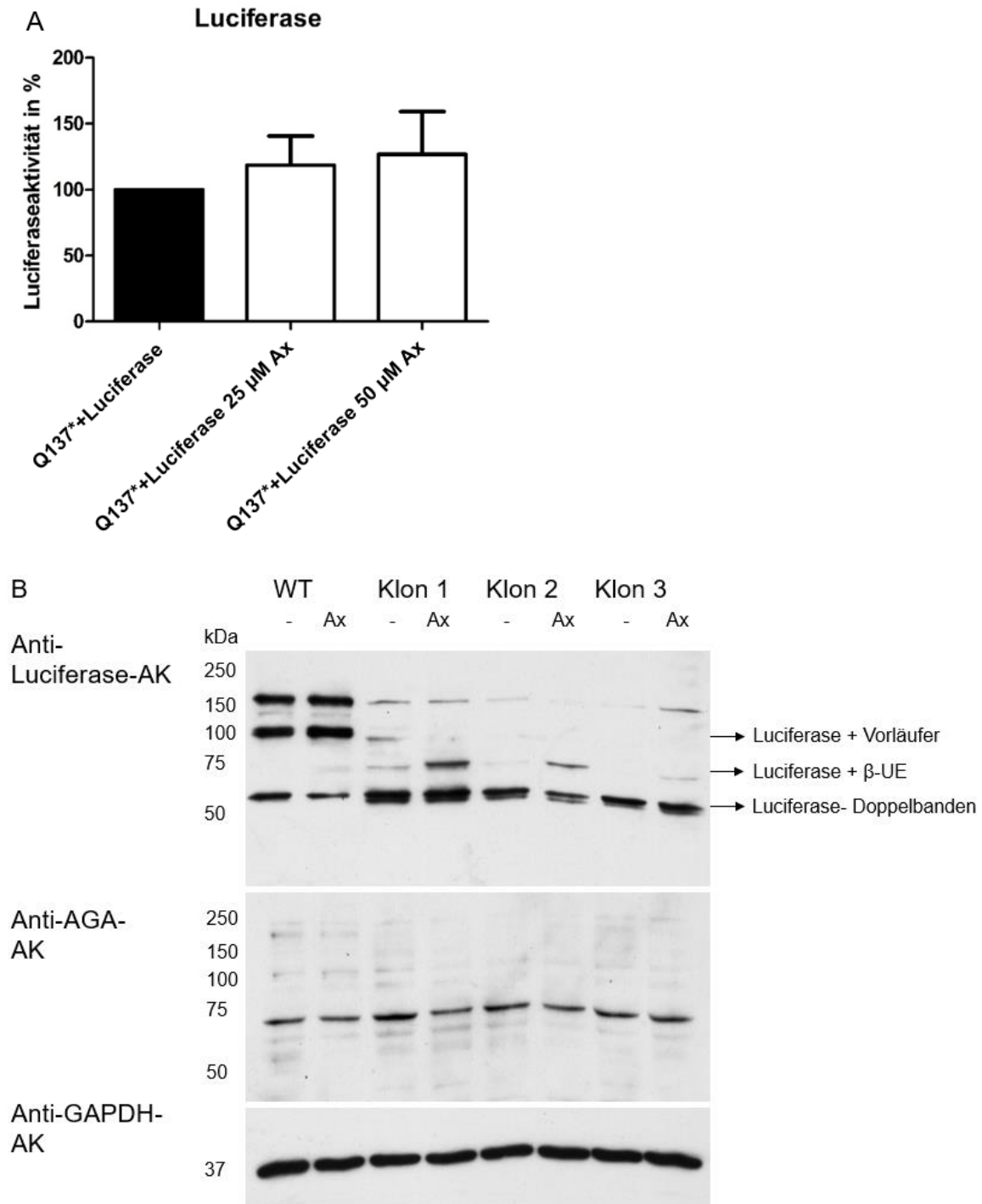
#### 4.5 Luciferaseassay und Western Blot der AGA-Luciferase-Fusion

Im Anschluss an die Herstellung der Plasmide mit AGA-Luciferase-Fusion sollten diese genutzt werden, um das Überlesen des *Nonsense*-Codons an den Ribosomen zu überprüfen. Kann das vorzeitige Stopcodon des AGAs erfolgreich überlesen werden, wird das Gen der Luciferase translatiert. Die Firefly-Luciferase setzt im Anschluss im Aktivitätsassay das Substrat Luciferin um, welches durch eine Chemilumineszenzmessung erkannt und quantifiziert wurde. 400 ng Plasmid-DNA, welche die AGA-Luciferase-Fusion beinhaltete, wurde in HEK239T-AGA-KO-Zelle transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung mit 25 bzw. 50  $\mu$ M Amlexanox. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und Proben für die Luciferase-Aktivitätsassays sowie den Western Blot hergestellt.

Abbildung 16A zeigt keine signifikante Steigerung der Luciferase-Aktivität durch die Gabe von 25  $\mu$ M Amlexanox auf 118,6%. Die Behandlung mit 50  $\mu$ M Amlexanox bewirkte eine nicht-signifikante Änderung auf 126,8% in Bezug auf unbehandelte AGA-Q137\*-Luciferase transfizierten HEK239T-AGA-KO-Zellen (100%).

Bei der Detektion der Luciferase mittels Antikörper im Western Blot ist ein deutlicher Effekt von Amlexanox zu beobachten: Bei 75 kDa zeigen insbesondere die behandelten Proben ein Signal im oberen Teil der Abbildung 12B. Es handelt sich vermutlich um die Luciferase (60 kDa) mit angehängter  $\beta$ -Untereinheit (14 kDa) des AGAs. Bei 60 kDa ist in allen Proben ein Signal bzw. zwei Signale zu erkennen. Diese entspricht der Größe der Luciferase. Im Wildtyp ist bei 100 kDa ebenfalls ein Signal zu beobachten, bei dem es sich um die Luciferase (60 kDa) in Kombination mit dem AGA-Vorläufer (42 kDa) handeln könnte. Die Proben des Wildtyps zeigen außerdem bei 150 kDa weitere Signale, deren Ursprung mit den Größen der Proteine nicht zu erklären ist. Es handelt sich möglicherweise um ein Aggregationsprodukt, das durch das SDS nicht beseitigt wurde. Der mittlere Teil der Abbildung 12B zeigt die Detektion mittels einem Anti-AGA-

Antikörper. Hierbei ist nur ein Signal bei circa 75 kDa sichtbar. Das Haushaltsgen GAPDH dient wiederum als Ladekontrolle (vgl. unterer Teil der Abbildung 12B).



**Abbildung 16 A: Keine signifikante Steigerung der Luciferase-Aktivität durch die Behandlung mit Amlexanox. B: Gesteigerte Synthese der AGA-β-Untereinheit durch Amlexanox in der Darstellung der AGA-Luciferase-Fusion im Western Blot.** HEK293T-AGA-KO-Zellen wurden mit 400 ng Plasmid-DNA, welche eine AGA-Q137\*-Luciferase-Genfusion beinhaltet, transfiziert. Die Behandlung erfolgte mit 25 bzw. 50 µM

Amlexanox (Ax) 24 Stunden nach der Transfektion für weitere 48 Stunden. A: Gezeigt ist die Firefly-Luciferase-Aktivität der Proben. Die Firefly-Luciferase-Aktivität wurde auf die Renilla-Luciferase normalisiert, um die Effektivität der Transfektion zu korrigieren. Die Aktivität der unbehandelten Proben wurde auf 100% Aktivität festgelegt. Es ist keine signifikante Steigerung der Aktivität durch die Behandlung mit Amlexanox zu beobachten. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=3. B: Darstellung der Expressionsprodukte der AGA-Luciferase-Fusion im Western Blot. Die Klone 1-3 sind verschiedene Klone, welche die AGA-Q137\*-Luciferase-Fusion tragen. Der Wildtyp (WT) enthält ebenfalls eine AGA-WT-Luciferase-Fusion. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper, während die Luciferase durch einen Antikörper der Firma Santa Cruz gezeigt wurde.

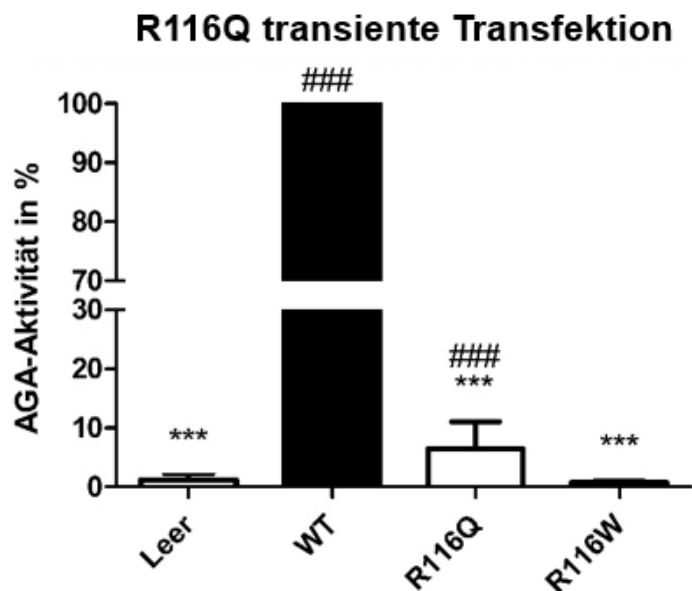
#### 4.6 Charakterisierung der Missense-Variante p.R116Q

c.347G>A; p.R116Q ist eine *Missense*-Variante der AGA, bei der ein Arginin an der 116. Stelle der Aminosäurekette von einem Glutamin ersetzt wurde. Durch die Substitution zweier Aminosäuren ändern sich die intermolekularen Wechselwirkungen, welche durch die unterschiedlichen Seitenketten der Aminosäuren bedingt werden. Dies könnte eine korrekte Faltung des Proteins verhindern und die Aktivität vermindern. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Schritt die Variante p.R116Q unter den Gesichtspunkten Grundaktivität und Prozessierung charakterisiert. Die Variante c.346C>T; p.R116W, welche Banning et al. bereits untersuchten, wurde zum Vergleich herangezogen (Banning et al. 2016). Die Variante ist ebenfalls an der 116. Stelle der Aminosäurekette lokalisiert. Allerdings ersetzt bei p.R116W ein Tryptophan das ursprüngliche Arginin. p.R116W wurde erstmalig bei drei türkischen Geschwistern beschrieben, die das typische klinische Bild der AGU präsentierten (Opladen et al. 2014). In einem zweiten Schritt wurden die Therapieoptionen für die Variante p.R116Q getestet.

##### 4.6.1 AGA-Restaktivität in p.R116Q transfizierten Zellen

Um einen ersten Eindruck der Grundbedingungen der Zellen zu schaffen, welche die Variante p.R116Q in AGA tragen, wurden HEK293T-AGA-KO-Zellen transient mit 400 ng Plasmid-DNA transfiziert. Nach 48 Stunden wurden Lysate hergestellt um anschließend AGA-Aktivitätsassays durchzuführen. Die Proben der HEK293T-AGA-KO-Zellen, welche mit p.R116Q transfiziert wurden, zeigen in Abbildung 17 eine höchst signifikant verminderte relative AGA-Aktivität im Vergleich zu den Wildtyp-transfizierten Zellen. Im Unterschied zur Variante p.R116W ist allerdings eine geringe Restaktivität

von 6,4% zu beobachten, die gegen die Negativkontrolle (Leer) ebenfalls höchst signifikant ist. Proben der Variante p.R116W zeigen eine höchstsignifikante Reduktion der AGA-Aktivität auf 0,7%, die mit den bisherigen Daten zu dieser Variante übereinstimmt (Banning et al. 2016).



**Abbildung 17: Höchst signifikante Reduktion der AGA-Aktivität, mit geringer Restaktivität der Variante p.R116Q im Unterschied zu p.R116W in transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen.** AGA-Knock-out-Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit 400 ng Plasmid-DNA transfiziert und nach weiteren 48 Stunden geerntet wurden. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen,  $n \geq 5$ . Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Die Ergebnisse (###) sind höchstsignifikant  $p < 0,001$  gegen den Leer-Vektor (Leer). Die Ergebnisse (\*\*\*) sind höchstsignifikant  $p < 0,001$  gegen den Wildtyp (WT).

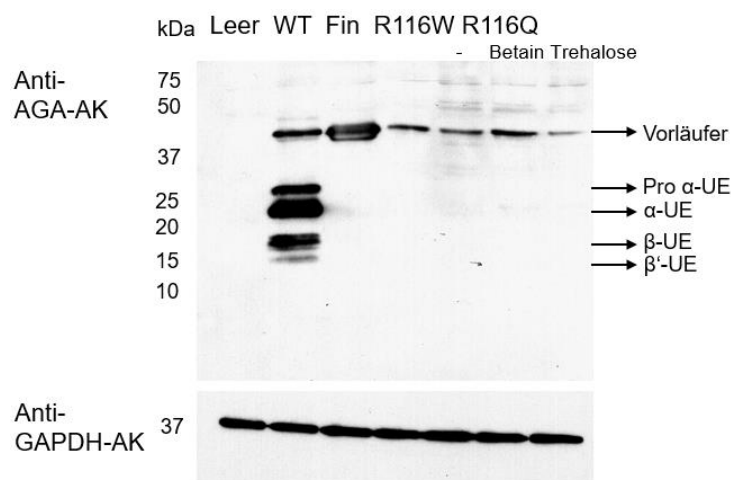
#### 4.7 Behandlung von p.R116Q transfizierten Zellen

##### 4.7.1 Prozessierung und Behandlung von p.R116Q transient transfizierten Zellen

Um einen Einblick in die Prozessierung zu erhalten, wurden Western Blots aus Proben der p.R116Q transient exprimierenden Zellen durchgeführt. Als Vergleich wurde neben den Positiv- und Negativkontrollen die Varianten p.R116W sowie AGU<sub>Fin-Major</sub> gewählt.

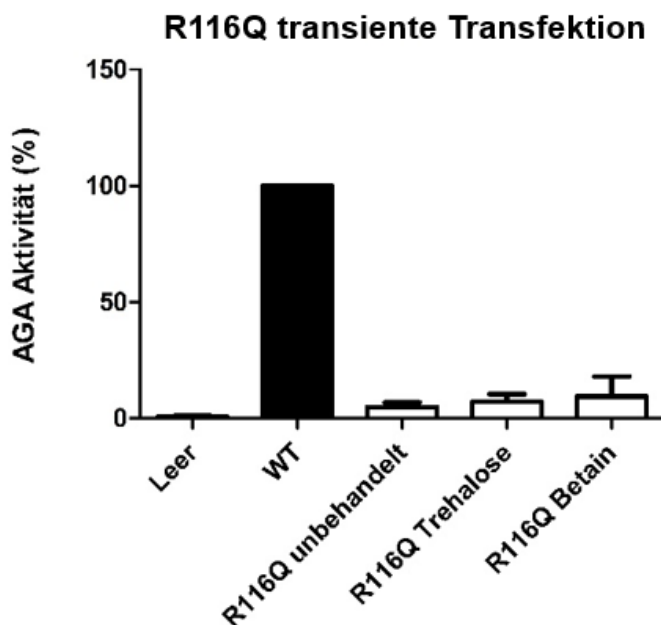
Mit dem Ziel, eine Prozessierung herbeizuführen sowie die AGA-Aktivität zu steigern, wurden die transient transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen am Tag nach der Transfektion behandelt. Eingesetzt wurden 10 mM des pharmakologischen Chaperon Betain sowie 100 mM des Zuckers Trehalose, welcher unter anderem als Aktivator des Transkriptionsfaktor EB Einfluss auf die Lysosomen nimmt. 48 Stunden nach der Behandlung wurden Lysate hergestellt, aus denen Aktivitätsanalysen und Western Blots angefertigt wurden.

Die Proben des Wildtyps zeigen in Abbildung 18 sowohl prozessiertes als auch unprozessiertes AGA. Es ist der Vorläufer bei 42 kDa, Pro- $\alpha$ - und  $\alpha$ -Untereinheit bei 27 bzw. 24 kDa sowie  $\beta$ - und  $\beta'$ -Untereinheit bei 17 bzw. 14 kDa zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigen die Varianten p.R116Q, AGU<sub>Fin-Major</sub> und p.R116W ausschließlich den unprozessierten AGA-Vorläufer. Das Signal der Probe AGU<sub>Fin-Major</sub> erscheint dicker. Es ist zu vermuten, dass dies auf einer Akkumulation des funktionslosen Proteins beruht. Insgesamt scheinen alle Varianten deutlich weniger AGA-Protein als der Wildtyp im Western Blot zu haben. Dies spricht für eine Instabilität der Varianten. Die Proben der behandelten Zellen zeigen, parallel zu den unbehandelten Proben, ein Signal des Vorläufers bei 42 kDa. Beim Therapieversuch mit Betain ist in mehreren Versuchen der Hauch eines Signals der  $\alpha$ -Untereinheit zu erkennen, der auf eine Prozessierung des Vorläufers in sehr geringen Maßen hinweist.



**Abbildung 18: Keine Prozessierung des AGA-Vorläufers in p.R116Q transfizierten Zellen im Western Blot.** Der Western Blot zeigt die Expressionsprodukte von HEK293T-AGA-KO-Zellen, welche mit 400 ng Plasmid-DNA transfiziert wurden. Die Behandlung von R116Q erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion mit 10 mM Betain, sowie 100 mM Trehalose für weitere 48 Stunden. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper. Die Abbildung entspricht einer repräsentativen Darstellung aus mindestens drei Experimenten.

In Abbildung 19 ist neben der schon beschriebenen Grundaktivität eine Veränderung der AGA-Aktivität von 6,4% auf 7,1% (Trehalose) bzw. 9,3% (Betain) zu beobachten. Die Aktivitätssteigerungen erreichten nicht das Signifikanzniveau und haben deskriptiven Charakter.



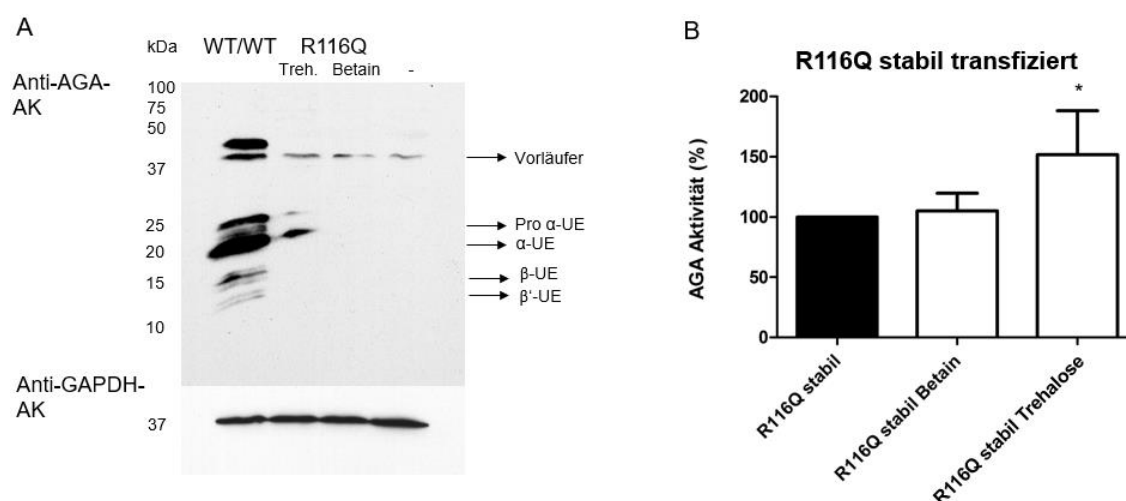
**Abbildung 19: Keine signifikante Steigerung der AGA-Restaktivität in p.R116Q transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen durch Betain bzw. Trehalose.** Die AGA-Aktivitätsassays wurden mit Lysaten von HEK293T-AGA-KO-Zellen erhoben, welche parallel zum Versuchsaufbau in Abbildung 18 transfiziert und behandelt wurden. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen, n=3.

#### 4.7.2 Behandlung von p.R116Q stabil transfizierten Zellen

Um die Ergebnisse der Pharmaka Betain und Trehalose in einem anderen System zu überprüfen, wurde eine Versuchsreihe mit stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle über den Erfolg der stabilen Transfektion wurde von den Zellen, welche mit der Variante p.R116Q stabil transfiziert wurden, zunächst ein Lysat hergestellt. Im Western Blot konnte beobachtet werden, dass verändertes AGA von den Zellen überexprimiert hergestellt wurde. Nach stabiler Transfektion wurden die Zellen mit 10 mM Betain, bzw. 100 mM Trehalose behandelt und 48 Stunden später lysiert. Mit den Proben wurden Aktivitätsanalysen sowie Western Blots angefertigt. Zur Veranschaulichung wurde eine Probe eines doppelt-transfizierten Wildtyps neben den Proben der Variante p.R116Q im Western Blot aufgetragen.

In Abbildung 20A zeigt die Variante p.R116Q lediglich bei 42 kDa ein Signal des unprozessierten AGA-Vorläufers. Das Ergebnis entspricht den Resultaten in einfach und doppelt transient transfizierten Systemen der vorhergegangenen und kommenden Versuche. Durch die Behandlung mit Betain ist kein verändertes Bild zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist durch die Behandlung mit Trehalose in mehreren Versuchen ein Signal der  $\alpha$ -Untereinheit bei circa 24 kDa zu sehen. Bei 27 kDa ist zusätzlich die Pro- $\alpha$ -Untereinheit angedeutet. Da die Signale der Pro- $\alpha$ - sowie  $\alpha$ -Untereinheit der mit Trehalose behandelten Proben deutlich schwächer als die des Wildtyps sind, ist in diesen Zellen von einer vorhandenen, aber geringeren Prozessierung auszugehen.

Die Aktivitätsanalyse in Abbildung 20B bestätigt den Effekt der Trehalose. Die Aktivität der HEK293T-AGA-KO-Zellen, welche mit p.R116Q stabil transfizierten wurden und unbehandelt blieben, wurde auf 100% festgelegt. Die Behandlung mit 10 mM Betain führt zu einer nicht-signifikanten Veränderung der AGA-Aktivität auf 104,9%. Dagegen ergab die Behandlung mit 100 mM Trehalose eine signifikante Steigerung auf 151,5%.



**Abbildung 20: Prozessierung der  $\alpha$ -Untereinheit und signifikante Steigerung der AGA-Aktivität in p.R116Q stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen durch die Behandlung mit Trehalose.** Die stabile Transfektion erfolgte mit R116Q-Vektoren in HEK293T-AGA-KO-Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat mit 10 mM Betain, bzw. 100 mM Trehalose behandelt und nach weiteren 48 Stunden geerntet. A: Der Western Blot zeigt die Expressionsprodukte der Proben. Zur Veranschaulichung wurde in A der Wildtyp der transient ko-transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen neben den p.R116Q-Proben aufgetragen. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper. B: Das Aktivitätsassay gibt die Mittelwerte und die Standardabweichungen an, n=4. Die Analyse erfolgte durch One-Way Anova. Der Wert  $p < 0,05$  ist signifikant (\*) gegen p.R116Q stabil (unbehandelt).

#### 4.7.3 Ko-Transfektion von p.R116Q/Wildtyp

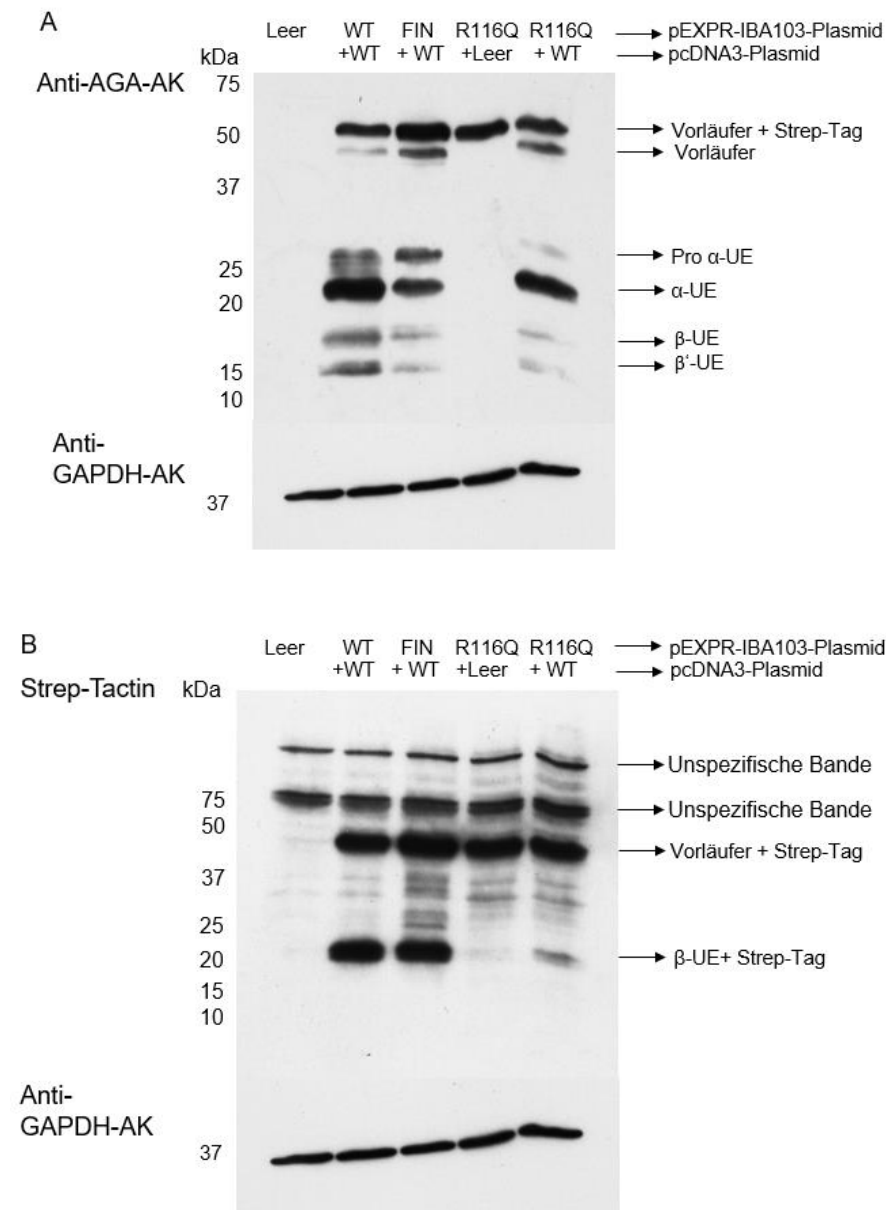
Ziel dieser Versuchsreihe ist zu überprüfen, ob die Anwesenheit von Wildtyp-AGA die Faltung und Prozessierung von p.R116Q-AGA beeinflussen kann. Es wurden Ko-Transfektionen von Wildtyp und Variante vorgenommen. Um nachvollziehen zu können, ob prozessiertes AGA vom Wildtypgen oder vom *p.R116Q*-AGA-Gen stammt, wurde p.R116Q im pEXPR-IBA103-Plasmid transfiziert. An AGA, welches aus diesem Plasmid stammt, ist folglich das Strep-Tag angehängt. Da dieses C-terminal zu AGA hinzugefügt wird, befindet es sich zunächst am Vorläufer und schließlich an der  $\beta$ -Untereinheit, welche durch Strep-Tactin dargestellt werden können. Die Transfektion des Wildtyps erfolgte im pcDNA3-Vektor. AGA, welches vom Wildtyp stammt, wird demnach ausschließlich durch den Anti-AGA-Antikörper dargestellt.

Als Vergleich wurde  $AGU_{Fin-Major}$  im pEXPR-IBA-103-Plasmid mit dem Wildtyp im pcDNA3-Vektor ko-transfiziert. Banning et al. beschrieben für diese Kombination eine deutliche Steigerung der Prozessierung der Variante  $AGU_{Fin-Major}$  im Vergleich zur Transfektion von  $AGU_{Fin-Major}$  ohne Wildtyp (Banning et al. 2016). Als Positivkontrolle wurde Wildtyp sowohl im pEXPR-IBA-103- als auch im pcDNA3-Plasmid transfiziert. Die Negativkontrolle erfolgte sowohl durch alleinige Transfektion des pEXPR-IBA-103-Leervektors als auch durch Ko-Transfektion der Variante p.R116Q im pEXPR-IBA-103-Plasmid in Kombination mit dem pcDNA3-Leerplasmid.

Die Detektion mittels Anti-AGA-Antikörper (Abbildung 21A) zeigt in allen Proben, welche Wildtyp enthalten, das klassische Muster des Vorläufers sowie der Untereinheiten. Proben, welche aus einer Transfektion von p.R116Q bzw.  $AGU_{Fin-Major}$  entstanden, präsentieren außerdem das Signal des Vorläufers zuzüglich des Strep-Tags bei circa 45 kDa.

Die Detektion mittels Strep-Tactin (Abbildung 21B) erlaubt ausschließlich die Verfolgung des AGAs, welches im pEXPR-IBA-103-Plasmid transfiziert wurde. In der vierten und fünften Probe entspricht dies der Variante p.R116Q, in der dritten  $AGU_{Fin-Major}$ . Durch die Anwesenheit von Wildtyp kann eine deutliche Prozessierung der  $\beta$ - Untereinheit der Probe  $AGU_{Fin-Major}$  (Fin) beobachtet werden. Die Probe p.R116Q/WT präsentiert ebenfalls ein Signal, obgleich in schwächerer Intensität. In den Negativkontrollen Leer und p.R116Q/Leer ist dieses Signal nicht zu beobachten. Die Probe p.R116Q/Leer präsentiert ausschließlich bei 45 kDa ein Signal, das dem unprozessierten Vorläufer plus Strep-Tag entspricht. Zusätzlich sind in jeder Probe zwei unspezifische Signale zu beobachten, die vermutlich auf ein unspezifisches Erkennungspotential des Antikörpers

zurückzuführen sind. Das Haushaltsprotein GAPDH stellt im unteren Teil der Abbildung 21 die Ladekontrolle dar.



**Abbildung 21: Prozessierung des Vorläufers in p.R116Q und AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin) transfizierten Zellen in Anwesenheit des Wildtyps.** Der Western Blot zeigt die Expressionsprodukte von HEK293T-AGA-KO-Zellen, welche sowohl mit 200 ng pcDNA3-Plasmid als auch 200 ng pEXPR-IBA-103-Plasmid-DNA transfiziert und nach 72 Stunden geerntet wurden. Die transiente Doppel-Transfektion erfolgte in den Kombinationen Fin/WT(Wildtyp)-, R116Q/Leer-, R116Q/WT-, WT/WT-, sowie Leer-Vektoren. AGA wurde detektiert durch den Anti-AGA-Antikörper. Strep-Tactin detektierte

ausschließlich EXPR-IBA-103-Konstrukte. Die Abbildung entspricht einer repräsentativen Darstellung aus mindestens drei Experimenten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Therapieoptionen für die AGU-Variante p.Q137\*

#### 5.1.1 Molekulare Auswirkungen der Variante p.Q137\*

In dieser Arbeit wurde die *Nonsense*-Variante c.409 C>T; p.Q137\* des AGA-Gens charakterisiert. Es handelt sich um eine Punktmutation, die zur Folge hat, dass ein Glutamin an der 137. Stelle der Aminosäuresequenz durch ein *Nonsense*-Codon ersetzt wird. Die Variante wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und wurde bei einer finnischen compound-heterozygoten Patientin in Kombination mit AGU<sub>Fin-Major</sub> entdeckt. Die Patientin wurde 2005 geboren und leidet an einem typischen Phänotyp der Erkrankung.

Die Versuche zur Charakterisierung legten die Folgen der *Nonsense*-Variante p.Q137\* auf zellulärer wie auf molekularer Ebene dar: Die morphologisch krank erscheinenden Zellen leiden unter einer höchst signifikanten Reduktion der AGA-Aktivität, die sich in der Abwesenheit von AGA-Vorläufer und Proteinuntereinheiten im Western Blot widerspiegelt. Ursächlich dafür ist unter anderem die herabgesetzte AGA-mRNA-Menge, die für einen umfassenden Abbau der p.Q137\*-AGA-mRNA durch den NMD spricht. Die mRNA, welche die Variante p.Q137\* trägt, wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch den NMD abgebaut, da das *Nonsense*-Codon im vierten Exon, deutlich vor der letzten Exon-Exon-Verbindung, lokalisiert ist. Mutationen, die weniger als 50-55 Basenpaare vor der letzten Exon-Exon-Verbindung liegen, führen dagegen vermehrt zu einer stabilen mRNA (Dreyfuss et al. 2002).

In p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> heterozygoten Patientenfibroblasten befindet sich das mutierte AGA-Protein in den Lysosomen. Der Transport durch ER und Golgi-Apparat setzt eine korrekte Mannose-6-Phosphorylierung voraus, die von der Faltung des Proteins abhängig ist und durch die Genvariante nicht gestört scheint. Es wurde bereits gezeigt, dass die AGA-Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> trotz Mutationen den Weg in die Lysosomen findet (Banning et al. 2016). Kommt es bei der Variante p.Q137\* nicht zum natürlichen *Readthrough*, ist es sehr unwahrscheinlich, dass das kurze Protein korrekt mit Mannose-6-Phosphat markiert werden könnte. In den Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> heterozygoten Patientenfibroblasten liegt es daher nahe, dass vornehmlich AGA des Ursprungsallels AGU<sub>Fin-Major</sub> in den Lysosomen lokalisiert ist. Die Ergebnisse zur Variante p.Q137\* spiegeln den typischen Phänotyp der Patientin wider, welche die heterozygote Variante Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> trägt. Die Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> führt in vivo ebenfalls zu einem

ausgeprägten Krankheitsbild der AGU, wie in homozygoten Patienten beobachtet wurde (Syvanen et al. 1992).

Im Fall der AGU sind im Vergleich zu anderen lysosomalen Speicherkrankheiten wenig *Nonsense*-Varianten bekannt. Banning et al. untersuchten 2018 die heterozygote Variante p.W168\*/S72P. Es zeigte sich eine ähnliche Problematik, wie die der Variante p.Q137\*: Eine stark reduzierte AGA-Aktivität und ein umfangreicher Abbau der *Nonsense*-mRNA durch den NMD (Banning et al. 2018).

### 5.1.2 Pharmakologische Induktion von *Readthrough*

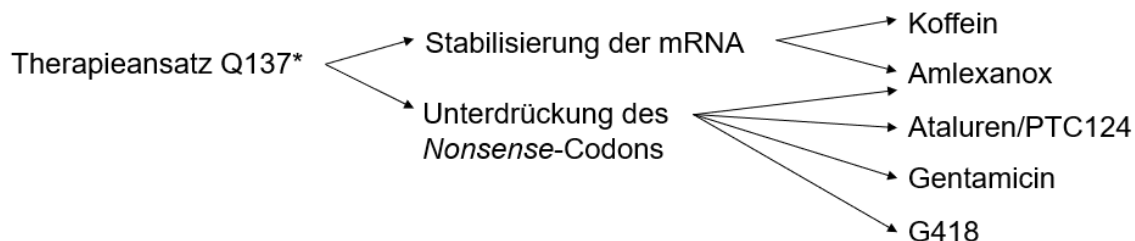
Die zentrale Hypothese dieser Arbeit lautet, dass es mit *Readthrough*-induzierenden Medikamenten gelingen kann, eine AGA-Aktivitätssteigerung zu erwirken und damit eine Therapieoption für die p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> compound heterozygote Patientin zu finden. Da die Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> bereits Bestand der Forschung ist, konzentriert sich diese Arbeit auf das Allel, welches die bisher unbekannt Variante p.Q137\* trägt.

Durch das *Nonsense*-Codon der mRNA der Variante p.Q137\* ergeben sich zwei wesentliche Probleme, die einem funktionierenden AGA entgegenstehen: Zum einen wird die fehlerhafte mRNA vom NMD erfasst und abgebaut. Kann dieser Schritt verhindert werden, besteht weiterhin die Problematik, dass das *Nonsense*-Codon in aller Regel zu einem verfrühten Abbruch der Synthese der Polypeptidkette an den Ribosomen und zu einem unvollständigen Protein führt. Allerdings gibt es zwei mögliche Verläufe, wenn ein Stopcodon die A-Stelle des Ribosoms betritt: Zum einen kommt es zur Termination der Translation. Zum anderen kann das Stopcodon überlesen werden, und die Translation fährt fort. In diesem Fall konkurriert eine nahverwandte tRNA, die nur mit zwei Basen dem Triplett-Codon übereinstimmt, erfolgreich mit dem eRF1 (Nagel-Wolfrum et al. 2016). Physiologisch kommt es bei jedem Stopcodon, egal ob verfrüht oder natürlich, zu einem gewissen, variablen Grad zum Überlesen über das Codon hinaus (Bidou et al. 2012). Der spontane *Readthrough* von *Nonsense*-Varianten hat eine Frequenz von 0.001–0.1% (Tate et al. 1995). Die Häufigkeit des Überlesens ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Diverse Studien diskutieren eine Abhängigkeit der unmittelbar anschließenden Nukleotide (C > U > A > G) (Bidou et al. 2012). Des Weiteren scheint die spezifische Identität des *Nonsense*-Codons den Erfolg des Überlesens zu beeinflussen (UGA>UAG>UAA) (Manuvakhova et al. 2000). Das *Nonsense*-Codon der Variante p.Q137\* lautet UAA und könnte somit schlechter auf eine Therapie ansprechen. Allerdings ist eine allgemeine Vorhersage über die Effektivität des *Readthroughs* nicht möglich. Dies betont die Relevanz der individuellen Analyse neuer Varianten, wie sie in

der personalisierten Medizin angestrebt und in diesem Fall durchgeführt wird (Manuvakhova et al. 2000; Howard et al. 2000).

Einige Substanzen sind bekannt dafür, den NMD zu verhindern und/ oder ein Überlesen an den Ribosomen zu fördern. Abbildung 22 zeigt eine schematische Darstellung der in dieser Arbeit erprobten Therapieoptionen. Die erste Demonstration von pharmakologisch induziertem *Readthrough* als Therapie erfolgte durch die partielle Wiederherstellung der CFTR-Funktion bei zystischer Fibrose im Jahr 1996 (Howard et al. 1996; Bedwell et al. 1997). Des Weiteren wurden der *Readthrough* schon früh als mögliche Therapieoption bei muskulären Dystrophien diskutiert (Barton-Davis et al. 1999). Mittlerweile ist er in über 40 Erkrankungen erprobt (Keeling et al. 2014).

Gelingt ein pharmakologisch induzierter *Readthrough*, so besteht eine weitere Unsicherheit darin, dass anstelle des *Nonsense*-Codons nicht eine beliebige Aminosäure eingebaut werden darf. Bestenfalls sollte die ursprüngliche Aminosäure eingebaut werden, im Fall p.Q137\* ein Glutamin, um eine korrekte Proteinfaltung und Enzymfunktion zu gewährleisten. Da das *Nonsense*-Codon UAA allerdings schon in 2 Basen mit dem Codon CAA für Glutamin übereinstimmt, könnte es in einer Mehrzahl der Fälle beim *Readthrough* zum Einbau des Glutamins kommen.



**Abbildung 22: Schematische Darstellung der anvisierten Therapieoptionen für p.Q137\*.** Bei der *Nonsense*-Variante p.Q137\* ist das zentrale Problem die verkürzte Aminosäurekette, die durch den Abbruch der Translation am *Nonsense*-Codon entsteht, sowie der Abbau der *Nonsense*-mRNA durch den NMD. Die Substanzen Amlexanox, Ataluren/PTC124 sowie die Aminoglykoside Gentamicin und G418 sollen ein Überlesen des *Nonsense*-Codons induzieren. Ich testete diese in verschiedenen Zellmodellen, für die noch nicht beschriebene Variante p.Q137\*. Des Weiteren erforschte ich eine mögliche Hemmung des NMDs der mRNA durch die Substanzen Koffein und Amlexanox.

### 5.1.3 Wirkung der Aminoglykoside

Aminoglykoside, wie die Leitsubstanz Gentamicin, werden in der heutigen Medizin in erster Linie zur Antibiotikatherapie eingesetzt. Aminoglykoside bestehen aus einem 2-Deoxystreptaminring mit mehreren Aminozuckern. Sie binden das prokaryotische ribosomale Ablesezentrum, welches die Codon-Anticodon-Interaktion überprüft (Recht et al. 1999). Dies führt zum Fehleinbau von Aminosäuren nahverwandter Aminoacyl-tRNAs sowohl an normalen (=sense) als auch an *Nonsense*-Codons. Das Ergebnis sind umfangreiche Übersetzungsfehler in der Translation und eine bakterizid wirkende Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese. Aminoglykoside haben eine deutlich schwächere Affinität zum Dekodierungszentrum eukaryotischer Ribosomen (Recht et al. 1999). Insbesondere das Ablesen von normalen (=sense) Codons scheint nicht gestört zu sein, so dass die eukaryotische Proteinsynthese bei der Antibiotikatherapie nicht behindert wird (Salas-Marco und Bedwell 2005). Dennoch wurde gezeigt, dass Aminoglykoside auch in eukaryotischen Zellen an die Ribosomen binden und dort zum Fehleinbau von nahverwandten Aminoacyl-tRNAs an *Nonsense*-Codons führen (Scheunemann et al. 2010; Palmer et al. 1979). Neben Gentamicin wurde in dieser Arbeit das Derivat G418 getestet, welches stärker als die Leitsubstanz an die 80S-Unterheiten der eukaryotischen Ribosomen bindet und dadurch nicht als Antibiotikum eingesetzt wird (Bar-Nun et al. 1983). Allerdings könnte die Substanz, welche auch als Geneticin bezeichnet wird, eine gesteigerte *Readthrough*-Fähigkeit besitzen (Pfister et al. 2003).

Der Effekt von Aminoglykosiden als *Readthrough*-induzierende Substanzen wurde bereits am Mausmodell für verschiedener Erkrankungen getestet: Dazu gehört die Muskeldystrophie Typ Duchenne, zystische Fibrose und auch die lysosomale Speicherkrankheit Mukopolysaccharidose Typ 1 (Barton-Davis et al. 1999; Du et al. 2002; Keeling et al. 2013). Die Ergebnisse zeigten, dass Aminoglykoside in der Lage sind, die Proteinfunktion zu erhöhen. Allerdings gelang dies nicht in allen *Nonsense*-Varianten. Der Erfolg variierte stark bis zu einem Faktor 50 (Bidou et al. 2004). Die Aktivitätsanalyse von p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten, die mit den Substanzen Gentamicin bzw. G418 behandelt wurden, zeigte keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität. Ein Grund für den stark variierenden Erfolg des *Readthrough* durch Aminoglykoside scheint in der spezifischen Basensequenz begründet zu sein, die auf das *Nonsense*-Codon folgt. Die optimalen Bedingungen für ein *Readthrough* durch Aminoglykoside scheinen gegeben zu sein, wenn sich Cytidin und Uracil in den folgenden 4 Position befinden (Manuvakhova et al. 2000; Floquet et al. 2012). Des Weiteren wird eine Abhängigkeit von der spezifischen Basenabfolge des *Nonsense*-

Codon (UGA>UAG>UAA) diskutiert (Manuvakhova et al. 2000; Floquet et al. 2012). Ursächlich für die mangelnde Effektivität der Aminoglykoside bei der Variante p.Q137\* könnten die nicht optimalen Bedingungen für einen *Readthrough* sein, welche durch die Identität des *Nonsense*-Codons (UAA) sowie den folgenden Basen (AGTAT) bedingt sind. Ebenso könnte der NMD, welcher durch die Aminoglykoside nicht gehemmt wird, einen effektiven *Readthrough* verhindern.

Die klinische Anwendbarkeit von Aminoglykosiden bei der AGU steht außerdem auf Grund des Nebenwirkungsprofils in Frage, da im Gegensatz zur Antibiotikatherapie eine lebenslange Therapie nötig wäre. Im Vordergrund stehen hierbei die Nephrotoxizität und Ototoxizität, die aus der Akkumulation des Medikaments im proximalen Tubulus der renalen Rinde, sowie in den Haarzellen der Cochlea resultieren (Wargo und Edwards 2014). Ursächlich hierfür ist ein Megalinrezeptor, der Aminoglykoside bindet und in den Innenohrzellen sowie Tubuluszellen lokalisiert ist (Keeling et al. 2014). Die Toxizität wird also nicht durch das Überlesen des *Nonsense*-Codons verursacht. Verschiedene Ansätze mit dem Ziel, die Toxizität der Aminoglykoside zu reduzieren, wurden entwickelt, zeigten allerdings bisher keinen durchschlagenden Erfolg (Du et al. 2009; Takamoto et al. 2005; Jospe-Kaufman et al. 2020). Insgesamt bedeutet dies, dass nicht alle Patienten von einer Therapie mit Aminoglykosiden profitieren (Bidou et al. 2004). In Anbetracht der Nebenwirkungen ist daher eine personalisierte Erforschung der Therapieoptionen, wie sie in diesem Fall vorgenommen wurde, notwendig. Für die heterozygote AGU-Patientin ist eine Therapie mit Aminoglykosiden nicht geeignet.

#### 5.1.4 Wirkung von Ataluren/PTC124

PTC124, welches auch unter dem Namen Ataluren bekannt ist, ist eine Oxadiazol-Verbindung, die durch eine große Screening Studie zu *Readthrough*-induzierenden Medikamenten an *Nonsense*-Varianten identifiziert wurde (Welch et al. 2007). PTC124 bindet, im Unterschied zu den Aminoglykosiden, die große 60S-Untereinheit der Ribosomen (Rowe und Clancy 2009).

Verschiedene experimentelle und klinische Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der PTC124-Effektivität. In mehreren Studien, unter anderen zum Long-QT-Syndrom oder Peroxisomen-Defekten, konnte durch PTC124 eine Enzymfunktion nicht wieder hergestellt werden (Dranchak et al. 2011; Harmer et al. 2012). Positive Ergebnisse mit einer erfolgreichen Unterdrückung eines *Nonsense*-Codons berichten dagegen mehrere andere Studien, einschließlich einer Studie zur lysosomalen Speicherkrankheit neuronalen Ceroid Lipofuszinose 2 (Keeling et al. 2014; Drake et al.

2013; Miller et al. 2013; Michorowska 2021). Die positiven Ergebnisse führten 12/2014 zur Zulassung von Ataluren auf dem deutschen Markt zur Therapie der Muskeldystrophie Typ Duchenne, wenn diese durch eine *Nonsense*-Variante ausgelöst wird (Keeling et al. 2014; Kerem et al. 2008; Michorowska 2021). Insgesamt deuten die klinischen Daten zu Ataluren daraufhin, dass das Fortschreiten der Krankheit in einer schmalen therapeutischen Breite geringfügig verlangsamt wird, obwohl die primären Endpunkte einiger klinischer Studien nicht erreicht wurden (Pascual-Morena et al. 2020; Łoboda und Dulak 2020; McDonald et al. 2017).

Für AGU wurde durch die Behandlung mit Ataluren eine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität in Patientenfibroblasten der Variante W168\* beobachtet (Banning et al. 2018). Allerdings lag diese deutlich unter dem Niveau der Aktivitätssteigerung, die durch das Medikament Amlexanox erreicht wurde (Banning et al. 2018), welches ebenfalls in meiner Arbeit für die Variante Q137\* untersucht wird. Die Behandlung von Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten mit Ataluren/PTC124 zeigte in der Aktivitätsanalyse keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität. Eine Stabilisierung der mRNA, welche ein *Nonsense*-Codon trägt, wurde bisher nicht durch Ataluren gezeigt (Nagel-Wolfrum et al. 2016; Welch et al. 2007). Aus diesem Grund steht vermutlich nur wenig p.Q137\*-mRNA zur Verfügung, so dass die Effektivität des *Readthroughs* eingeschränkt ist (Rebbapragada und Lykke-Andersen 2009; Baker und Parker 2004). Daher testete ich zusätzlich die Kombination von Ataluren mit Koffein, welches die mRNA stabilisieren kann (Lentini et al. 2019; Usuki et al. 2004). Allerdings zeigte auch die Kombination mit Koffein keine signifikante AGA-Aktivitätssteigerung.

Die mangelnde Effektivität des *Readthroughs* durch Ataluren könnte, ähnlich wie im Fall der Aminoglykoside, durch den lokalen Kontext der mRNA-Sequenz bedingt sein, den das *Nonsense*-Codon umgibt. (Manuvakhova et al. 2000; Keeling et al. 2014). Als Ursache für die inkonsistenten Ergebnisse der vorherigen Studien wurde des Weiteren eine enge therapeutische Breite des Atalurens diskutiert (Peltz et al. 2013; Keeling et al. 2014). Aus diesem Grund verwendete ich für die Analyse die gleiche Konzentration Ataluren, wie sie in den Experimenten mit der AGU-Variante W168\* von Banning et al. verwendet wurde. Dennoch könnte eine sehr enge therapeutische Breite ein Grund für die niedrigen und wechselhaften Resultate sein.

In der klinischen Anwendung zeigt Ataluren ein geringes Nebenwirkungsprofil und ist oral verfügbar, so dass ein lebenslanger Einsatz durchführbar wäre (Bidou et al. 2012; Welch et al. 2007). Kritisch scheint jedoch die Passage des Medikaments durch die Blut-Hirnschranke zu sein, die eine Voraussetzung für die Therapie der AGU als

neurodegenerative Erkrankung darstellt. Eine Studie am Mausmodell der infantilen neuronalen Ceroidlipofuscinose zeigte, dass erst eine Erhöhung auf das 10-fache der üblicherweise verwendeten Dosis zu einer erfolgreichen Passage durch die Blut-Hirnschranke und zur Erhöhung der Proteinkonzentration des von der *Nonsense*-Variante betroffenen Enzyms führte (Miller et al. 2015). Insgesamt scheint eine Therapie der p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> heterozygoten Patientin mit Ataluren daher nicht sinnvoll.

#### 5.1.5 Wirkung von Amlexanox

Amlexanox wurde in einer Screening-Studie als eine Verbindung identifiziert, die sowohl den NMD hemmt, als auch den vorzeitigen Abbruch der Translation durch ein *Nonsense*-Codon unterdrückt (Gonzalez-Hilarion et al. 2012). Chemisch handelt es sich um eine carboxylierte Säure mit einer einfachen molekularen Struktur (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), welche Ataluren ähnelt. Im Unterschied zu Ataluren beinhaltet Amlexanox allerdings eine bioaktive Chromenopyridin-Gruppe (Loudon 2013). Seit über 20 Jahren ist Amlexanox für die Behandlung von oralen Ulzerationen unter dem Handelsnamen Aphthasol von der FDA zugelassen. In Japan erfolgt der Einsatz von Amlexanox zur Therapie von Asthma bronchiale und Rhinitis allergica.

Bisherige Studien in der Zellkultur beobachteten vielversprechende Ergebnisse: Bei der zystischen Fibrose wurde durch Amlexanox die Synthese vollständiger Proteine induziert, welche die Proteinfunktion zu 20% wiederherstellte (Gonzalez-Hilarion et al. 2012). Eine andere Studie demonstrierte, dass durch den Einsatz von Amlexanox bei Patienten mit Epidermolysis bullosa dystrophica die Expression von vollständigem Kollagen Typ VII durch die Unterdrückung der *Nonsense*-Variante erreicht wurde (Atanasova et al. 2017), wohingegen Ataluren hier scheiterte (McElroy et al. 2013). Banning et al. demonstrierten erstmalig durch Amlexanox einen Therapieansatz für eine AGU-Patientin, die an einer *Nonsense*-Variante leidet. Bei der Behandlung von Patientenfibroblasten der Variante p.W168\* mit Amlexanox konnte die Anwesenheit von AGA-Protein sowie eine erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden (Banning et al. 2018).

In meiner Arbeit zeichnete sich in den transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen zunächst ab, dass eine Steigerung der AGA-Aktivität bei der Variante Q137\* mit Amlexanox gegebenenfalls möglich wäre. Es zeigte sich bei der Behandlung mit 25 µM Amlexanox in stabil transfizierten Zellen eine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität, die im transient transfizierten System allerdings nicht bestätigt wurde. Ebenso wurde keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität bei der Behandlung von Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>

transient ko-transfizierten HEK239T-AGA-KO-Zellen beobachtet. Eine eindeutige, höchst signifikante Steigerung der AGA-Aktivität wurde bei der Behandlung von Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten insbesondere für die Monotherapie mit Amlexanox beobachtet, welche zu einem Anstieg der AGA-Aktivität auf über 30% des Wildtyps führte. Eine Kombination mit den Pharmaka Betain bzw. Koffein konnte die AGA-Aktivität zwar ebenfalls signifikant steigern, allerdings blieben die Werte unter denen der einfachen Therapie mit Amlexanox. Eine Ursache für die Steigerung der AGA-Aktivität konnte in der RT-qPCR-Analyse identifiziert werden: Hier beobachtete ich eine Steigerung der AGA-mRNA der heterozygoten Patientenfibroblasten um 11,5% bezogen auf den Wildtyp, die deskriptiv festzuhalten ist, da sie das Signifikanzniveau nicht erreichte. Auch die Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse zeigen, dass eine Amlexanox-Monotherapie einer Kombination von Betain mit Amlexanox überlegen ist.

Der genaue Wirkmechanismus von Amlexanox ist noch nicht bekannt. In der Therapie der Aphten wird Amlexanox insbesondere durch die Chromenopyridin-Gruppe eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben. Die Chromenopyridin-Gruppe fungiert als Glukokortikoidrezeptormodulator und hemmt die Zytokinproduktion sowohl bei chronischen als auch akuten Entzündungen (Weinstein et al. 2011). Den NMD scheint Amlexanox jedoch durch eine vermehrte Phosphorylierung des UPF-1 zu hemmen (Atanasova et al. 2017). Der geringe Erfolg von Amlexanox in den transfizierten HEK239T-AGA-KO-Zellen im Vergleich zu den Patientenfibroblasten, könnte durch die künstliche Überexpression von AGA im transfizierten System bedingt sein. Durch die Überexpression liegt möglicher Weise zu viel AGA in den Zellen vor, so dass die Proteinfaltung negativ beeinflusst wird. Ebenso könnten die zwei verschiedenen mutierten AGA-Allele in den heterozygoten Patientenfibroblasten durch einen synergistischen Effekt eine Steigerung der AGA-Aktivität begünstigen. So wird durch Amlexanox in den Fibroblasten durch das Allel der Variante Q137\* eine geringe Menge physiologisches Wildtyp-AGA produziert. Die Anwesenheit von Wildtyp-AGA fungiert als Faltungsgerüst im Vorläuferdimer für AGA der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> und führt zu einer stark verbesserten Faltung, wie Banning et al. zeigten (Banning et al. 2016)., und ich in dieser Arbeit bestätigte (Kapitel 4.7.3) Dieser synergistische Effekt in der Prozessierung, welcher in der dimeren Struktur der AGA-Vorläufer begründet liegt, führt zu einer verstärkten Verbesserung der AGA-Aktivität (Banning et al. 2016). In den HEK239T-AGA-KO-Zellen, welche nur mit der Variante Q137\* transfiziert wurden, reicht die geringe Menge des AGAs, welches durch Amlexanox vollständig translatiert wird, nicht aus, um eine Prozessierung oder signifikante Steigerung der AGA-Aktivität zu erreichen.

Für eine langfristige klinische Therapie bei AGU-Patienten ist Amlexanox geeignet, da es oral verfügbar ist, und die Fähigkeit besitzt, die Blut-Hirnschranke zu durchqueren (Torii et al. 1985). Die Elimination erfolgt durch die Nieren bei einer Halbwertszeit von 3,5 Stunden (Bell 2005). Mögliche Nebenwirkungen sind Übelkeit, Bauchschmerzen und allergische Reaktionen (Loudon 2013). Bei allen verwendeten Konzentrationen in bisherigen Studien, welche maximal das fünffache der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration gebrauchten, zeigten sich keine toxischen Nebenwirkungen der behandelten Zellen. Ebenso scheint der natürliche NMD nicht inhibiert zu werden (Gonzalez-Hilarion et al. 2012). Die erreichte Aktivitätssteigerung in den Patientenfibroblasten könnte in der klinischen Praxis ausreichen, um eine deutliche Verbesserung der Symptomatik der Patientin herbeizuführen. Untersuchungen der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> zeigten, dass bereits eine geringe Verbesserung der AGA-Aktivität ausreicht, um die intrazellulären Aspartylglukosamin-Speicher zu leeren und eine weitere Speicherung zu verhindern; unter anderen indem es zu einem interzellulären Austausch zwischen normalen und kranken Zellen kommt (Dunder und Mononen 2001). Untersuchungen anderer lysosomaler Speicherkrankheiten beobachteten ebenfalls, dass selbst eine geringere Aktivität eines lysosomalen Enzyms zu einer Verbesserung der Krankheitssymptome führen kann (Schueler et al. 2004). Dafür spricht ebenfalls, dass Träger der AGU, bei denen nur ein Allel physiologisches AGA kodiert, nicht von Symptomen betroffen sind.

Allerdings steht die klinische Effektivität von *Readthrough*-induzierenden Medikamenten durch Studien jüngerer Zeit in Frage, so dass eine klinische Empfehlung für die Patientin kritisch zu hinterfragen ist. Trotz vielversprechender Zellkulturdaten führte die 10-monatige Gabe von Amlexanox bei der W168\*/S72P heterozygoten AGU-Patientin nicht zu einer Verbesserung der AGA-Aktivität im Serum oder Liquor. Eine klinische Verbesserung der neurodegenerativen Symptomatik wurde ebenfalls nicht beobachtet, wengleich die Patientin von Grund auf eine mildere Symptomatik präsentierte (unveröffentlichte Daten der AG Tikkanen). Diese Beobachtung ist auf Grund der Stichprobengröße nicht aussagekräftig, dennoch scheint sie mit den Ergebnissen von klinischen Studien anderer *Readthrough*-induzierender Medikamente, wie beispielsweise dem Ataluren, übereinzustimmen (Pascual-Morena et al. 2020; Łoboda und Dulak 2020; McDonald et al. 2017).

#### 5.1.5.1 Luciferase-Methode

Ein Ziel meiner Arbeit war es, mit der Luciferase-Methode einen *Readthrough* des *Nonsense*-Codons der Variante p.Q137\* zu überprüfen. Durch Mutagenese wurde ein

Plasmid hergestellt, welches eine Fusion von *AGA*- und *Luciferase*-Gen beinhaltet. Das genaue Konzept des Versuchs wird in Kapitel 4.5 erklärt. Die Ergebnisse des Luciferase-Aktivitätsassays erwiesen sich als schwer interpretierbar, da hohe Werte bei den unbehandelten Proben beobachtet wurden. Diese stehen im Gegensatz zu den anderen Ergebnissen dieser Arbeit, die einen deutlichen Abbruch der Translation durch die *Nonsense*-Mutation erwarten ließen.

Im Western Blot ist in den Proben, welche mit Amlexanox behandelt wurden, die  $\beta$ -Untereinheit zu beobachten, die mit der Luciferase fusioniert ist. Dies deutet auf eine erfolgreiche Prozessierung des Vorläufers durch Amlexanox hin. Zum anderen ist im Western Blot der Grund für die hohen Luciferase-Aktivitäten der unbehandelten Proben zu erkennen: Sowohl in den behandelten als auch unbehandelten Proben wurde unter anderem Luciferase dargestellt, die nicht mit AGA fusioniert ist. Diese freie Luciferase, entsteht vermutlich dadurch, dass ein AUG-Codon, welches nicht das Startcodon von AGA ist, als ein Startcodon verwendet wird. Dieser Mechanismus wird durch das Doppelsignal der reinen Luciferase bei 60 kDa im Western Blot verdeutlicht. Das Startcodon wird physiologischer Weise von der Start-tRNA erkannt, welche bereits vor Anlagerung der mRNA den temporären 43S-Präinitiationskomplex mit dem Initiationsfaktor eIF-2 und GTP sowie der kleinen ribosomalen Untereinheit bildet. Die korrekte Erkennung des Startcodons könnte jedoch durch die artifizielle Konstruktion der Fusion der AGA- und Luciferase-Sequenzen störend beeinflusst sein. Auf der Proteinebene könnte die künstliche Verknüpfung zweier großer Proteine (AGA 42 kDa plus Luciferase 60 kDa) ebenfalls dazu beitragen, dass die Faltung der einzelnen Enzyme gestört wird. Dies könnte weiterhin erklären, warum das AGA im Western Blot nicht mehr ausreichend vom Anti-AGA-Antikörper erkannt wird. Zusammenfassend muss die Methode weiterentwickelt werden. Gelingt dies, kann sie einen Ansatz darstellen, um jede Art von *Nonsense*-Varianten in beliebigen Krankheiten zu untersuchen.

#### 5.1.6 Wirkung von Koffein

Koffein gehört zu den Methylxanthinen, welche eine Modifikation des Purins darstellen. Eine Reihe molekularpharmakologischer Wirkungen werden durch Koffein ausgelöst. In der therapeutischen Dosis ist vor allem die kompetitive antagonistische Wirkung am Adenosinrezeptor relevant. Koffein führt dadurch zur vermehrten Ausschüttung von Acetylcholin und Serotonin. In höheren Dosen führt Koffein ebenfalls zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, zur Hemmung des Katecholaminmetabolismus und

zur Hemmung der 3',5'-cAMP-Phosphodiesterase. In den Zyklus des NMDs greift Koffein durch Hemmung der SMG1 Kinase ein, welche UPF1 phosphoryliert (Wilkinson 2003).

In Fibroblasten eines Patienten, welcher durch eine *Nonsense*-Variante im Kollagen VI  $\alpha 2$  Gen an der kongenitalen Muskeldystrophie Typ Ullrich litt, konnte durch Koffein die Menge der mRNA gesteigert und eine partielle Proteinfunktion wiederhergestellt werden (Usuki et al. 2004). Auch im Mausmodell bei *Nonsense*-Varianten der lysosomalen Speicherkrankheit Mukopolysaccharidose Typ 1 wurde bereits gezeigt, dass Koffein erfolgreich eine Hemmung des NMD herbeiführt (Keeling et al. 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es durch die Behandlung von p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten mit Koffein zu einer höchst signifikanten Steigerung der mRNA-Menge kam, die das Niveau des Wildtyps deutlich überstieg. Die stabilisierte p.Q137\*-AGA-mRNA konnte allerdings nicht, wie in anderen Studien gezeigt, durch spontanen *Readthrough* eine gesteigerte Enzymaktivität bewirken. Allerdings könnten Medikamente, welche ein Überlesen des *Nonsense*-Codons verursachen, durch die vermehrt zur Verfügung stehende p.Q137\*-AGA-mRNA effektiver in Kraft treten. In-vitro-Versuche an Zellen, welche von zystischer Fibrose betroffen waren, wurde beobachtet, dass Koffein die CFTR-mRNA stabilisieren und in Kombination mit Ataluren eine Steigerung der CFTR-Menge hervorrufen kann (Lentini et al. 2019). In meiner Arbeit konnte in p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten die Kombination von Koffein mit Ataluren keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität herbeiführen. In Kombination von Koffein mit Amlexanox wurde eine höchst signifikante Steigerung der AGA-Aktivität beobachtet, die jedoch unter dem Niveau der Monotherapie mit Amlexanox lag, so dass die gesteigerte AGA-Aktivität vermutlich nicht auf das Koffein zurückzuführen ist.

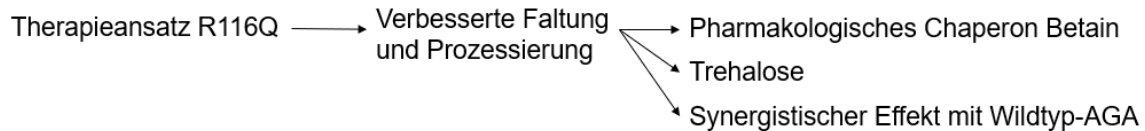
Koffein ist in Deutschland in verschiedenen Anwendungs- und Kombinationsformen zugelassen. Die häufigste Nebenwirkung des Koffeincitrats, welches in der Neonatologie bereits seinen Einsatz zur Behandlung der Frühgeborenenapnoe findet, stellt die Phlebitis an der Infusionsstelle dar. Allerdings kann es auch zu schwerwiegenden Nebenwirkungen durch Koffein kommen: Durch die vermehrte Harnproduktion können Elektrolytstörungen entstehen, es kann zu schwerwiegenden neuropsychiatrischen Symptomen, Herzrhythmusstörungen, sowie schweren Infektionen bis hin zur Sepsis und weiteren Nebenwirkungen kommen. Eine Kombination von Koffein und Amlexanox birgt weiterhin das Risiko von Medikamenteninteraktionen, so dass eine Kombinationstherapie in diesem Fall einer Monotherapie mit Amlexanox unterlegen scheint.

## 5.2 Therapieoptionen für die AGU-Variante p.R116Q

### 5.2.1 Molekulare Auswirkungen der Variante p.R116Q

Bei der Variante c.347G>A; p.R116Q handelt es sich um eine Punktmutation, bei der ein Arginin an der 116. Stelle der Aminosäurekette von einem Glutamin ersetzt wird. Die Variante ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und wurde bei einer heterozygoten finnischen Patientin in Kombination mit AGU<sub>Fin-Major</sub> entdeckt. Die Patientin wurde ebenfalls 2005 geboren und leidet an einem typischen Phänotyp der Erkrankung.

Die ursprüngliche Aminosäure an der 116. Stelle ist Arginin, dessen Seitenkette aus einer Guanidogruppe besteht. Durch diese liegt Arginin im neutralen und sauren Milieu als protonierte, positiv geladene Aminosäure vor, die ionische wie auch hydrophile Wechselwirkungen eingehen kann. Die Seitenkette des Arginins ist zwischen zwei  $\alpha$ -Helices auf der Oberfläche des AGA lokalisiert, so dass es mit den negativ geladenen Glutaminsäuren an Position 58 und 120 Salzbrücken bilden kann (Banning et al. 2016). Ersetzt wird Arginin durch die Aminosäure Glutamin, welche als Carbonsäureamid ungeladen ist und nicht wie Arginin an ionischen Wechselwirkungen teilnimmt, so dass die Salzbrücken verloren gehen. Allerdings ist Glutamin durch die Amid-Gruppe polar und besitzt somit ebenfalls hydrophile Eigenschaften. Diese scheinen jedoch eine fehlerhafte Prozessierung und Faltung des AGA-Vorläufers nicht verhindern zu können, so dass eine höchst signifikante Reduktion der AGA-Aktivität beobachtet wird. Interessanterweise besteht eine geringe Restaktivität von 6,4% im Vergleich zum Wildtyp, die gegen die Negativkontrolle des Leervektors höchst signifikant ist. Die Werte der basalen Aktivität der Variante schwanken, insbesondere im Vergleich zu denen der Variante p.Q137\*. Dies könnte am System der transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen liegen, welche für diese Versuchsreihe verwendet wurden, da in diesem künstlichen System nur wenige physiologische AGA-Moleküle ausreichen, um die Aktivität deutlich zu steigern. Im Western Blot zeigt die Variante p.R116Q ausschließlich den unprozessierten AGA-Vorläufer. Da dieser weniger kräftig als der Vorläufer des Wildtyps erscheint, lässt sich eine Instabilität des mutierten Proteins vermuten. Eine Prozessierung in  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten, die für die Funktion des Proteins notwendig ist, wird im Western Blot nicht nachgewiesen. Abbildung 23 zeigt eine schematische Darstellung der Therapieoptionen, die in dieser Arbeit für die Variante p.R116Q getestet wurden.



**Abbildung 23: Schematische Darstellung der anvisierten Therapieoptionen für p.R116Q.** Bei der *Missense*-Variante p.R116Q wurde der Ansatz verfolgt, durch eine bessere Faltung und Prozessierung der vollständigen Aminosäurekette die Enzymaktivität zu erhöhen. Dies erprobte ich durch den pharmakologischen Chaperon Betain, durch den TEFB-Aktivator Trehalose und durch die Anwesenheit von Wildtyp-AGA.

#### 5.2.1.1 Vergleich der Varianten p.R116Q und p.R116W

Die Variante c.346C>T; p.R116W befindet sich an der gleichen Stelle der Aminosäurekette wie p.R116Q. Sie eignet sich daher zum Vergleich und zur Erforschung der Relevanz der Lokalisation der Variante in der Aminosäurekette bzw. der spezifischen Charakteristika der betreffenden Aminosäure. Die Variante p.R116W wurde erstmalig bei drei türkischen Geschwistern beschrieben, die das typische klinische Bild der AGU mit einem progressiven Verlauf, Sprachverzögerungen und psychomotorischer Behinderung präsentierten (Opladen et al. 2014). Die Variante scheint einen schwerwiegenden Faltungsdefekt zu verursachen, der keine Restaktivität zulässt (Banning et al. 2016). Dieses Ergebnis wurde durch zur Verfügung gestellte Proben in dieser Arbeit bestätigt. Dies stellt einen Unterschied zur Variante p.R116Q dar, welche eine geringe Restaktivität aufzeigt. Anders als bei der Variante p.R116Q, ersetzt bei p.R116W ein Tryptophan das ursprüngliche Arginin. Tryptophan ist eine aromatische, apolare Aminosäure, die durch ihren Indolring stark hydrophobe Eigenschaften besitzt. Durch diesen geht Tryptophan gänzlich andere Wechselwirkungen ein als die ursprüngliche basische, hydrophile Aminosäure Arginin. Wie schon im Falle des Glutamins beschrieben, gehen die Salzbrücken, die Arginin auf Grund seiner positiven Ladung mit den Glutaminsäuren an den Stellen 58 und 120 bildet, verloren (Banning et al. 2016). Ein weiterer Grund für eine fehlerhafte Faltung der Variante p.R116W könnte in der ausladenden, sperrigen Struktur des aromatischen, sehr stabilen Indolrings liegen. Demnach scheinen grundsätzlich neben der Position der Substitution in der Aminosäurekette auch die spezifischen Eigenschaften der Seitenkette der Aminosäuren, die substituiert werden, ausschlaggebend für die Prozessierung und Restaktivität des mutierten AGA-Enzyms zu sein.

### 5.2.1.2 Vergleich der Varianten p.R116Q und AGU<sub>Fin-Major</sub>

AGU<sub>Fin-Major</sub> betrifft jeweils ein Allel der compound heterozygoten Patientinnen, welche die Varianten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> und p.R116Q/AGU<sub>Fin-Major</sub> tragen, und für die in meiner Arbeit Therapieoptionen erforscht werden. Es handelt sich um zwei Punktmutationen, die sich nicht weit von der Variante p.Q137\* im vierten Exon befinden und in Kapitel 1.4.4 bereits näher beschrieben wurden.

In Übereinstimmung mit den Daten der Literatur wurde in den Versuchen meiner Arbeit, parallel zur Variante p.Q137\* und im Gegensatz zu p.R116Q, keine Restaktivität der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> gemessen. Im Western Blot stellt sich lediglich der Vorläufer dar, der im Vergleich zu dem der Variante p.R116Q wie auch dem Wildtyp deutlich stärker erscheint. Dies legt nahe, dass der Vorläufer der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> stabiler ist als der Vorläufer der Variante p.R116Q, so dass er akkumuliert. Im Falle des Wildtyps wird der Vorläufer in die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten prozessiert, welche als kräftige Signale erscheinen. Bezogen auf den akkumulierenden Vorläufer der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> liegt in der Folge beim Wildtyp weniger Vorläufer-Protein vor. Unter dem Laser-Scanning-Mikroskop zeigen die homozygoten AGU<sub>Fin-Major</sub>-Fibroblasten ein ähnliches Bild zu den heterozygoten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Patientenfibroblasten mit vielen, schwer abzugrenzenden Lysosomen, die in großen Ansammlungen akkumulieren.

### 5.2.2 Wirkung von Betain

Pharmakologische Chaperone sind kleine Moleküle, die das Zielprotein binden und seine native Struktur stabilisieren (Boyd et al. 2013; Parenti 2009). Damit helfen sie den veränderten Proteinen, ihre ursprüngliche Funktion zu erfüllen (Arakawa et al. 2006). Da die Variante p.R116Q nicht das aktive Zentrum betrifft, sondern eine fehlerhafte Faltung verursacht, könnte das pharmakologische Chaperon Betain (Trimethyl-Glycin) eine Therapieoption darstellen. Des Weiteren wurde Betain in dieser Arbeit für die heterozygote Variante p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> in Patientenfibroblasten getestet. Im Unterschied zu den anderen für diese Variante getesteten Pharmaka setzt Betain nicht an der *Nonsense*-Variante p.Q137\*, sondern an AGU<sub>Fin-Major</sub> an.

Erste vorklinische und klinische Studien anderer lysosomaler Speicherkrankheiten mit pharmakologischen Chaperonen zeigten positive Ergebnisse (Lenders et al. 2020; Hughes et al. 2017; Khanna et al. 2012). Durch in vitro-Versuche an Fibroblasten wurde Betain als potentes pharmakologisches Chaperon bei AGU-Patienten der Variante T122K und AGU<sub>Fin-Major</sub> identifiziert (Banning et al. 2016). Daraufhin wurde eine klinische Studie über 4 Jahre durchgeführt und im März 2022 abgeschlossen (EudraCT

Nummer: 2017-000645-48). Die Ergebnisse werden aktuell ausgewertet. Bei der Variante p.R116Q wurde sowohl in transient als auch in stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen weder eine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität noch eine Prozessierung des Vorläufers beobachtet. Bei der Behandlung von heterozygoten p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub>-Patientenfibroblasten wurde in der Aktivitätsanalyse sowie der Fluoreszenzmikroskopie ebenfalls keine signifikanten Änderungen beobachtet. Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigten, dass Betain keinen Einfluss auf den NMD nimmt.

Der molekulare Wirkmechanismus des Betains auf die verschiedenen AGA-Varianten ist noch nicht geklärt. Betain könnte sich auf Grund seiner Größe und Kristallstruktur als kleines Molekül im aktiven Zentrum des AGA-Enzyms platzieren (Banning et al. 2016). Bezogen auf die Variante R116Q würde dies bedeuten, dass die Substitution eine Einlagerung des Betains in das aktive Zentrum verhindern. Diese Erklärung erscheint unwahrscheinlich in Anbetracht der Lokalisation des Aminosäurerests in der Position 116, welche sich deutlich außerhalb des aktiven Zentrums auf der Oberfläche des AGAs befindet. Andererseits könnte ein indirekter Wirkmechanismus zur Verbesserung der AGA-Aktivität in den Varianten AGU<sub>Fin-Major</sub> und p.T122K führen (Banning et al. 2016). Dafür spricht, dass Betain eine natürliche Substanz ist, die im menschlichen Körper an multiplen metabolischen Systemen beteiligt ist und beispielsweise als Methylgruppen-Spender fungiert (Craig 2004). In der Leber verhindert Betain als osmolytische, lipotrope Substanz die Ablagerung von Lipiden und schützt darüber hinaus vor oxidativem Stress. Ein indirekter Wirkmechanismus wird auch von Banning et al. auf Grund der mäßigen Funktionssteigerung der Variante T122K favorisiert, die nicht mit der beobachteten Prozessierung des Vorläufers übereinstimmt (Banning et al. 2016).

Betain ist unter dem Handelsnamen Cystadane® in Deutschland zur adjuvanten Therapie bei Homocystinurie bereits zugelassen. Es ist oral verfügbar und in der Lage, die Blut-Hirnschranke zu durchqueren (Parenti et al. 2021). Dennoch ist es zur Behandlung der Varianten p.R116Q und p.Q137\* nicht geeignet. Perspektivisch zeigt die variable Effektivität der Medikamente in unterschiedlichen Varianten, wie wichtig personalisierte Therapieansätze bei der Behandlung von AGU sind.

### 5.2.3 Wirkung von Trehalose

Trehalose ist ein natürliches Disaccharid, welches aus zwei Glukose-Molekülen besteht, die mit einer  $\alpha$ -1,1-glykosidischen Bindung verknüpft sind. Das Disaccharid kommt in einer Vielzahl von Organismen wie Hefen oder Würmern natürlicherweise vor und fungiert als ein natürliches Chaperon, welches den Organismus gegen umweltbedingte

Stressoren schützt (Jain und Roy 2009). Einen Einfluss auf die Lysosomen scheint Trehalose direkt durch Akkumulation und Veränderung des lysosomalen pH-Wertes, als auch indirekt durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktor EB (TFEB) zu nehmen (Lotfi et al. 2018; Rusmini et al. 2019; Jeong et al. 2021). TFEB ist ein zentraler Regulator verschiedener lysosomaler Signalwege, der die Biogenetik, Autophagozytose, lysosomale Exozytose und Proteostase maßgeblich beeinflusst (Song et al. 2013; Sardiello et al. 2009; Settembre et al. 2011).

Durch die Behandlung mit Trehalose konnte im Mausmodell die retinale Degeneration, neuronale Inflammation und lysosomale Speicherung bei Mukopolysaccharidose Typ 3 reduziert werden (Lotfi et al. 2018). Die Mukopolysaccharidose ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die ebenfalls durch die mangelnde Aktivität einer lysosomalen Hydrolase ausgelöst wird. Meine Daten der Behandlung von p.R116Q transient transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen zeigten keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität durch Trehalose. Im stabil transfizierten System wurde allerdings durch die Behandlung mit Trehalose eine Prozessierung des Vorläufers beobachtet. Da das Signal der  $\alpha$ -Untereinheit nur schwach erscheint, ist von einer geringeren Prozessierung auszugehen. Die Aktivitätsanalyse bestätigte den Effekt der Trehalose durch eine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Probe.

Da die Expression von AGA nicht direkt durch TFEB beeinflusst wird, liegt vermutlich ein indirekter Mechanismus zu Grunde, der die AGA-Prozessierung und Aktivität positiv beeinflusst. Wie vorherige Studien zeigten, kann eine Verbesserung der metabolischen, osmotischen Situation der Lysosomen zu einer verbesserten AGA-Prozessierung und Aktivität führen (Banning et al. 2016). Dies scheint bei der Behandlung der Variante p.R116Q mit Trehalose ebenfalls der Fall zu sein. In der klinischen Anwendung wäre Trehalose für die Therapie von AGU-Patienten geeignet, da es weder eine toxische noch reduzierende Wirkung besitzt und nebenwirkungsarm ist. Auf dem deutschen Markt ist Trehalose bereits als Augentropfen bei Keratitis sowie als Hautcreme zugelassen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Trehalose in Mäusen bei oraler Gabe ins ZNS gelangt, und die Blut-Hirn-Schranke demnach problemlos zu passieren scheint (Tanaka et al. 2004). Da die Ergebnisse nur eine moderate Aktivitätssteigerung beobachten lassen, ist eine Therapie für AGU-Patienten der Variante p.R116Q individuell zu erwägen. In der personalisierten Medizin sollte Trehalose für andere Varianten der AGU allerdings ebenfalls erforscht werden, da es einen Einfluss auf die AGA-Aktivität nimmt.

#### 5.2.4 Synergistischer Effekt auf p.R116Q durch Koexpression mit Wildtyp-AGA

In dieser Arbeit bin ich der Frage nachgegangen, ob es bei p.R116Q zu einem synergistischen Effekt in der Prozessierung durch die Anwesenheit von physiologischem AGA in der tetrameren Struktur kommt. Für die Varianten p.T112K und AGU<sub>Fin-Major</sub> wurde ein solcher Effekt bereits nachgewiesen, während im Fall der Variante p.R116W, vermutlich auf Grund des schwerwiegenden Faltungsdefekt, dieser nicht beobachtet wurde (Banning et al. 2016).

Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigen im Western Blot die Prozessierung der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> in der Anwesenheit von Wildtyp-AGA. Die Variante p.R116Q weist ebenfalls die  $\beta$ -Untereinheit auf, obgleich in schwächerer Intensität. Dies deutet daraufhin, dass Wildtyp-AGA im Vorläuferdimer dem p.R116Q-Vorläufer als Faltungsgerüst dient, so dass dieser stabilisiert wird und eine korrekte Prozessierung in die Untereinheiten erfolgt. Wird beispielsweise durch eine pharmakologische Therapie eine geringe Menge physiologisches AGA-Protein produziert, könnte durch den synergistischen Effekt eine deutliche Verbesserung der AGA-Aktivität und der klinischen Symptomatik erreicht werden. Bei der Variante AGU<sub>Fin-Major</sub> wurde gezeigt, dass es zu einem interzellulären Austausch zwischen kranken und gesunden Zellen kommt, der diesen Effekt weiter verstärken könnte (Dunder und Mononen 2001). Der beschriebene synergistische Effekt auf die Prozessierung durch die Dimerisierung unterschiedlicher Vorläuferproteine könnte weiterhin erklären, warum in einigen Fällen klinisch mildere Verläufe bei compound heterozygoten im Vergleich zu homozygoten Patienten beobachtet wurden (Banning et al. 2018; Banning et al. 2017). Die Vorläufer, die an unterschiedlichen Positionen verändert sind, können sich gegenseitig als Gerüst dienen, so dass eine Prozessierung erleichtert wird.

Die Ko-Transfektion von p.R116Q mit Wildtyp in HEK293T-AGA-KO-Zellen, stellt in gewissem Maße die Gentherapie nach, bei der AGA-DNA durch virale Vektoren in die Zellen gebracht wird. In der klinischen Praxis könnte durch den gezeigten synergistischen Effekt der Variante p.R116Q die Gentherapie vereinfacht werden, da schon eine geringere Effektivität oder eine geringere Menge an applizierten Vektoren zu einer verbesserten AGA-Aktivität führen könnte. Einen positiven Einfluss des synergistischen Effekts auf die Enzymersatztherapie ist unwahrscheinlich, da ich durch die Transfektion AGA-DNA in die Zellen gebracht habe, wohingegen bei der Enzymersatztherapie rekombinantes Enzym verabreicht wird. Das fertig gefaltete, dimerisierte und aktive Protein kann während der Faltung nicht mehr als Gerüst dienen, sodass hier kein positiver Effekt zu vermuten ist.

### 5.3 Ausblick

Die Aspartylglukosaminurie (AGU) ist eine seltene Erbkrankheit, bei der es zur Ablagerung von Glykoasparaginen in den Lysosomen kommt. Auf Grund eines Gründereffektes in Finnland ist die vorherrschende, krankheitsauslösende Variante AGU<sub>Fin-Major</sub>. Da immer mehr Fälle außerhalb von Finnland bekannt werden, ist die AGU vermutlich weltweit unterdiagnostiziert (Arvio und Mononen 2016). Zukünftig könnte durch eine vermehrte Nutzung der einfachen Screeningmethode der Bestimmung der Oligosaccharide im Urin eine vermehrte Diagnostizierung betroffener Patienten erfolgen. Ebenfalls könnten die charakteristischen Bilder der Schädel-MRTs in der klinischen Praxis zu einer vermehrten Aufmerksamkeit beitragen (Tokola et al. 2019; Sairanen et al. 2020).

Die Relevanz der personalisierten Medizin ist in meiner Arbeit an verschiedenen Punkten zum Ausdruck gekommen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass der pharmakologische Chaperon Betain, welcher eine deutliche AGA-Aktivitätssteigerung bei den AGU-Varianten AGU<sub>Fin-Major</sub> und T122K gezeigt hatte (Banning et al. 2016), keinen signifikanten Effekt auf die Variante p.R116Q hat. Auch scheint die Wirkung von *Readthrough*-induzierenden Medikamenten von weiteren Faktoren wie der dem *Nonsense*-Codon umliegenden Sequenz abhängig zu sein, so dass Medikamente auf verschiedene Varianten einer Erkrankung unterschiedlich viel Erfolg zeigen. Zukünftig sollte daher die personalisierte Medizin verstärkt eingesetzt werden, insbesondere wenn Medikamente mit einem starken Nebenwirkungsprofil in Betracht gezogen werden.

Die Variante p.R116Q wurde in meiner Arbeit als pathogene Variante bestätigt. In der Zellkultur könnte weiterhin p.R116Q anhand von Fibroblasten untersucht werden. Beispielsweise könnte mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen die Lokalisation des p.R116Q-AGAs identifiziert werden. In dieser Arbeit zeigte ich, dass die Anwesenheit von Wildtyp-AGA die Prozessierung des p.R116Q-Vorläufers induzieren kann. Die Vermutung, dass eine Gentherapie bei dieser Variante daher besonders erfolgreich sein könnte, könnte in Zukunft weitergehen erforscht werden. Ebenso könnten andere heterozygote Varianten auf einen synergistischen Effekt in der Prozessierung durch die Anwesenheit von Wildtyp-AGA untersucht werden.

Die Variante p.Q137\* wurde in dieser Arbeit umfassend charakterisiert und es wurden spezifische Ansatzpunkte für eine pharmakologische Therapie identifiziert. Das Medikament Amlexanox wurde in der Zellkultur als mögliche Therapieoption für die heterozygote p.Q137\*/AGU<sub>Fin-Major</sub> Patientin identifiziert. Allerdings ist in Anbetracht des

mäßigen klinischen Erfolges von *Readthrough*-induzierenden Medikamenten in jüngerer Vergangenheit eine Empfehlung für den klinischen Einsatz von Amlexanox kritisch zu hinterfragen. Aktuell laufen nur vereinzelt Studien, die den medikamentös-induzierten *Readthrough* weiter untersuchen. Bei den verwendeten Substanzen handelt es sich um die bereits bekannten Aminoglykoside und Ataluren. Eine derzeit laufende randomisierte, doppelt-verblindete, placebokontrollierte Langzeitstudie (NCT03179631), die im September 2023 beendet sein wird, könnte neue Daten zur Effektivität von Ataluren in der Muskeldystrophie Duchenne im klinischen Setting darlegen. Eine Überprüfung der Effektivität von Amlexanox im klinischen Setting bei der AGU wäre sehr interessant, da es in dieser und vorherigen Arbeiten *in vitro* dem Ataluren überlegen schien (Banning et al. 2018; McElroy et al. 2013). Zukünftig könnte weiterhin der molekulare Wirkmechanismus von Amlexanox erforscht werden, um mit einem besseren Verständnis des Medikaments mögliche Verbesserungen in der Therapie vornehmen zu können, beispielsweise in Form von Kombination mit anderen Substanzen. Ebenso wäre die Erforschung neuer *Readthrough*-induzierender Substanzen höchstinteressant, da die Aminoglykoside die Toxizität als zentrales Problem aufweisen, während das Ataluren den NMD nicht hemmt.

Für AGU-Patienten besteht außerdem eine neue Option: Sie sind gute Kandidaten für die Gentherapie. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zahlreiche auf viralen Vektoren basierende Gentherapieansätze für verschiedene seltene Erbkrankheiten getestet und unter anderem im Bereich der AGU vielversprechende Ergebnisse produziert (Naldini 2015; Sands und Davidson 2006; Chen et al. 2021; Saraiva et al. 2016). Trotz der aussichtsreichen Ergebnisse der Gentherapie, bestehen weiterhin Herausforderungen, die eine weitere Erforschung voraussetzen. Beispielsweise muss zur langfristigen Therapie entweder eine anhaltende Expression des therapeutischen Enzyms gewährleistet sein oder eine erneute Administration erfolgen, die allerdings durch die humorale Immunantwort in der Effektivität vermindert sein könnte (Zaiss und Muruve 2005; Peden et al. 2004; Parenti et al. 2021). Insbesondere AGU-Patienten, die aktuell und in naher Zukunft behandlungsbedürftig sind oder auf Grund von Kontraindikationen nicht von einer Gentherapie profitieren können, sind jedoch auf alternative Optionen angewiesen. Die simple klinische Handhabung einer Therapie, die auf pharmakologisch induziertem *Readthrough* beruht, stellt weiterhin einen großen Vorteil gegenüber der Enzymersatz- oder Gentherapie dar. Insgesamt ist der Bedarf einer pharmakologischen Therapie weiterhin groß, auch wenn mehr experimentelle und klinische Forschung erforderlich ist.

## 6 Summary

Aspartylglucosaminuria (AGU) is an inherited lysosomal storage disorder caused by a loss of function of the enzyme aspartylglucosaminidase (AGA). Epidemiologically, a high prevalence is observed in Finland. Approximately 300 AGU patients are known worldwide. The systemic disease shows a broad spectrum of symptoms and leads to a reduction of life expectancy. The leading symptom is a progressive mental retardation. If clinically suspected, screening is feasible by determining oligosaccharides in the urine. The disease is confirmed by genome- or exome- sequencing. A curative therapy is currently not available.

The AGA enzyme participates in the degradation of glycoproteins, which takes place in lysosomes. It hydrolyses the N-glycosidic bond of aspartylglucosamines. As all N-terminal nucleophilic hydrolases, AGA is synthesised as a precursor. After dimerization of two precursor peptides, they are autocatalytically cleaved into pro- $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits. This step also activates the enzyme. In the acidic compartment, the subunits are further processed at the C-terminal end. The reorganisation of the AGA subunits results in a heterotetrameric  $\alpha\beta\beta\alpha$ -sandwich structure.

In this work, patient fibroblasts and overexpression in HEK293T-AGA-knockout cells were used to characterise the consequences of the nonsense variant c.409 C>T; p.Q137\* as well as the missense variant c.347G>A; p.R116Q. None of the variants have been described in the literature so far. AGA activity assay, Western blot, and immunofluorescence staining confirmed the variants as pathogenic.

Subsequently, my objective was to test therapeutic options for both variants in cell culture models. For the nonsense variant p.Q137\*, the aim was to pharmacologically induce a readthrough of the nonsense codon as well as to inhibit the nonsense-mediated mRNA decay. This goal was reached with the substance Amlexanox in patient fibroblasts, leading to an increase of AGA activity. However, a clinical recommendation should be critically questioned due to the moderate success in recent studies on the clinical effectiveness of readthrough-inducing drugs in other diseases.

The challenge of the missense variant p.R116Q was the defective processing and folding of the AGA protein. The pharmacological chaperone betaine and the TFEB activator trehalose failed to correct these. However, processing of p.R116Q-AGA was shown in the presence of wildtype-AGA.

## 7 Zusammenfassung

Aspartylglukosaminurie (AGU) ist eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die durch einen Funktionsverlust der Aspartylglukosaminidase (AGA) ausgelöst wird. Epidemiologisch ist eine hohe Prävalenz in Finnland zu beobachten. Weltweit sind etwa 300 AGU-Patienten bekannt. Die systemische Erkrankung besitzt ein breites Spektrum an Symptomen. Das Leitsymptom ist eine progressive geistige Behinderung. Durch die Genom- oder Exon-Sequenzierung wird die Diagnose der Erkrankung bestätigt. Eine kurative Therapie ist derzeit nicht verfügbar.

AGA ist am Abbau von Glykoproteinen in Lysosomen beteiligt, indem es die N-glykosidische Bindung der Aspartylglukosamine durch Hydrolyse spaltet. Wie alle N-terminalen nukleophilen Hydrolasen wird AGA im ER als Vorläufer synthetisiert. Nach der Dimerisierung der Vorläuferpeptide erfolgt die autokatalytische Spaltung in pro- $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, und das Enzym wird aktiviert. Die Reorganisation der AGA-Untereinheiten ergibt eine heterotetramere  $\alpha\beta\alpha$ -Sandwichstruktur.

In dieser Arbeit wurden Patientenfibroblasten und Überexpression in HEK293T-AGA-Knockout-Zellen genutzt, um zunächst die Folgen der Nonsense-Variante c.409 C>T; p.Q137\* sowie der Missense-Variante c.347G>A; p.Q137\* zu charakterisieren. Beide Varianten sind bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Mit Hilfe von AGA-Aktivitätsmessungen, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Varianten als pathologisch bestätigt.

Mein Ziel war es, anschließend für beide Varianten Therapieoptionen in Zellkulturmodellen zu testen. Für die *Nonsense*-Variante p.Q137\* sollte pharmakologisch ein *Readthrough* des *Nonsense*-Codons induziert, sowie der *Nonsense*-vermittelte mRNA-Abbau gehemmt werden. Die Substanz Amlexanox erreichte dies in Patientenfibroblasten und führte zur Steigerung der AGA-Aktivität. Allerdings sollte eine klinische Empfehlung auf Grund des mäßigen Erfolgs in aktuellen Studien bei anderen Erkrankungen zur klinischen Effektivität von *Readthrough*-induzierenden Medikamenten kritisch hinterfragt werden.

Die Herausforderung der Missense-Variante p.R116Q stellte die fehlerhafte Prozessierung und Faltung des AGA-Proteins dar. Durch das pharmakologische Chaperon Betain und den TFEB-Aktivator Trehalose konnten diese nicht korrigiert werden. Allerdings wurde eine Prozessierung von p.R116Q-AGA in Gegenwart von Wildtyp-AGA gezeigt.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AGA	Aspartylglukosaminidase
AGU	Aspartylglukosaminurie
AGU <sub>Fin-Major</sub>	Doppel-Variante c.482G>A + 488G>C; p.R161Q + C163S
APS	Ammoniumpersulfat
AAV	Adeno- assoziiertes Virus
Ax	Amlexanox
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
eEF	eukaryotischer Elongationsfaktor
eIF	eukaryotische Initiationsfaktor
EJC	Exon Junction Komplex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eRF	eukaryotischer Releasing-Faktor
Ex	Exon
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Amerikanische Food and Drug Administration
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure

mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NMD	<i>Nonsense</i> -vermittelte mRNA-Abbau
PABPC	Polyadenylate bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Para-Formaldehyd
RT-qPCR	Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SP	Signalpeptid
SMG	Serin/Threonin Protein Kinase
TBST	Tris-Buffered-Saline & Tween
TEMED	N'-Tetramethylethylendiamin
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TPP	Tripeptidyl-Peptidase
tRNA	transfer-RNA
UE	Untereinheiten
UK	Vereinigtes Königreich
UPF	Up-frameshift Protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildung 1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen einer lysosomalen Speicherkrankheit, modifiziert nach Parenti et al. 2021.....	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prozessierung von Oligosacchariden.....	7
Abbildung 3: Proteolytische Spaltung des Vorläufers in die Untereinheiten, modifiziert nach Banning et al. 2018.....	9
Abbildung 4: Darstellung der krankheitsauslösenden AGA-Varianten AGU <sub>Fin-Major</sub> und AGU <sub>Fin-Minor</sub> sowie der in dieser Arbeit untersuchten Varianten c.347G>A; p.R116Q und c.409C>T; p.Q137*.....	11
Abbildung 5: Lysosomale Abnormalitäten in AGU <sub>Fin-Major</sub> und p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten.....	42
Abbildung 6: Lysosomale AGA-Lokalisation in p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> Patientenfibroblasten.....	43
Abbildung 7: Verminderte relative Menge an AGA-mRNA in p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> Fibroblasten. ....	44
Abbildung 8: Keine AGA-Restaktivität in AGU <sub>Fin-Major</sub> (Fin)- und p.Q137*- transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen.....	45
Abbildung 9: Keine Synthese oder Prozessierung des AGA-Vorläufers in p.Q137* transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen im Western Blot, sowie keine signifikante Steigerung der AGA-Aktivität in durch die Behandlung mit Amlexanox.....	47
Abbildung 10: Keine Prozessierung von AGA-Protein oder Steigerung der AGA-Aktivität in p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> ko-transfizierten Zellen durch die Behandlung mit Amlexanox .....	49
Abbildung 11 A: Keine Synthese oder Prozessierung des AGA-Vorläufers in p.Q137* stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen im Western Blot. B: Steigerung der AGA-Aktivität in p.Q137* durch die Behandlung mit Amlexanox im Aktivitätsassay. ....	51
Abbildung 12: Veränderungen der AGA-Aktivität in p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> (Fin) Fibroblasten durch verschiedene Pharmaka.....	52
Abbildung 13: Veränderungen der AGA-Aktivität in p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> (Fin) Fibroblasten durch Kombinationstherapie mit verschiedenen Pharmaka. ....	54
Abbildung 14: Änderung der relativen Menge an AGA-mRNA in p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> (Fin)-Fibroblasten durch die Behandlung mit Amlexanox und Koffein.....	55
Abbildung 15: Keine Änderung der abnormalen Morphologie von p.Q137*/AGU <sub>Fin-Major</sub> Fibroblasten durch die Behandlung mit Amlexanox und Betain. ....	57
Abbildung 16 A: Keine signifikante Steigerung der Luciferase-Aktivität durch die Behandlung mit Amlexanox. B: Gesteigerte Synthese der AGA-β-Untereinheit durch Amlexanox in der Darstellung der AGA-Luciferase-Fusion im Western Blot. ....	59
Abbildung 17: Höchst signifikante Reduktion der AGA-Aktivität, mit geringer Restaktivität der Variante p.R116Q im Unterschied zu p.R116W in transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen. ....	61
Abbildung 18: Keine Prozessierung des AGA-Vorläufers in p.R116Q transfizierten Zellen im Western Blot.....	62
Abbildung 19: Keine signifikante Steigerung der AGA-Restaktivität in p.R116Q transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen durch Betain bzw. Trehalose. ....	63

Abbildung 20: Prozessierung der  $\alpha$ -Untereinheit und signifikante Steigerung der AGA-Aktivität in p.R116Q stabil transfizierten HEK293T-AGA-KO-Zellen durch die Behandlung mit Trehalose..... 64

Abbildung 21: Prozessierung des Vorläufers in p.R116Q und AGU<sub>Fin-Major</sub> (Fin) transfizierten Zellen in Anwesenheit des Wildtyps. .... 66

Abbildung 22: Schematische Darstellung der anvisierten Therapieoptionen für p.Q137\*. .... 70

Abbildung 23: Schematische Darstellung der anvisierten Therapieoptionen für p.R116Q. .... 80

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufführung der verwendeten Materialien und Geräte. ....	15
Tabelle 2: Aufführung der zu Therapieversuchen in der Zellkultur verwendeten Medikamente, sowie deren Endkonzentrationen. ....	17
Tabelle 3: Aufführung der verwendeten Lösungen und Chemikalien. ....	18
Tabelle 4: Aufführung der verwendeten hergestellten Lösungen und Puffer, sowie deren Zusammensetzung. ....	21
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper. ....	25
Tabelle 6: Aufführung der verwendeten Sekundärantikörper. ....	26
Tabelle 7: Aufführung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. ....	26
Tabelle 8: Aufführung der zur Mutagenese verwendeten Primer, sowie deren Sequenzen. ....	27
Tabelle 9: Aufführung der zur qPCR verwendeten Primer, deren Sequenz, Lokalisation, sowie der Produktgröße in Basenpaaren. ....	27
Tabelle 10: Aufführung der verwendeten Plasmide. ....	28
Tabelle 11: Aufführung der angewandten Enzyme. ....	28
Tabelle 12: Aufführung der angewandten Zellen. ....	29

## 11 Literaturverzeichnis

Ambrosetto, G.; Santucci, M. (2009): Sleep-related hypermotor seizures in aspartylglucosaminuria: a case report. In: *Epilepsia* 50 (6), S. 1638–1640. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01991.x.

Arakawa, T.; Ejima, D.; Kita, Y.; Tsumoto, K. (2006): Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. In: *Biochimica et biophysica acta* 1764 (11), S. 1677–1687. DOI: 10.1016/j.bbapap.2006.08.012.

Aronson, N.N. (1999): Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1455 (2-3), S. 139–154. DOI: 10.1016/S0925-4439(99)00076-9.

Arvio, M.; Arvio, P.; Hurmerinta, K.; Pirinen, S.; Sillanpää, M. (2005): Reduction in head size in patients with aspartylglucosaminuria. In: *Acta neurologica Scandinavica* 112 (5), S. 335–337. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2005.00492.x.

Arvio, M.; Autio, S.; Louhiala, P. (1993a): Early clinical symptoms and incidence of aspartylglucosaminuria in Finland. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 82 (6-7), S. 587–589. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1993.tb12761.x.

Arvio, M.; Mononen, I. (2016): Aspartylglycosaminuria: a review. In: *Orphanet journal of rare diseases* 11 (1), S. 162. DOI: 10.1186/s13023-016-0544-6.

Arvio, M.; Oksanen, V.; Autio, S.; Gaily, E.; Sainio, K. (1993b): Epileptic seizures in aspartylglucosaminuria: a common disorder. In: *Acta neurologica Scandinavica* 87 (5), S. 342–344. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1993.tb04114.x.

Arvio, M.; Sauna-Aho, O.; Peippo, M. (2001): Bone marrow transplantation for aspartylglucosaminuria: follow-up study of transplanted and non-transplanted patients. In: *The Journal of pediatrics* 138 (2), S. 288–290. DOI: 10.1067/mpd.2001.110119.

Arvio, M.A.; Rapola, J.M.; Pelkonen, P.M. (1998a): Chronic arthritis in patients with aspartylglucosaminuria. In: *The Journal of rheumatology* 25 (6), S. 1131–1134.

Arvio, P.; Arvio, M. (2002): Progressive nature of aspartylglucosaminuria. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 91 (3), S. 255–257. DOI: 10.1080/08035250252833842.

Arvio, P.; Arvio, M.; Marttinen, E.; Sipilä, I.; Pirinen, S. (1999): Excessive infantile growth and early pubertal growth spurt: Typical features in patients with aspartylglycosaminuria. In: *The Journal of pediatrics* 134 (6), S. 761–763. DOI: 10.1016/s0022-3476(99)70294-5.

Arvio, P.; Arvio, M.; Wolf, J.; Lukinmaa, P.; Saxen, L.; Pirinen, S. (1998b): Impaired oral health in patients with aspartylglucosaminuria. In: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 86 (5), S. 562–568. DOI: 10.1016/S1079-2104(98)90346-8.

Atanasova, V.S.; Jiang, Q.; Prisco, M.; Gruber, C.; Piñón Hofbauer, J.; Chen, M. et al. (2017): Amlexanox Enhances Premature Termination Codon Read-Through in COL7A1 and Expression of Full Length Type VII Collagen: Potential Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. In: *The Journal of investigative dermatology* 137 (9), S. 1842–1849. DOI: 10.1016/j.jid.2017.05.011.

- Aula, P.; Mattila, K.; Piironen, O.; Ammälä, P.; Koskull, H. von (1989): First-trimester prenatal diagnosis of aspartylglucosaminuria. In: *Prenatal diagnosis* 9 (9), S. 617–620. DOI: 10.1002/pd.1970090904.
- Aula, P.; Rapola, J.; Koskull, H. von; Ammälä, P. (1984): Prenatal diagnosis and fetal pathology of aspartylglucosaminuria. In: *American journal of medical genetics* 19 (2), S. 359–367. DOI: 10.1002/ajmg.1320190218.
- Baker, K.E.; Parker, R. (2004): Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. In: *Current opinion in cell biology* 16 (3), S. 293–299. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.03.003.
- Banning, A.; Gülec, C.; Rouvinen, J.; Gray, S.J.; Tikkanen, R. (2016): Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. In: *Scientific reports* 6, S. 37583. DOI: 10.1038/srep37583.
- Banning, A.; König, J.F.; Gray, S.J.; Tikkanen, R. (2017): Functional Analysis of the Ser149/Thr149 Variants of Human Aspartylglucosaminidase and Optimization of the Coding Sequence for Protein Production. In: *IJMS* 18 (4), S. 706. DOI: 10.3390/ijms18040706.
- Banning, A.; Schiff, M.; Tikkanen, R. (2018): Amlexanox provides a potential therapy for nonsense mutations in the lysosomal storage disorder Aspartylglucosaminuria. In: *Biochimica et biophysica acta* 1864 (3), S. 668–675. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.12.014.
- Bar-Nun, S.; Shneyour, Y.; Beckmann, J.S. (1983): G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 741 (1), S. 123–127. DOI: 10.1016/0167-4781(83)90018-0.
- Barton-Davis, E.R.; Cordier, L.; Shoturma, D.I.; Leland, S.E.; Sweeney, H.L. (1999): Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. In: *Journal of Clinical Investigation* 104 (4), S. 375–381. DOI: 10.1172/JCI17866.
- Bedwell, D.M.; Kaenjak, A.; Benos, D.J.; Bebok, Z.; Bubien, J.K.; Hong, J. et al. (1997): Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. In: *Nature medicine* 3 (11), S. 1280–1284. DOI: 10.1038/nm1197-1280.
- Bell, J. (2005): Amlexanox for the treatment of recurrent aphthous ulcers. In: *Clinical drug investigation* 25 (9), S. 555–566. DOI: 10.2165/00044011-200525090-00001.
- Bidou, L.; Allamand, V.; Rousset, J.-P.; Namy, O. (2012): Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. In: *Trends in molecular medicine* 18 (11), S. 679–688. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.09.008.
- Bidou, L.; Hatin, I.; Perez, N.; Allamand, V.; Panthier, J.-J.; Rousset, J.-P. (2004): Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. In: *Gene therapy* 11 (7), S. 619–627. DOI: 10.1038/sj.gt.3302211.
- Boyd, R.E.; Lee, G.; Rybczynski, P.; Benjamin, E.R.; Khanna, R.; Wustman, B.A.; Valenzano, K.J. (2013): Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. In: *Journal of medicinal chemistry* 56 (7), S. 2705–2725. DOI: 10.1021/jm301557k.
- Brannigan, J.A.; Dodson, G.; Duggleby, H.J.; Moody, P.C.; Smith, J.L.; Tomchick, D.R.; Murzin, A.G. (1995): A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. In: *Nature* 378 (6555), S. 416–419. DOI: 10.1038/378416a0.

- Chang, Y.-F.; Imam, J.S.; Wilkinson, M.F. (2007): The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. In: *Annual review of biochemistry* 76, S. 51–74. DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.050106.093909.
- Chen, X.; Snanoudj-Verber, S.; Pollard, L.; Hu, Y.; Cathey, S.S.; Tikkanen, R.; Gray, S.J. (2021): Pre-clinical Gene Therapy with AAV9/AGA in Aspartylglucosaminuria Mice Provides Evidence for Clinical Translation. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 29 (3), S. 989–1000. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.012.
- Choudhury, S.R.; Hudry, E.; Maguire, C.A.; Sena-Esteves, M.; Breakefield, X.O.; Grandi, P. (2017): Viral vectors for therapy of neurologic diseases. In: *Neuropharmacology* 120, S. 63–80. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.013.
- Craig, S.A.S. (2004): Betaine in human nutrition. In: *The American journal of clinical nutrition* 80 (3), S. 539–549. DOI: 10.1093/ajcn/80.3.539.
- Denning, G.; Jamieson, L.; Maquat, L.E.; Thompson, E.A.; Fields, A.P. (2001): Cloning of a novel phosphatidylinositol kinase-related kinase: characterization of the human SMG-1 RNA surveillance protein. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (25), S. 22709–22714. DOI: 10.1074/jbc.C100144200.
- Donsante, A.; Vogler, C.; Muzyczka, N.; Crawford, J.M.; Barker, J.; Flotte, T. et al. (2001): Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. In: *Gene therapy* 8 (17), S. 1343–1346. DOI: 10.1038/sj.gt.3301541.
- Drake, K.M.; Dunmore, B.J.; McNelly, L.N.; Morrell, N.W.; Aldred, M.A. (2013): Correction of nonsense BMPR2 and SMAD9 mutations by ataluren in pulmonary arterial hypertension. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49 (3), S. 403–409. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0100OC.
- Dranchak, P.K.; Di Pietro, E.; Snowden, A.; Oesch, N.; Braverman, N.E.; Steinberg, S.J.; Hacia, J.G. (2011): Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. In: *Journal of cellular biochemistry* 112 (5), S. 1250–1258. DOI: 10.1002/jcb.22979.
- Dreyfuss, G.; Kim, V.N.; Kataoka, N. (2002): Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (3), S. 195–205. DOI: 10.1038/nrm760.
- Du, M.; Jones, J.R.; Lanier, J.; Keeling, K.M.; Lindsey, J.R.; Tousson, A. et al. (2002): Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a Cfr<sup>-/-</sup> mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 80 (9), S. 595–604. DOI: 10.1007/s00109-002-0363-1.
- Du, M.; Keeling, K.M.; Fan, L.; Liu, X.; Bedwell, D.M. (2009): Poly-L-aspartic acid enhances and prolongs gentamicin-mediated suppression of the CFTR-G542X mutation in a cystic fibrosis mouse model. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (11), S. 6885–6892. DOI: 10.1074/jbc.M806728200.
- Dunder, U.; Kaartinen, V.; Valtonen, P.; Väänänen, E.; Kosma, V.M.; Heisterkamp, N. et al. (2000): Enzyme replacement therapy in a mouse model of aspartylglycosaminuria. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (2), S. 361–367. DOI: 10.1096/fasebj.14.2.361.
- Dunder, U.; Mononen, I. (2001): Human leukocyte glycosylasparaginase: cell-to-cell transfer and properties in correction of aspartylglycosaminuria. In: *FEBS letters* 499 (1-2), S. 77–81. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02526-1.

- Dunder, U.; Valtonen, P.; Kelo, E.; Mononen, I. (2010): Early initiation of enzyme replacement therapy improves metabolic correction in the brain tissue of aspartylglycosaminuria mice. In: *Journal of inherited metabolic disease* 33 (5), S. 611–617. DOI: 10.1007/s10545-010-9158-7.
- Enomaa, N.; Danos, O.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1995): Correction of deficient enzyme activity in a lysosomal storage disease, aspartylglucosaminuria, by enzyme replacement and retroviral gene transfer. In: *Human gene therapy* 6 (6), S. 723–731. DOI: 10.1089/hum.1995.6.6-723.
- Fisher, K.J.; Aronson, N.N. (1991): Characterization of the mutation responsible for aspartylglucosaminuria in three Finnish patients. Amino acid substitution Cys163----Ser abolishes the activity of lysosomal glycosylasparaginase and its conversion into subunits. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (18), S. 12105–12113.
- Floquet, C.; Hatin, I.; Rousset, J.-P.; Bidou, L. (2012): Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin. In: *PLoS genetics* 8 (3), e1002608. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002608.
- Frischmeyer, P.A.; Dietz, H.C. (1999): Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. In: *Human molecular genetics* 8 (10), S. 1893–1900. DOI: 10.1093/hmg/8.10.1893.
- Gonzalez-Hilarion, S.; Beghyn, T.; Jia, J.; Debreuck, N.; Berte, G.; Mamchaoui, K. et al. (2012): Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. In: *Orphanet journal of rare diseases* 7, S. 58. DOI: 10.1186/1750-1172-7-58.
- Goodspeed, K.; Feng, C.; Laine, M.; Lund, T.C. (2021): Aspartylglucosaminuria: Clinical Presentation and Potential Therapies. In: *Journal of child neurology* 36 (5), S. 403–414. DOI: 10.1177/0883073820980904.
- Grön, K.; Aula, P.; Peltonen, L. (1990): Linkage of aspartylglucosaminuria (AGU) to marker loci on the long arm of chromosome 4. In: *Human Genetics* 85 (2), S. 233–236. DOI: 10.1007/BF00193202.
- Hamer, I.; van Beersel, G.; Arnould, T.; Jadot, M. (2012): Lipids and Lysosomes. In: *CDM* 13 (10), S. 1371–1387. DOI: 10.2174/138920012803762684.
- Harjunen, E.L.; Laine, M.; Tikkanen, R.; Helenius, P. (2020): Detailed profile of cognitive dysfunction in children with aspartylglucosaminuria. In: *Journal of inherited metabolic disease* 43 (2), S. 318–325. DOI: 10.1002/jimd.12159.
- Harmer, S.C.; Mohal, J.S.; Kemp, D.; Tinker, A. (2012): Readthrough of long-QT syndrome type 1 nonsense mutations rescues function but alters the biophysical properties of the channel. In: *The Biochemical journal* 443 (3), S. 635–642. DOI: 10.1042/BJ20111912.
- Hietala, M.; Aula, P.; Syvänen, A.C.; Isoniemi, A.; Peltonen, L.; Palotie, A. (1996): DNA-based carrier screening in primary healthcare: screening for aspartylglucosaminuria mutations in maternity health offices. In: *Clinical chemistry* 42 (9), S. 1398–1404.
- Howard, M.; Frizzell, R.A.; Bedwell, D.M. (1996): Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. In: *Nature medicine* 2 (4), S. 467–469. DOI: 10.1038/nm0496-467.
- Howard, M.T.; Shirts, B.H.; Petros, L.M.; Flanigan, K.M.; Gesteland, R.F.; Atkins, J.F. (2000): Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough:

potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. In: *Annals of neurology* 48 (2), S. 164–169.

Hughes, D.A.; Nicholls, K.; Shankar, S.P.; Sunder-Plassmann, G.; Koeller, D.; Nedd, K. et al. (2017): Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. In: *Journal of Medical Genetics* 54 (4), S. 288–296. DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-104178.

Hurt, J.A.; Robertson, A.D.; Burge, C.B. (2013): Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay. In: *Genome Research* 23 (10), S. 1636–1650. DOI: 10.1101/gr.157354.113.

Ikonen, E.; Julkunen, I.; Tollersrud, O.K.; Kalkkinen, N.; Peltonen, L. (1993): Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. In: *The EMBO Journal* 12 (1), S. 295–302.

Isoniemi, A.; Hietala, M.; Aula, P.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (1995): Identification of a novel mutation causing aspartylglucosaminuria reveals a mutation hotspot region in the aspartylglucosaminidase gene. In: *Hum. Mutat.* 5 (4), S. 318–326. DOI: 10.1002/humu.1380050408.

Jain, N.K.; Roy, I. (2009): Effect of trehalose on protein structure. In: *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 18 (1), S. 24–36. DOI: 10.1002/pro.3.

Jeong, S.-J.; Stitham, J.; Evans, T.D.; Zhang, X.; Rodriguez-Velez, A.; Yeh, Y.-S. et al. (2021): Trehalose causes low-grade lysosomal stress to activate TFEB and the autophagy-lysosome biogenesis response. In: *Autophagy* 17 (11), S. 3740–3752. DOI: 10.1080/15548627.2021.1896906.

Jospe-Kaufman, M.; Siomin, L.; Fridman, M. (2020): The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 30 (13), S. 127218. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127218.

Kaartinen, V.; Mononen, I. (1990): Assay of aspartylglycosylaminase by high-performance liquid chromatography. In: *Analytical Biochemistry* 190 (1), S. 98–101. DOI: 10.1016/0003-2697(90)90140-5.

Kapahnke, M.; Banning, A.; Tikkanen, R. (2016): Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. In: *Cells* 5 (4). DOI: 10.3390/cells5040045.

Keeling, K.M.; Wang, D.; Dai, Y.; Murugesan, S.; Chenna, B.; Clark, J. et al. (2013): Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay enhances in vivo nonsense suppression. In: *PLoS one* 8 (4), e60478. DOI: 10.1371/journal.pone.0060478.

Keeling, K.M.; Xue, X.; Gunn, G.; Bedwell, D.M. (2014): Therapeutics based on stop codon readthrough. In: *Annual review of genomics and human genetics* 15. DOI: 10.1146/annurev-genom-091212-153527.

Kerem, E.; Hirawat, S.; Armoni, S.; Yaakov, Y.; Shoseyov, D.; Cohen, M. et al. (2008): Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. In: *Lancet (London, England)* 372 (9640), S. 719–727. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61168-X.

Khanna, R.; Flanagan, J.J.; Feng, J.; Soska, R.; Frascella, M.; Pellegrino, L.J. et al. (2012): The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid  $\alpha$ -

glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease. In: *PLoS one* 7 (7), e40776. DOI: 10.1371/journal.pone.0040776.

Kurosaki, T.; Maquat, L.E. (2016): Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. In: *Journal of Cell Science* 129 (3), S. 461–467. DOI: 10.1242/jcs.181008.

Leeds, P.; Peltz, S.W.; Jacobson, A.; Culbertson, M.R. (1991): The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. In: *Genes & development* 5 (12A), S. 2303–2314. DOI: 10.1101/gad.5.12a.2303.

Lenders, M.; Nordbeck, P.; Kurschat, C.; Karabul, N.; Kaufeld, J.; Hennermann, J.B. et al. (2020): Treatment of Fabry's Disease With Migalastat: Outcome From a Prospective Observational Multicenter Study (FAMOUS). In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 108 (2), S. 326–337. DOI: 10.1002/cpt.1832.

Lentini, L.; Melfi, R.; Cancemi, P.; Pibiri, I.; Di Leonardo, A. (2019): Caffeine boosts Ataluren's readthrough activity. In: *Heliyon* 5 (6), e01963. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01963.

Liu, Y.; Dunn, G.S.; Aronson, N.N. (1996): Purification, biochemistry and molecular cloning of an insect glycosylasparaginase from *Spodoptera frugiperda*. In: *Glycobiology* 6 (5), S. 527–536. DOI: 10.1093/glycob/6.5.527.

Łoboda, A.; Dulak, J. (2020): Muscle and cardiac therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: past, present, and future. In: *Pharmacological reports : PR* 72 (5), S. 1227–1263. DOI: 10.1007/s43440-020-00134-x.

Lotfi, P.; Tse, D.Y.; Di Ronza, A.; Seymour, M.L.; Martano, G.; Cooper, J.D. et al. (2018): Trehalose reduces retinal degeneration, neuroinflammation and storage burden caused by a lysosomal hydrolase deficiency. In: *Autophagy* 14 (8), S. 1419–1434. DOI: 10.1080/15548627.2018.1474313.

Loudon, J.A. (2013): Repurposing Amlexanox as a Run the Red Light Cure-All with Readthrough a No-Nonsense Approach to Personalised Medicine. In: *J Bioanal Biomed* 05 (04). DOI: 10.4172/1948-593X.1000086.

Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.

Manuvakhova, M.; Keeling, K.; Bedwell, D.M. (2000): Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. In: *RNA (New York, N.Y.)* 6 (7), S. 1044–1055. DOI: 10.1017/s1355838200000716.

McCormack, A.L.; Mononen, I.; Kaartinen, V.; Yates, J.R. (1995): Localization of the disulfide bond involved in post-translational processing of glycosylasparaginase and disrupted by a mutation in the Finnish-type aspartylglycosaminuria. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (7), S. 3212–3215. DOI: 10.1074/jbc.270.7.3212.

McDonald, C.M.; Campbell, C.; Torricelli, R.E.; Finkel, R.S.; Flanigan, K.M.; Goemans, N. et al. (2017): Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *Lancet (London, England)* 390 (10101), S. 1489–1498. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31611-2.

McElroy, S.P.; Nomura, T.; Torrie, L.S.; Warbrick, E.; Gartner, U.; Wood, G.; McLean, W.H.I. (2013): A lack of premature termination codon read-through efficacy of PTC124

(Ataluren) in a diverse array of reporter assays. In: *PLoS Biology* 11 (6), e1001593. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001593.

Michorowska, S. (2021): Ataluren-Promising Therapeutic Premature Termination Codon Readthrough Frontrunner. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 14 (8). DOI: 10.3390/ph14080785.

Miller, J.N.; Chan, C.-H.; Pearce, D.A. (2013): The role of nonsense-mediated decay in neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *Human molecular genetics* 22 (13), S. 2723–2734. DOI: 10.1093/hmg/ddt120.

Miller, J.N.; Kovács, A.D.; Pearce, D.A. (2015): The novel Cln1(R151X) mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL) for testing nonsense suppression therapy. In: *Human molecular genetics* 24 (1), S. 185–196. DOI: 10.1093/hmg/ddu428.

Mononen, I.; Fisher, K.J.; Kaartinen, V.; Aronson, N.N. (1993): Aspartylglycosaminuria: protein chemistry and molecular biology of the most common lysosomal storage disorder of glycoprotein degradation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (13), S. 1247–1256. DOI: 10.1096/fasebj.7.13.8405810.

Mononen, I.; Heisterkamp, N.; Dunder, U.; Romppanen, E.L.; Noronkoski, T.; Kuronen, I.; Groffen, J. (1995): Recombinant glycosylasparaginase and in vitro correction of aspartylglycosaminuria. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (5), S. 428–433. DOI: 10.1096/fasebj.9.5.7896015.

Mononen, I.; Kaartinen, V.; Mononen, T. (1988): Laboratory detection of aspartylglycosaminuria. In: *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 191, S. 7–11.

Mononen, I.; Mononen, T.; Ylikangas, P.; Kaartinen, V.; Savolainen, K. (1994a): Enzymatic diagnosis of aspartylglycosaminuria by fluorometric assay of glycosylasparaginase in serum, plasma, or lymphocytes. In: *Clinical chemistry* 40 (3), S. 385–388.

Mononen, I.; Ylikangas, P.; Mononen, T.; Savolainen, K. (1994b): Neonatal detection of aspartylglycosaminuria. In: *Lancet (London, England)* 343 (8908), S. 1297–1298. DOI: 10.1016/S0140-6736(94)92187-3.

Mort, M.; Ivanov, D.; Cooper, D.N.; Chuzhanova, N.A. (2008): A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. In: *Human Mutation* 29 (8), S. 1037–1047. DOI: 10.1002/humu.20763.

Murakami, M.; Eylar, E.H. (1965): Beta-(N-acetylglucosamine)-N-glycosidase: An enzyme which catalyzes the hydrolysis of 1-beta-asparatyl-2-acetamido-1,2-dideoxy-D-glucosylamine. In: *The Journal of biological chemistry* 240, PC556-8.

Mussche, S.; Devreese, B.; Nagabhushan Kalburgi, S.; Bachaboina, L.; Fox, J.C.; Shih, H.-J. et al. (2013): Restoration of cytoskeleton homeostasis after gigaxonin gene transfer for giant axonal neuropathy. In: *Human gene therapy* 24 (2), S. 209–219. DOI: 10.1089/hum.2012.107.

Nagel-Wolfrum, K.; Möller, F.; Penner, I.; Baasov, T.; Wolfrum, U. (2016): Targeting Nonsense Mutations in Diseases with Translational Read-Through-Inducing Drugs (TRIDs). In: *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 30 (2), S. 49–74. DOI: 10.1007/s40259-016-0157-6.

- Naldini, L. (2015): Gene therapy returns to centre stage. In: *Nature* 526 (7573), S. 351–360. DOI: 10.1038/nature15818.
- Oinonen, C.; Tikkanen, R.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1995): Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. In: *Nature structural biology* 2 (12), S. 1102–1108. DOI: 10.1038/nsb1295-1102.
- Opladen, T.; Ebinger, F.; Zschocke, J.; Sengupta, D.; Ben-Omran, T.; Shahbeck, N. et al. (2014): Aspartylglucosaminuria: unusual neonatal presentation in Qatari twins with a novel aspartylglucosaminidase gene mutation and 3 new cases in a Turkish family. In: *Journal of child neurology* 29 (1), S. 36–42. DOI: 10.1177/0883073812469049.
- Palmer, E.; Wilhelm, J.M.; Sherman, F. (1979): Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. In: *Nature* 277 (5692), S. 148–150. DOI: 10.1038/277148a0.
- Palo, J. (1967): Prevalence of phenylketonuria and some other metabolic disorders among mentally retarded patients in Finland. In: *Acta neurologica Scandinavica* 43 (5), S. 573–579. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1967.tb05552.x.
- Parenti, G. (2009): Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. In: *EMBO molecular medicine* 1 (5), S. 268–279. DOI: 10.1002/emmm.200900036.
- Parenti, G.; Medina, D.L.; Ballabio, A. (2021): The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. In: *EMBO Mol Med* 13 (2). DOI: 10.15252/emmm.202012836.
- Park, H.; Fisher, K.J.; Aronson, N.N. (1991): Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase. In: *FEBS letters* 288 (1-2), S. 168–172. DOI: 10.1016/0014-5793(91)81027-6.
- Pascual-Morena, C.; Cavero-Redondo, I.; Álvarez-Bueno, C.; Mesas, A.E.; Pozuelo-Carrascosa, D.; Martínez-Vizcaíno, V. (2020): Restorative treatments of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy: A systematic review. In: *Annals of clinical and translational neurology* 7 (9), S. 1738–1752. DOI: 10.1002/acn3.51149.
- Peden, C.S.; Burger, C.; Muzyczka, N.; Mandel, R.J. (2004): Circulating anti-wild-type adeno-associated virus type 2 (AAV2) antibodies inhibit recombinant AAV2 (rAAV2)-mediated, but not rAAV5-mediated, gene transfer in the brain. In: *Journal of virology* 78 (12), S. 6344–6359. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6344-6359.2004.
- Peltz, S.W.; Morsy, M.; Welch, E.M.; Jacobson, A. (2013): Ataluren as an agent for therapeutic nonsense suppression. In: *Annual review of medicine* 64, S. 407–425. DOI: 10.1146/annurev-med-120611-144851.
- Pfister, P.; Hobbie, S.; Vicens, Q.; Böttger, E.C.; Westhof, E. (2003): The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. In: *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* 4 (10), S. 1078–1088. DOI: 10.1002/cbic.200300657.
- Pollitt, R.J.; Jenner, F.A.; Merskey, H. (1968): ASPARTYLGLYCOSAMINURIA. In: *Lancet (London, England)* 292 (7562), S. 253–255. DOI: 10.1016/s0140-6736(68)92355-6.
- Rebbapragada, I.; Lykke-Andersen, J. (2009): Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? In: *Current opinion in cell biology* 21 (3), S. 394–402. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.02.007.

Recht, M.I.; Douthwaite, S.; Puglisi, J.D. (1999): Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. In: *The EMBO Journal* 18 (11), S. 3133–3138. DOI: 10.1093/emboj/18.11.3133.

Riikonen, A.; Rouvinen, J.; Tikkanen, R.; Julkunen, I.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1996): Primary folding of aspartylglucosaminidase. Significance of disulfide bridges and evidence of early multimerization. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (35), S. 21340–21344. DOI: 10.1074/jbc.271.35.21340.

Ringdén, O.; Remberger, M.; Svahn, B.-M.; Barkholt, L.; Mattsson, J.; Aschan, J. et al. (2006): Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited disorders: experience in a single center. In: *Transplantation* 81 (5), S. 718–725. DOI: 10.1097/01.tp.0000181457.43146.36.

Rowe, S.M.; Clancy, J.P. (2009): Pharmaceuticals targeting nonsense mutations in genetic diseases: progress in development. In: *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 23 (3), S. 165–174. DOI: 10.2165/00063030-200923030-00003.

Ruiz-Echevarría, M.J.; González, C.I.; Peltz, S.W. (1998): Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA. In: *The EMBO Journal* 17 (2), S. 575–589. DOI: 10.1093/emboj/17.2.575.

Rusmini, P.; Cortese, K.; Crippa, V.; Cristofani, R.; Cicardi, M.E.; Ferrari, V. et al. (2019): Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. In: *Autophagy* 15 (4), S. 631–651. DOI: 10.1080/15548627.2018.1535292.

Saarela, J. (2001): Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. In: *Human molecular genetics* 10 (9), S. 983–995. DOI: 10.1093/hmg/10.9.983.

Saarela, J.; Laine, M.; Tikkanen, R.; Oinonen, C.; Jalanko, A.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1998): Activation and oligomerization of aspartylglucosaminidase. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (39), S. 25320–25328. DOI: 10.1074/jbc.273.39.25320.

Sairanen, V.; Tokola, A.; Tikkanen, R.; Laine, M.; Autti, T. (2020): Statistical Permutation Test Reveals Progressive and Region-Specific Iron Accumulation in the Thalami of Children with Aspartylglucosaminuria. In: *Brain sciences* 10 (10). DOI: 10.3390/brainsci10100677.

Salas-Marco, J.; Bedwell, D.M. (2005): Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. In: *Journal of molecular biology* 348 (4), S. 801–815. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.03.025.

Sands, M.S.; Davidson, B.L. (2006): Gene therapy for lysosomal storage diseases. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (5), S. 839–849. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.01.006.

Saraiva, J.; Nobre, R.J.; Pereira de Almeida, L. (2016): Gene therapy for the CNS using AAVs: The impact of systemic delivery by AAV9. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 241, S. 94–109. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.09.011.

Sardiello, M.; Palmieri, M.; Di Ronza, A.; Medina, D.L.; Valenza, M.; Gennarino, V.A. et al. (2009): A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5939), S. 473–477. DOI: 10.1126/science.1174447.

- Scheunemann, A.E.; Graham, W.D.; Vendeix, F.A.P.; Agris, P.F. (2010): Binding of aminoglycoside antibiotics to helix 69 of 23S rRNA. In: *Nucleic acids research* 38 (9), S. 3094–3105. DOI: 10.1093/nar/gkp1253.
- Schueler, U.H.; Kolter, T.; Kaneski, C.R.; Zirzow, G.C.; Sandhoff, K.; Brady, R.O. (2004): Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease. In: *Journal of inherited metabolic disease* 27 (5), S. 649–658. DOI: 10.1023/b:boli.0000042959.44318.7c.
- Settembre, C.; Di Malta, C.; Polito, V.A.; Garcia Arencibia, M.; Vetrini, F.; Erdin, S. et al. (2011): TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036), S. 1429–1433. DOI: 10.1126/science.1204592.
- Song, W.; Wang, F.; Savini, M.; Ake, A.; Di Ronza, A.; Sardiello, M.; Segatori, L. (2013): TFEB regulates lysosomal proteostasis. In: *Human molecular genetics* 22 (10), S. 1994–2009. DOI: 10.1093/hmg/ddt052.
- Stenson, P.D.; Mort, M.; Ball, E.V.; Shaw, K.; Phillips, A.; Cooper, D.N. (2014): The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. In: *Human Genetics* 133 (1), S. 1–9. DOI: 10.1007/s00439-013-1358-4.
- Syvanen, A.; Ikonen, E.; Manninen, T.; Bengtstrom, M.; Soderlund, H.; Aula, P.; Peltonen, L. (1992): Convenient and quantitative determination of the frequency of a mutant allele using solid-phase minisequencing: Application to aspartylglucosaminuria in Finland. In: *Genomics* 12 (3), S. 590–595. DOI: 10.1016/0888-7543(92)90452-x.
- Takamoto, K.; Kawada, M.; Ikeda, D. (2005): Prevention of neomycin-induced nephrotoxic event in pig proximal tubular epithelial cell line by apolipoprotein E3. In: *The Journal of antibiotics* 58 (5), S. 353–355. DOI: 10.1038/ja.2005.45.
- Tanaka, M.; Machida, Y.; Niu, S.; Ikeda, T.; Jana, N.R.; Doi, H. et al. (2004): Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. In: *Nature medicine* 10 (2), S. 148–154. DOI: 10.1038/nm985.
- Tate, W.P.; Poole, E.S.; Horsfield, J.A.; Mannering, S.A.; Brown, C.M.; Moffat, J.G. et al. (1995): Translational termination efficiency in both bacteria and mammals is regulated by the base following the stop codon. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 73 (11-12), S. 1095–1103. DOI: 10.1139/o95-118.
- Tikkanen, R.; Enomaa, N.; Riikonen, A.; Ikonen, E.; Peltonen, L. (1995): Intracellular sorting of aspartylglucosaminidase: the role of N-linked oligosaccharides and evidence of Man-6-P-independent lysosomal targeting. In: *DNA and cell biology* 14 (4), S. 305–312. DOI: 10.1089/dna.1995.14.305.
- Tikkanen, R.; Riikonen, A.; Oinonen, C.; Rouvinen, R.; Peltonen, L. (1996a): Functional analyses of active site residues of human lysosomal aspartylglucosaminidase: implications for catalytic mechanism and autocatalytic activation. In: *The EMBO Journal* 15 (12), S. 2954–2960.
- Tikkanen, R.; Rouvinen, J.; Törrönen, A.; Kalkkinen, N.; Peltonen, L. (1996b): Large-scale purification and preliminary X-ray diffraction studies of human aspartylglucosaminidase. In: *Proteins* 24 (2), S. 253–258. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(199602)24:2<253::AID-PROT12>3.0.CO;2-M.
- Tokola, A.; Laine, M.; Tikkanen, R.; Autti, T. (2019): Susceptibility-Weighted Imaging Findings in Aspartylglucosaminuria. In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 40 (11), S. 1850–1854. DOI: 10.3174/ajnr.A6288.

- Torii, H.; Yoshida, K.; Tsukamoto, T.; Doi, T.; Mitani, M.; Nawashiro, I.T.S. (1985): Metabolic fate of amoxanox (AA-673), a new antiallergic agent, Rats, Mice, Guinea Pigs and Dogs Yakuri to Chiryō (Japanese), 131–143.
- Usuki, F.; Yamashita, A.; Higuchi, I.; Ohnishi, T.; Shiraishi, T.; Osame, M.; Ohno, S. (2004): Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. In: *Annals of neurology* 55 (5), S. 740–744. DOI: 10.1002/ana.20107.
- Uusitalo, A.; Tenhunen, K.; Tenhunen, J.; Matikainen, S.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1997): Expression and regulation of the human and mouse aspartylglucosaminidase gene. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (14), S. 9524–9530. DOI: 10.1074/jbc.272.14.9524.
- Wargo, K.A.; Edwards, J.D. (2014): Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. In: *Journal of pharmacy practice* 27 (6), S. 573–577. DOI: 10.1177/0897190014546836.
- Weinstein, D.S.; Gong, H.; Doweyko, A.M.; Cunningham, M.; Habte, S.; Wang, J.H. et al. (2011): Azaxanthene based selective glucocorticoid receptor modulators: design, synthesis, and pharmacological evaluation of (S)-4-(5-(1-((1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino)-2-methyl-1-oxopropan-2-yl)-5H-chromeno[2,3-b]pyridin-2-yl)-2-fluoro-N,N-dimethylbenzamide (BMS-776532) and its methylene homologue (BMS-791826). In: *Journal of medicinal chemistry* 54 (20), S. 7318–7333. DOI: 10.1021/jm200879j.
- Welch, E.M.; Barton, E.R.; Zhuo, J.; Tomizawa, Y.; Friesen, W.J.; Trifillis, P. et al. (2007): PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. In: *Nature* 447 (7140), S. 87–91. DOI: 10.1038/nature05756.
- Wilkinson, M.F. (2003): The Cycle of Nonsense. In: *Molecular Cell* 12 (5), S. 1059–1061. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00448-9.
- Xia, B.; Asif, G.; Arthur, L.; Pervaiz, M.A.; Li, X.; Liu, R. et al. (2013): Oligosaccharide analysis in urine by maldi-tof mass spectrometry for the diagnosis of lysosomal storage diseases. In: *Clinical chemistry* 59 (9), S. 1357–1368. DOI: 10.1373/clinchem.2012.201053.
- Xu, H.; Ren, D. (2015): Lysosomal Physiology. In: *Annu. Rev. Physiol.* 77 (1), S. 57–80. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021014-071649.
- Yamashita, A.; Izumi, N.; Kashima, I.; Ohnishi, T.; Saari, B.; Katsuhata, Y. et al. (2009): SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. In: *Genes & development* 23 (9), S. 1091–1105. DOI: 10.1101/gad.1767209.
- Zaiss, A.K.; Muruve, D.A. (2005): Immune responses to adeno-associated virus vectors. In: *Current gene therapy* 5 (3), S. 323–331. DOI: 10.2174/1566523054065039.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, 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 und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ritva Tikkanen und Dr. Antje Banning für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Eure Freundlichkeit und große fachliche Expertise beeindruckten mich bis heute und haben mich vom Beginn des Forschungssemesters 2018 bis zum finalen Verfassen der Arbeit 2022 begleitet.

Außerdem möchte ich Ralf, Petra, Benedikt und Jan meinen Dank für die stete kollegiale Hilfe und angenehme Atmosphäre im Labor aussprechen.

Des Weiteren danke ich der Justus-Liebig-Universität Gießen, welche mich durch das Stipendium des Prägraduiertenkollegs (heute JLU Trainee) finanziell und fachlich in interessanten Seminaren unterstützten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Freunden danken, die mir während dieser Doktorarbeit zu jeder Zeit motivierend zur Seite standen.

## 14 Stipendium und öffentlicher Vortrag

Die Erstellung dieser Dissertation wurde durch das Stipendium des Prägraduiertenkollegs (heute: JLU Trainee) der Justus-Liebig-Universität Gießen gefördert. Im Rahmen des Symposiums des Prägraduiertenkollegs hielt ich am 25.01.2019 einen öffentlichen Vortrag zu meiner Dissertation im Medizinischen Lehrzentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen.