

HSP70 als potentielle Therapie bei der neuronalen Ceroidlipofuszinose 2

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

vorgelegt von Feick, Laura Sophia, geb. Sauer
aus Fulda

Gießen 2019

HSP70 als potentielle Therapie bei der neuronalen Ceroidlipofuszinose 2

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

vorgelegt von Feick, Laura Sophia, geb. Sauer
aus Fulda

Gießen 2019

Aus dem Biochemischen Institut
unter der Leitung von Prof. Dr. Lienhard Schmitz
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachter: PD Dr. Dr. Markus Preisig

Tag der Disputation: 02.09.2020

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Neuronale Ceroidlipofuszinosen (NCL).....	1
1.2	CLN2.....	3
1.3	Das CLN2-Protein: Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1).....	5
1.3.1	<i>TPP1</i> -Gen.....	5
1.3.2	Struktur von TPP1.....	5
1.3.3	Aktivierung von TPP1.....	7
1.3.4	CLN2-Mutationen.....	8
1.3.5	Die in dieser Arbeit untersuchten CLN2-Mutationen.....	8
1.4	Therapieformen für CLN2.....	9
1.4.1	Tiermodelle.....	10
1.4.2	Symptomatische Therapie.....	11
1.4.3	Enzymersatztherapie.....	11
1.4.4	Substratreduktionstherapie.....	12
1.4.5	Stammzelltransplantation.....	12
1.4.6	Stop-Codon-Readthrough.....	13
1.4.7	Gentherapie.....	13
1.4.8	Chaperone und andere Therapieformen.....	14
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	15
2	Material.....	17
2.1	Materialien und Geräte.....	17
2.2	Chemikalien und Puffer.....	20
2.3	Kits und Säulen.....	26
2.4	Antikörper.....	26
2.5	Primer.....	27
2.6	Humane Zelllinien und Bakterienstämme.....	28
2.7	Substanzen.....	29
3	Methoden.....	30
3.1	Zellbiologische Standardmethoden.....	30

3.1.1	Kultivierung von HEK- Zellen und Fibroblasten.....	30
3.1.2	Passagieren von HEK-Zellen und Fibroblasten	30
3.1.3	Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmid-DNA.....	31
3.2	Molekularbiologische Standardmethoden	31
3.2.1	Mutagenese	31
3.2.2	Transformation.....	33
3.2.3	Plasmidpräparation (Mini).....	33
3.2.4	Plasmidpräparation (Midi).....	34
3.2.5	Überprüfung der DNA.....	35
3.2.6	Herstellung von Zelllysaten aus HEK-und Fibroblastenzellen	35
3.2.7	Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentration	36
3.2.8	SDS-PAGE	37
3.2.9	Western-Blot.....	37
3.2.10	Immundetektion	38
3.2.11	Stripping.....	39
3.3	Aktivitätsassay	39
3.3.1	Fluorimetrischer TPP1-Aktivitätsassay (modifiziert nach Lukacs et al.).....	39
3.4	Herstellung von rekombinantem HSP70	39
3.4.1	Prinzip der Aufreinigung mittels Twin-Strep-tag.....	39
3.4.2	Aufreinigung des rekombinanten HSP70	40
3.5	Statistik	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Experimente mit CLN2-Fibroblasten	42
4.1.1	Stimulation der Zellen mit Celastrol.....	42
4.1.2	Stimulation der Zellen mit Arimoclomol	46
4.2	Experimente mit TPP1-Knockout-HEK293T-Zellen	49
4.2.1	Mutagenese von TPP1-Asp276Val, TPP1-Gly284Val und TPP1-Ser475Leu in das Plasmid pcDNA3	49
4.2.2	Expression der TPP1-Mutationen in transient transfizierten HEK293T-Zellen ...	51
5	Diskussion	66
5.1	Auswahl der untersuchten Mutationen	66
5.2	Chaperone als Therapieansatz für die Neuronale Ceroidlipofuszinose	67
5.3	Ausblick.....	73

6	Zusammenfassung	75
7	Summary.....	77
8	Abkürzungsverzeichnis.....	79
9	Abbildungsverzeichnis.....	83
10	Tabellenverzeichnis	85
11	Literaturverzeichnis	86
12	Erklärung zur Dissertation	91
13	Danksagung	92

1 Einleitung

1.1 Neuronale Ceroidlipofuszinosen (NCL)

Die Neuronalen Ceroidlipofuszinosen (kurz NCL, heute CLN) gehören zu der Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen und sind im englischen Sprachraum auch als „Batten disease“ bekannt. Sie werden bis auf die Ausnahme der adulten Form (CLN4) autosomal-rezessiv vererbt. Die NCLs treten zumeist im Kindesalter auf und beschreiben die größte Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter (Mink et al. 2013). Die Inzidenz liegt bei 1:30.000 Lebendgeborenen (Kohlschütter et al. 2005).

Die Einteilung der NCLs erfolgte ursprünglich nach dem Zeitpunkt des Krankheitsbeginns. Heutzutage wird eine Nomenklatur verwendet, bei der sich auf das verantwortliche Gen und das Manifestationsalter bezogen wird (Mole und Williams 1993, aktualisiert 2013).

Erstmals wurde vor etwa 190 Jahren von Krankheitsfällen dieser Art berichtet. 1826 beschrieb der norwegische Arzt Otto Christian Stengel (1794-1890) als einer der Ersten vier Geschwister, die vermutlich an Neuronaler Ceroidlipofuszinose litten. Sein Bericht wurde im Norwegischen Medizinjournal „Exr“ veröffentlicht (Brean 2004). 77 Jahre später publizierte Frederick E. Batten (1865-1918), nach welchem die Erkrankung im englischsprachigen Raum benannt ist, einen Fachartikel über zwei Patientenfälle (Batten 1903).

Die Erkrankungen basieren auf Mutationen in Genabschnitten, die für lysosomale Proteine oder Enzyme kodieren. Es sind bislang 14 Gendefekte bekannt, die zu einer Form der Neuronalen Ceroidlipofuszinose führen können (CLN1 bis CLN14) (Schulz et al. 2013). Klassischerweise lässt sich histologisch eine abnorme intralysosomale Speicherung von wachsartigem Ceroidlipofuszin-Material in Zellen des Gehirns und anderen Geweben finden. Lipofuszin ist ein stark lipidhaltiges Pigment, das beim Abbau von Phagosomen durch Lysosomen entsteht und aufgrund seiner Autofluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar ist. Die Lipopigmente lassen sich außerdem mit dem Elektronenmikroskop detektieren, da sie elektronendicht sind (Siakotos et al. 1970). Neben den Patienten mit bekannten Mutationen gibt es solche, die sowohl die typischen Symptome der NCL haben, als auch die charakteristischen Einlagerungen von Pigmenten in den Lysosomen zeigen, deren Mutationen aber nicht in einem der bekannten Gene liegen. Das lässt darauf schließen, dass es weitere CLN-Gene geben muss (Schulz et al. 2013). Bei einigen anderen Erkrankungen hat man ebenfalls

Ansammlungen von Ceroidlipofuszinosen finden können, allerdings ist noch nicht klar, ob es sich bei diesen um richtige Neuronale Ceroidlipofuszinosen handelt (Mink et al. 2013). Die Nummerierung der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen lässt auf die Reihenfolge der Entdeckung schließen, wobei die ersten NCLs auch mit dem Manifestationsalter der Symptome korrelieren. Die klinischen Symptome der verschiedenen NCL-Formen ähneln sich. Entscheidend für die korrekte Diagnose einer NCL-Erkrankung ist, dass ein Kind ursprünglich normal entwickelt und gesund war und die oft langsam fortschreitenden Symptome erst ab einem bestimmten Alter aufgetreten sind. Meist bestehen sie aus einer Kombination von Demenz, Sehkraftverlust bis hin zur Degeneration der Retina und Epilepsie („amaurotische Demenz“) (Kohlschütter et al. 2005). Außerdem äußern sie sich durch motorischen und kognitiven Abbau (Donsante und Boulis 2018). Wie genau die genetischen Defekte zu den neurodegenerativen Vorgängen führen, ist bis heute nicht im Detail geklärt. Meist endet die Erkrankung mit einem verfrühten Tod (Kohlschütter et al. 2005).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen derzeit bekannten NCL-Formen und ihr betroffenes Protein.

NCL Typ	Bezeichnung	Manifestationsalter	betroffenes Protein	Größe (AS)	Proteinart
CLN 1	Klassische infantile NCL	1-2 Jahre	Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1)	306	lösliches Protein
CLN 2	Klassische spätinfantile NCL	2-4 Jahre	Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1)	563	lösliches Protein
CLN 3	Klassische juvenile NCL		Funktion nicht näher bekannt	438	Transmembran-Protein
CLN 4	Adulte autosomal dominante NCL	Erwachsenenalter	Cystein-String-Protein alpha (CSP α)	198	lösliches Protein
CLN 5	Finnische spätinfantile NCL	spätinfantil/ frühjuvenil/ Erwachsenenalter		407	lösliches Protein
CLN 6	Kufs-Krankheit Typ A/ indisch-iberische Variante	spätinfantil		311	Transmembran-Protein
CLN 7	Türkische Variante	spätinfantil	(MFSD8)	518	Transmembran-Protein
CLN 8	Progressive Epilepsie mit intellektueller Einschränkung/ Nordische Epilepsie	spätinfantil / juvenil		286	Transmembran-Protein
CLN 9			unbekannt		
CLN 10	Kongenitale NCL	kongenital / spätinfantil/ juvenil/ adult	Cathepsin D (CTSD)	412	lösliches Protein
CLN 11	Adulte NCL	Erwachsenenalter	Progranulin	593	lösliches Protein
CLN 12	Kufor-Rakeb-Syndrom	früh / juvenil	ATPase	1180	Transmembran-Protein
CLN 13	Kufs-Krankheit Typ B	Erwachsenenalter	Cathepsin F	484	lösliches Protein
CLN 14	Infantile, progressive myoklonische Epilepsie Typ 3	infantil	Kaliumkanal-Tetramerisations-Domäne-abhängiges Protein 7 (KCTD7)	289	lösliches Protein

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen (NCL): Der Tabelle sind die NCL-Erkrankungen mit dem jeweiligen auslösenden Gen und weiteren Informationen wie Bezeichnung, Manifestationsalter, betroffenes Protein, Größe in Anzahl der Aminosäuren (AS) und die Proteinart zu entnehmen. (Modifiziert nach Carcel-Trullols et al. 2015, Steinfeld et al. 2011, <https://www.cln2connection.com/en-uk/overview/natural-history/>, zuletzt geprüft am 27.11.2019).

1.2 CLN2

CLN2 (auch cLINCL) beschreibt die klassische spätinfantile Neuronale Ceroidlipofuszinose (Kohlschütter et al. 2016). Sie wurde Anfang des 20. Jahrhunderts erstmalig beschrieben durch Jansky und Bielschowsky, weshalb sie auch Jansky-Bielschowsky-Krankheit genannt wurde (Mink et al. 2013).

Mutationen im *TPP1*-Gen führen zu einem Defekt des lysosomalen Enzyms Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1). Anders als beispielsweise CLN1, welche vorrangig in Finnland vorkommt, tritt CLN2 weltweit auf (Kohlschütter und Schulz 2016).

Die Erkrankung manifestiert sich in der Regel im Kleinkindalter zwischen 1 und 4 Jahren. Sie äußert sich zunächst im Stillstand der psychomotorischen Entwicklung, gefolgt von häufig therapieresistenten epileptischen Anfällen. Bald darauf sind weitere Anzeichen neurodegenerativer Vorgänge des zentralen Nervensystems zu erkennen. Der Verlust motorischer Fähigkeiten schreitet rasch voran, Demenz, Makuladegeneration bis hin zu Blindheit, Krämpfe und Ataxie sind häufige Symptome. Die Erkrankung führt schließlich zu einem frühen Tod im Alter von etwa 10-15 Jahren (Kohlschütter und Schulz 2016, Mink et al. 2013).

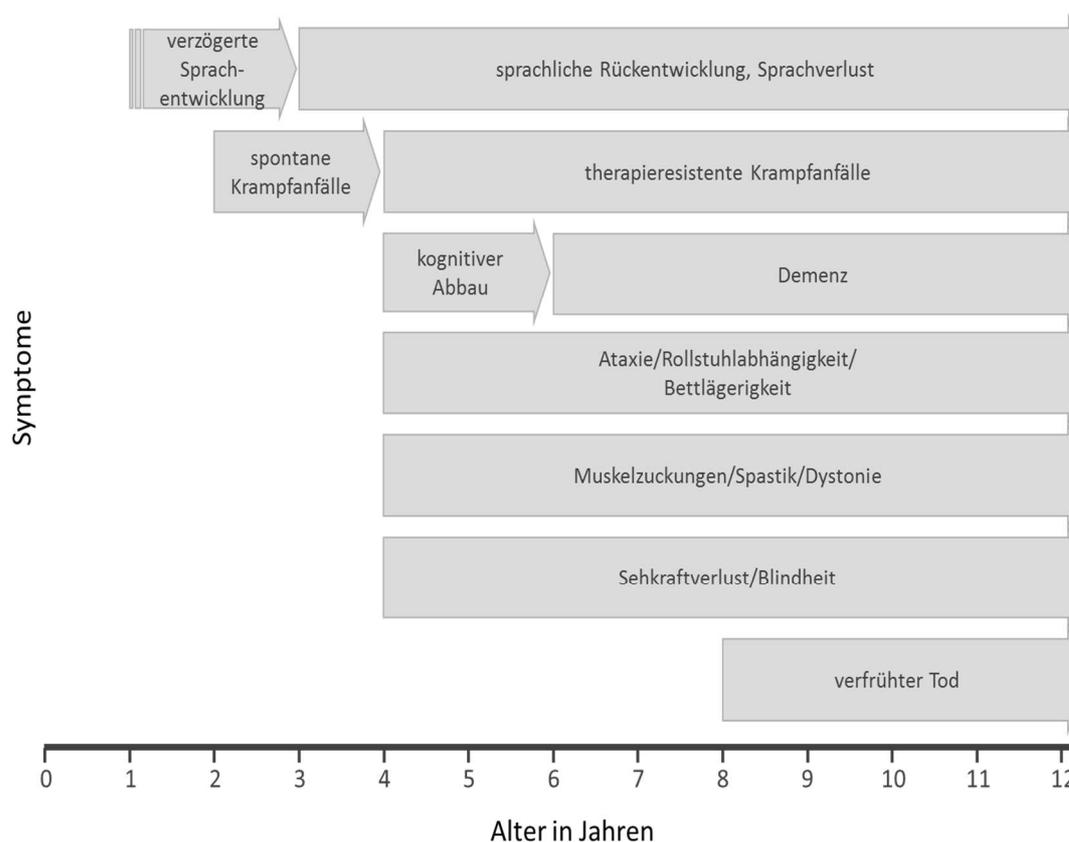


Abbildung 1: Korrelation der typischen Symptome der klassischen spätinfantilen Neuronalen Ceroidlipofuszinose (CLN2) mit dem Alter des Auftretens: Die Abbildung zeigt die bei der CLN2 typischerweise auftretenden Symptome. Diese sind nach dem Zeitpunkt des durchschnittlichen Auftretens gegliedert. Sowohl die Zeitpunkte als auch das Auftreten der Symptome an sich variieren von Patient zu Patient, was eine eindeutige Diagnose schwieriger macht. (Modifiziert nach <https://www.cln2connection.com/en-uk/overview/natural-history/>, zuletzt überprüft am 27.11.2019).

Die verschiedenen Formen der NCL haben unverwechselbare ultrastrukturelle Muster. Bei CLN2 haben die akkumulierten Lipopigmente ein kurvilineäres Aussehen, wohingegen das Erscheinungsmuster bei CLN1 eher granulär und das bei CLN3 Fingerabdruck-ähnlich ist. Dieses Charakteristikum wird ebenso zur Unterscheidung der verschiedenen NCL-Formen herangezogen (Mink et al. 2013, Paulus et al. 2012).

1.3 Das CLN2-Protein: Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1)

Die Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) ist eine lysosomale saure Pepstatin-insensitive Aminopeptidase, die N-terminale Tripeptide vom Substrat abspaltet und schwache Endopeptidase-Aktivität besitzt (Ezaki et al. 2000, Pal et al. 2009). Bis auf die nachfolgend erwähnten Proteine sind die Substrate jedoch unbekannt.

TPP1 kommt in vielen Geweben vor, besonders in solchen mit Verbindung zur Peptidhormon-Produktion. Mutationen im *TPP1*-Gen führen zu Störungen im Enzym oder zum Fehlen von prozessiertem TPP1. Dies verhindert den korrekten Abbau spezifischer Neuropeptide und der Untereinheit C der mitochondrialen ATP-Synthase. Diese akkumulieren infolgedessen als Ceroid-Lipofuszin-Material in den Lysosomen und führen zu dem Krankheitsbild der CLN2 (Ezaki et al. 1999, Kohlschütter und Schulz 2016, Tian et al. 2006).

1.3.1 *TPP1*-Gen

Die chromosomale Genlokation des *TPP1*-Gens ist 11p15.4. Das *TPP1*-Gen ist 6,65 kb lang und besteht aus 13 Exons und 12 Introns (Liu et al. 1998). Diese formen ein offenes Leseraster von 1,689 bp, welche für ein 563 Aminosäuren großes Protein kodieren (Ezaki et al. 1999).

1.3.2 Struktur von TPP1

Die dreidimensionale Kristallstruktur von humanem TPP1 wurde durch Röntgenstrahlbeugung mit 2,35 Å Auflösung bestimmt. Dabei wurde eine kugelförmige Struktur mit einer Subtilisin-ähnlichen Faltung erkannt. Das Enzym hat eine untypische Ser475-Gly272-Asp360 katalytische Triade, durch welche es in saurem pH aktiv sein kann. Seine Ca²⁺-Bindungsstelle ist oktaedrisch geformt. Diese Eigenschaften weisen TPP1 der Sedolisin-Familie der Peptidasen zu. Die Substratbindungstasche von TPP1 ist so aufgebaut, dass die Spaltung von Tripeptiden aus dem N-Terminus von Proteinen bevorzugt erfolgen kann. Das asymmetrische Molekül enthält zwei TPP1-Monomere, die

jeweils aus zwei Ketten zusammengesetzt sind: dem Prosegment und der katalytischen Domäne. Das Prosegment hat eine Molekularmasse von 17 kDa, die katalytische Domäne ist 39,7 kDa groß. Während der Autoprocessing des Vorläufers zum reifen TPP1 durch einen sauren pH wird das primär 563 Aminosäuren große Translationsprodukt zu 368 C-terminalen Aminosäuren gekürzt, welche die katalytische Domäne und alle fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen enthalten (Asn²¹⁰, Asn²²², Asn²⁸⁶, Asn³¹³, Asn⁴⁴³). Dabei erfährt das Molekül keine nennenswerte Änderung der Sekundärstruktur. Je nach pH-Wert zwischen 4,5 und 5,5 beschreiben Pal et al. 2009 eine variable Spaltung nach Ser¹⁸¹, Glu¹⁸⁹ oder Gly¹⁹⁵ (Pal et al. 2009, <https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=TPP1%20Gene%20>, zuletzt besucht 12.19).

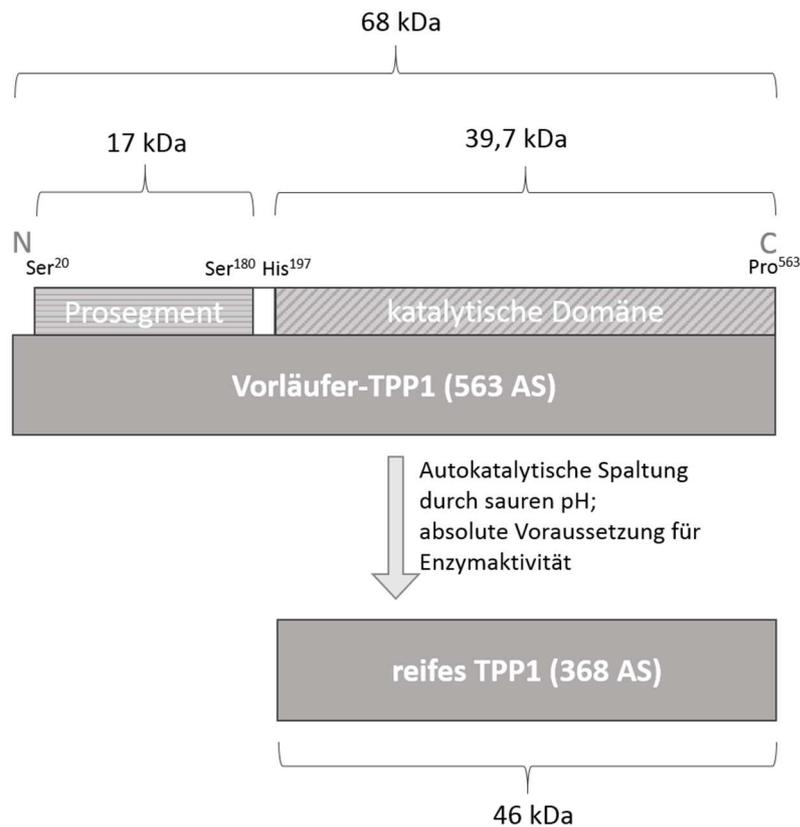


Abbildung 2: Prozessierung von Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1): Das Vorläufer-TPP1 hat 563 Aminosäuren (AS) und besteht aus einem Prosegment sowie einer katalytischen Domäne, seine Molekularmasse ist 68 kDa. Auf das Signalpeptid am N-Terminus, welches aus den ersten 19 Aminosäuren besteht, folgt das Prosegment (Ser²⁰ - Ser¹⁸⁰). An das anschließende Zwischensegment (Ser¹⁸¹ – Leu¹⁹⁶) fügt sich der Beginn der katalytischen Domäne (His¹⁹⁷) an. Durch einen sauren pH-Wert findet die Autoprocessing des Vorläufers statt, und es entsteht reifes TPP1. Dieses besteht aus 368 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 46 kDa.

1.3.3 Aktivierung von TPP1

TPP1 ist auf zweierlei Weise proteolytisch aktiv. Zum einen hat es eine schwache Endopeptidase-Aktivität mit einem Optimum von pH 3, zum anderen eine starke Exopeptidase-Aktivität mit einem optimalen pH von 4,5. Die Endopeptidase-Aktivität ist entscheidend bei der intramolekularen Autoprocessing des inaktiven Vorläufers zum reifen und aktiven TPP1, welche durch einen niedrigen pH-Wert ausgelöst wird. Die Exopeptidase-Aktivität ermöglicht die Spaltung von Tripeptiden vom N-Terminus von Polypeptiden bzw. Proteinen (Pal et al. 2009, Tian et al. 2006). TPP1 wird instabil bei einem pH über 7 (Vines und Warburton 1998).

1.3.4 CLN2-Mutationen

Bis heute sind 131 Mutationen im CLN2-Gen bekannt (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, <https://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN2mutationtable.htm>, zuletzt überprüft 09.2020). Die Mehrheit der bekannten TPP1-Mutationen sind Missense- und Nonsense-Mutationen. Etwa 22% aller CLN2-Mutationen weisen eine Missense-Mutation auf, bei der eine Punktmutation vorliegt, durch die eine falsche Aminosäure in die Polypeptidkette eingebaut wird. Bei den meisten dieser sogenannten Missense-Mutationen kann kaum eine Restaktivität von TPP1 festgestellt werden, weshalb sie mit schwerwiegenden Symptomen verbunden sind. Die Erscheinungsbilder von Missense-Mutationen sind äußerst variabel und lassen sich nur schwer vorhersagen. Durch Strukturveränderungen kann es sowohl zu einer Steigerung als auch zu einer Abschwächung oder dem Verlust der Funktionsfähigkeit eines Proteins kommen. Außerdem können sie die Stabilität des Proteins beeinträchtigen und so einen Abbau herbeiführen.

29% der CLN2-Allele weisen eine Nonsense-Mutation auf, bei welcher durch eine Punktmutation ein Stop-Codon entsteht, und der Aufbau der Polypeptidkette frühzeitig abgebrochen wird. Die Nonsense-Mutationen führen in der Regel zu einem kompletten Funktionsverlust und Abbau des Proteins oder gar der mRNA. Damit fallen mehr als die Hälfte aller CLN2-Mutationen in diese beiden Gruppen (Geraets et al. 2017).

Generell kann man solche Mutationen unterscheiden, welche die katalytische Aktivität direkt beeinträchtigen und solche, bei denen die Konformation des Proteins durch die Mutation destabilisiert ist. Außerdem gibt es Mutationen, bei denen nicht genau abzuschätzen ist, woher das Fehlen von funktionsfähigem Protein rührt und was genau ausgelöst wird. Zu einem großen Teil stören die Mutationen den Faltungsprozess des Proteins, womit die posttranslationale Prozessierung und die Überführung von TPP1 ins Lysosom verhindert werden. Der Aminosäureaustausch führt folglich zu instabilen Produkten, die schnell abgebaut werden (Steinfeld et al. 2004, Pal et al. 2009).

1.3.5 Die in dieser Arbeit untersuchten CLN2-Mutationen

Für diese Arbeit kamen vorrangig solche Mutationen in die enge Auswahl, welche häufig vorkommen. Sie erfahren aufgrund des Aminosäureaustauschs zumeist strukturelle Veränderungen, welche die Enzymfaltung behindern. Mit dem Versuch der Korrektur dieser Faltungsfehler erhofft man sich die Rückgewinnung des funktionierenden Enzyms.

Bei der untersuchten Ile287Asn-Mutation handelt es sich um eine Missense-Mutation, bei der in Exon 7 ein Thymin gegen ein Adenin ausgetauscht ist. Die Position der Mutation liegt zwischen der Alpha-Helix 8 und dem Beta-Strang 10. In der Folge kommt es zu einer instabilen Faltung. Die Gly284Val-Mutation ist eine Missense-Mutation und wird bedingt durch einen Austausch der Base Guanin gegen Thymin in Exon 7. Positioniert ist die Mutation in der Struktur am Ende der Alpha-Helix 8, welche ebenso Glu²⁷² und Asp²⁷⁶ beherbergt. Ein durch die Mutation bedingter Zusammenstoß mit Gly⁴⁸³ der angrenzenden Alpha-Helix 13 führt zu einer Störung der Faltung. Bei der Asp276Val-Missense-Mutation ist ein Adenin gegen ein Thymin in Exon 7 ausgetauscht. Asp²⁷⁶ ist am Aktivierungsprozess und damit an der katalytischen Funktion beteiligt (Pal et al. 2009, MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, <https://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN2mutationtable.htm>, zuletzt überprüft 11.2019).

Es finden sich auch solche Mutationen, die im aktiven Zentrum eines Proteins liegen. Ser475Leu beschreibt eine Punktmutation in Exon 11 in der Alpha-Helix 13 im aktiven Zentrum des Moleküls. Dies äußert sich in einer ungestörten Prozessierung des Vorläufers, führt aber zu einem funktionsunfähigen Enzym, da das Substrat nicht mehr korrekt binden und umgesetzt werden kann. Durch den Aminosäureaustausch resultiert der Verlust der proteolytischen Aktivität. Es handelt sich um eine Missense-Mutation, bei der ein Cytosin gegen ein Thymin ausgetauscht ist (Pal et al. 2009, MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, <https://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN2mutationtable.htm>, zuletzt überprüft 11.2019). Selbst wenn man die Struktur der Enzyme mit derartig positionierten Mutationen verbessern könnte, würde man in diesen Fällen keine Aktivität erwarten.

Neben den Mutationen, auf die sich in dieser Arbeit fokussiert wurde, existieren zahlreiche weitere Gendefekte. Eine weitere Mutation (Asn286Ser) entspricht einer der fünf N-Glykosylierungsstellen von TPP1, wodurch die N-Glykosylierung verloren geht. Die Glykosylierung von TPP1 ist jedoch essentiell für die Autoprozessierung, insbesondere für die intrazelluläre Faltung und die Überführung des Enzyms ins Lysosom (Pal et al. 2009).

1.4 Therapieformen für CLN2

Die Neuronalen Ceroidlipofuszinosen sind stark progredient neurodegenerativ, bis sie schließlich derzeit unaufhaltsam zum Tode führen. In den letzten 20 Jahren wurden viele Versuche unternommen, therapeutisch wirksame Strategien für die Erkrankungen zu entwickeln. Enzymersatztherapie, Substratreduktionstherapie, Stammzelltransplantation und Chaperon-Therapie sind nur einige zu nennende Formen, die bereits für lysosomale Speichererkrankungen überprüft wurden. Auch die Gentherapie und

weitere Therapieoptionen entwickeln sich fortlaufend. Leider sind die Therapien jedoch in ihrer Wirksamkeit limitiert, da viele Organschäden der Betroffenen zum Zeitpunkt der Therapie bereits bestehen (Beck 2018).

Bisher gibt es keine kausale kurative Therapie für die Neuronale Ceroidlipofuszinose 2. Die bestehenden Therapieformen setzen meist an einem Punkt an, an dem bereits Organschäden bestehen und eine Heilung nicht mehr möglich ist. Um diesen Umstand zu umgehen, ist derzeit bereits in einigen Ländern eine Neugeborenenuntersuchung etabliert. Jedoch ist auch diese Untersuchung schwierig, da es einen großen Variantenreichtum bezüglich der klinischen Manifestation gibt und viele Kinder, bei denen eine Enzymvariante festgestellt wird, möglicherweise nie in ihrem Leben etwas davon spüren werden (Beck 2018). Nichtsdestotrotz ist die Früherkennung das einzige Mittel, um irreversible Schäden, wie die Neurodegeneration, und andere bleibende Organschäden zu vermeiden. Da die Erkrankung sehr früh ausbricht, liegt die Vermutung nahe, dass bereits während der embryonalen oder fetalen Phase Defekte entstehen. Dies lässt darauf schließen, dass ein postnataler Behandlungsbeginn unter Umständen zu spät sein kann. Ein Erkranken der Kinder könnte damit zwar gestoppt, aber nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Idee einer Behandlung im Uterus liegt nahe, insbesondere bei Müttern, die bereits ein erkranktes Kind haben. Aufgrund eines eventuellen Wiederauftretens bei einer erneuten Schwangerschaft wird besonders für Familien, die bereits ein Kind mit einer NCL-Erkrankung haben, eine humangenetische Beratung empfohlen (Steinfeld et al. 2011). Im optimalen Falle kann eine Behandlung entwickelt werden, die bereits während der Schwangerschaft begonnen werden kann.

1.4.1 Tiermodelle

Die Untersuchung von Behandlungsmaßnahmen für schwerwiegende Krankheiten basiert in vorklinischen Studien zumeist auf Tiermodellen. Diese bieten insbesondere bei seltenen und langsam voranschreitenden Erkrankungen die Möglichkeit, Hinweise auf den Krankheitsverlauf zu bekommen, um geeignete Therapieoptionen zu entwickeln und zu prüfen. Im Falle von CLN2 wurde zunächst mit einem CLN2^{-/-}-Knockout-Mausmodell gearbeitet, mit welchem solche Therapien, die mutationsspezifisch sind, nicht untersucht werden konnten. Geraets et al. haben ein Mausmodell erstellt, welches eine äquivalente Mutation zur menschlichen p.R208X-Nonsense-Mutation trägt. An diesem können Therapieformen, wie z.B. die Read-Through-Therapien, untersucht werden (Geraets et al. 2017). Des Weiteren existiert das Dackel-Modell, an welchem die Enzymersatztherapie mit Cerliponase Alfa, Handelsname Brineura, getestet wurde (Katz et al. 2014).

1.4.2 Symptomatische Therapie

Lange vor der Diagnose einer Neuronalen Ceroidlipofuszinose 2 treten ihre Symptome auf. Die Krankheit bleibt oft für Jahre unerkannt und schreitet voran. In dieser Zeit leiden Patienten und Angehörige unter den auftretenden Erscheinungen der Krankheit. Epilepsie, Myoklonien und Spastiken werden dann häufig medikamentös symptomatisch therapiert, um dem erkrankten Kind eine Erleichterung zu verschaffen. Auch Alltagshelfer wie eine Magen-Sonde kommen zum Einsatz, wenn das Kind nicht mehr richtig schlucken kann. Jedoch kann eine symptomatische Therapie nur für eine zeitweise Befreiung vom Leiden sorgen und ist deshalb keine zufriedenstellende Lösung. Ist erst einmal die korrekte Diagnose gestellt, müssen zügig effektive Maßnahmen gefunden werden, die den Betroffenen helfen und optimalerweise zur vollständigen Genesung führen.

1.4.3 Enzymersatztherapie

Das Prinzip der Enzymersatztherapie beruht darauf, das mutierte Protein durch rekombinantes Protein zu ersetzen, um die Wildtyp-Funktion wiederherzustellen (Xu et al. 2016). Hierzu wird natürliches Protein zugeführt, meist intravenös oder direkt ins ZNS. Seit die Forschung an Enzymersatztherapien im Jahr 1991 begonnen hat, wurden auch ihre Grenzen deutlicher.

Die intravenös zugeführten Ersatzenzyme konnten nicht alle relevanten Gewebe und Organe erreichen. Insbesondere die Tatsache, dass die rekombinanten Enzyme die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können und somit nach peripherer Administration keine Auswirkung auf die neuronale Degeneration haben, ist ein großes Problem (Xu et al. 2016).

In Untersuchungen an nicht-humanen Primaten konnte bestätigt werden, dass ein Ersatz des fehlerhaften Proteins durch Wildtyp-Protein bei intrathekaler Injektion funktioniert. Die Pharmakokinetik und die Gewebeverteilung waren vielversprechend und führten zu klinischen Studien, in denen die intraventrikuläre Enzymersatztherapie an CLN2-Patienten durchgeführt wurde (Kohlschütter und Schulz 2016). Seit 30. Mai 2017 ist die Enzymersatztherapie für CLN2 in Europa zugelassen. Das entsprechende Medikament, Cerliponase Alfa, ist ein rekombinanter, humaner TPP1-Vorläufer, der über einen Shunt direkt in den Liquor verabreicht wird. Der Vorläufer wird dann durch den niedrigen pH-Wert im Lysosom aktiviert.

Der Therapieaufwand ist durch die Injektion in den Liquorraum, die in regelmäßigen Abständen (etwa zweiwöchentlich) stattfinden muss und mindestens mit einem ambulanten Krankenhausaufenthalt verbunden ist, sehr hoch und daher nicht alltagstauglich. Der Erfolg der Behandlung ist zudem stark abhängig davon, wie weit die Erkrankung bereits fortgeschritten ist. Die Verträglichkeit der Enzyersatztherapie ist häufig nicht gewährleistet, und es konnten Immunreaktionen gegen das zugeführte Enzym beobachtet werden. Hinzu kommt, dass die Entwicklung und Produktion rekombinanter Proteine sehr teuer ist, und die Therapiekosten damit sehr hoch sind. All dies spiegelt deutlich wieder, wie notwendig das Finden neuer effektiver Therapien ist, um Patienten mit CLN2 helfen zu können (Xu et al. 2016).

1.4.4 Substratreduktionstherapie

Bisher wurde die Strategie verfolgt, den Anteil an aktivem TPP1 durch die Enzyersatztherapie zu erhöhen oder die Akkumulation des Substrats durch Abschwächung der Enzymaktivität von anderen, substratherstellenden Enzymen zu unterbrechen. Diese sogenannte Substratreduktionstherapie hat zum Ziel, die Akkumulation von Substanzen in den Zellen aufzuhalten und somit das Zugrundegehen dieser zu stoppen. Die in vivo Substrate von TPP1 sind bislang nicht bekannt. In vitro wurden die Untereinheit C der mitochondrialen ATP-Synthase, Amyloid β , Angiotensin II und Substanz P als Substrate von TPP1 identifiziert (Junaid et al. 2000). Durch die Inhibition der Enzyme, welche für die Synthese des Substrats zuständig sind, kann dies erreicht werden. Vielversprechend ist, dass die kleinen Moleküle, die oral verabreicht werden können, eine gute Gewebeverteilung haben und sogar bis ins ZNS gelangen, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Die Verabreichung dieser Medikamente hat allerdings toxische Nebeneffekte, welche die Verträglichkeit der Therapie negativ beeinflussen. Es konnte zudem beobachtet werden, dass durch das Inhibieren eines bestimmten Enzyms kompensatorisch andere Makromoleküle in den Zellen gespeichert wurden (Xu et al. 2016).

1.4.5 Stammzelltransplantation

Als eine weitere Behandlungsalternative gilt die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Die Idee dahinter ist, dem Gehirn einige Stammzellen zuzuführen, die dort im Idealfall schließlich die Funktion der Zellen übernehmen, die durch die NCL zerstört wurden. Die transplantierten gesunden Zellen könnten das fehlende Enzym produzieren. Das dann frei verfügbare Enzym kann weitere Gehirnzellen versorgen und damit retten

(Selden et al. 2013). Damit die transplantierten Spenderzellen jedoch nicht abgestoßen werden, muss ein Spender mit passendem Gewebsantigen gefunden werden. Eine erste klinische Phase-I-Studie mit CLN1- und CLN2-Patienten, welche die Stammzelltransplantation mit einer nachfolgenden Immunsuppression kombinierte, konnte bereits ohne Komplikationen durchgeführt werden und bietet die Grundlage für weitere klinische Untersuchungen der Stammzelltherapie bei Neuronalen Ceroidlipofuszinosen (Selden et al. 2013). Der Erfolg der Therapie ist jedoch stark abhängig vom Stadium der Erkrankung und ist nur in früher Kindheit effektiv. Darüber hinaus zeigt die Stammzelltransplantation nicht bei allen lysosomalen Speichererkrankungen Erfolge und kann die Erkrankung nicht ausheilen (Malatack et al. 2003, Platt et al. 2012). Aufgrund dieser Schwierigkeiten ist die Stammzelltransplantation kein zufriedenstellendes Mittel.

1.4.6 Stop-Codon-Readthrough

Bei einer Nonsense-Mutation kommt es zur verfrühten Unterbrechung der Proteinsynthese, da durch die Punktmutation anstatt der korrekten Aminosäure ein Stop-Codon kodiert wird. Damit die Proteine nicht verkürzt ausgebildet werden, wird häufig der sogenannte „nonsense mediated decay“ (NMD) induziert, durch den die mRNA mit dem falschen Stop-Codon verfrüht abgebaut wird. An dieser Stelle setzt eine weitere Therapiemöglichkeit an: durch pharmakologische Stoffe wird das vorzeitige Terminationscodon überlesen und ein vollständiges Protein synthetisiert (Wiechers et al. 2017).

1.4.7 Gentherapie

Da die lysosomalen Speichererkrankungen auf einem Defekt beruhen, der meist ein singuläres Gen betrifft, eignen sie sich optimal für eine Gentherapie. Jedoch müssen auch bei der Gentherapie die vielversprechenden Ergebnisse noch gründlich bezüglich ihres Langzeiteffektes überprüft werden, damit eine sichere Wirkung gewährleistet sein kann und Schäden auf den Organismus auszuschließen sind. Grundsätzlich gibt es zwei Formen der Gentherapie: die in vivo-Therapie und die ex vivo-Therapie. Bei der in vivo-Gentherapie wird das korrekte Gen direkt in das betroffene Organ injiziert, wodurch das Genprodukt die dortigen Zellen repariert. Außerdem liegt dann eine große Menge an funktionsfähigem Enzym vor, welches mittels des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors in weitere Zielzellen gelangen kann. Leider kann das gewonnene Enzym die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, weshalb es nur in peripheren Organen wirksam ist. In

Studien konnte nachgewiesen werden, dass direkt ins Gehirn applizierte therapeutische Gene dort Erfolge brachten. Bei der ex-vivo-Therapie werden autologe hämatopoetische Stammzellen genetisch so verändert, dass sie das fehlende Enzym exprimieren. Anschließend werden sie dem Patienten injiziert und können in den Mikroglia des zentralen Nervensystems wirken, da sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Die große Gefahr einer Abstoßungsreaktion wird dadurch gemindert, dass dem Patienten körpereigene Zellen zugeführt werden (Beck 2018).

Bei CLN2 wird neben der ERT die intracerebrale Injektion von viralen Vektoren (Adeno-assoziiertes Virus 2) untersucht, welche die kodierenden Segmente des *TPP1*-Gens enthalten, um das Gen direkt ins Gehirn zu transferieren. Dies führte im CLN2-Knockout-Mausmodell zur TPP1-Expression im Gehirn und verlangsamte hierdurch das Fortschreiten der neurodegenerativen Vorgänge. Kürzlich wurden Patienten für eine Phase I/II-Studie gesucht (Kohlschütter und Schulz 2016). Diese Studie läuft derzeit, jedoch sind bislang noch keine Ergebnisse publiziert (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01161576>, zuletzt besucht 11.2019).

1.4.8 Chaperone und andere Therapieformen

Auch auf anderer Ebene versprechen kleine Moleküle eine erfolgreiche Therapie, etwa bei der Aktivierung der molekularen Chaperone. Für die Niemann-Pick-Erkrankung Typ C ist bereits eine Therapie mit dem Chaperon „Hitzeschockprotein 70 (HSP 70)“ in der Entwicklungsphase (Beck 2018).

Molekulare Chaperone sind Proteine, sogenannte Faltungshelfer, die natürlicherweise in Zellen vorkommen. Sie haben eine stabilisierende Wirkung auf ihr Zielprotein und verhindern dessen Aggregation. Natürliche Chaperone (z.B. HSP70) binden an neugebildete Polypeptide und verhelfen zur physiologisch funktionellen Struktur. Durch den Einfluss bestimmter Medikamente, z.B. Arimoclomol, können die Transkription und der Aktivierungsstatus der Chaperone, hier HSP70, gesteigert werden und dadurch möglicherweise positive Effekte auf die Faltung des Zielproteins erzielt werden.

Davon abzugrenzen sind pharmakologische Chaperone. Diese sind chemische Verbindungen, die speziell für bestimmte Proteine gestaltet sind und an ihre Zielproteine spezifisch binden. Hierdurch werden die Proteine stabilisiert, und das Voranschreiten der Faltung wird gefördert. Des Weiteren wird der Transport zu den Lysosomen unterstützt, was zu höheren Aktivitätslevels der Enzyme im Lysosom führt (Xu et al. 2016). Zudem kann ein vorzeitiger Abbau des unfertigen Proteins verhindert werden (Valenzano et al. 2011). Die pharmakologischen Chaperone haben ihren großen Vorteil darin, dass die Moleküle ein sehr geringes Molekulargewicht haben. Damit können sie

oral verabreicht werden und problemlos die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Dies resultiert in einer hervorragenden Verteilung in den unterschiedlichsten Geweben. All dies geschieht ohne die Bildung von Antikörpern. Genauer betrachtet imitieren die bisher gefundenen pharmakologischen Chaperone das natürliche Substrat oder den Inhibitor des Enzyms und binden an sein aktives Zentrum. Banning et al. beschrieben 2016 kleine chemische Verbindungen, welche als pharmakologische Chaperone wirkten und für eine vermehrte Prozessierung und höhere Aktivität des von ihnen untersuchten Proteins AGA sorgten (Banning et al. 2016, Xu et al. 2016). Derzeit läuft eine klinische Studie mit 24 Patienten, in welcher das Arzneimittel Cystadane für 48 Monate als Therapie für die Aspartylglukosaminurie getestet wird (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2017-000645-48/FI>, Stand 22.11.2019). Pharmakologische Chaperone erhöhen somit die Stabilität ihres Zielproteins und sorgen für den Transport dessen vom ER zum Lysosom. Dort herrscht ein niedriger pH-Wert, welcher dafür sorgt, dass das Chaperon vom aktiven Zentrum dissoziiert und dem Enzym so seine Aktivität zurückverleiht. Noch vielversprechender sind nicht-inhibitorische pharmakologische Chaperone. Diese binden allosterisch, das heißt außerhalb des aktiven Zentrums, und stabilisieren damit die aktive Konformation des Enzyms (Xu et al. 2016).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Derzeit ist die Enzymersatztherapie für CLN2 zugelassen. Sie ist jedoch eine sehr drastische Maßnahme, da sie maximal invasiv und damit sehr belastend für die Patienten ist. Zusätzlich ist fraglich, inwieweit sie auf Dauer umsetzbar ist, da die Verabreichung des Medikamentes etwa zweiwöchentlich und in Verbindung mit einem ambulanten Krankenhausaufenthalt stattfinden muss, und das lebenslang. In dieser Arbeit wurde nach einer Therapieform gesucht, die einem Teil der Patienten auf einem weitaus einfacheren Wege zugänglich ist, beispielsweise in oraler Darreichungsform, und welche weitaus verträglicher ist als die bisherigen Alternativen.

In den Fokus der genaueren Betrachtung rückte dabei die Chaperon-Therapie. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkungen von Arimoclomol, Celastrol und rekombinantem HSP70 auf unterschiedliche TPP1-Mutationen hinsichtlich der Expression, Prozessierung und Aktivität des Enzyms.

Die beiden erstgenannten Substanzen lösen die Hitzeschockantwort aus und führen damit zu einer gesteigerten Expression von HSP70. Vom Vorhandensein einer höheren Menge an HSP70 erhoffte man sich, dass die Faltungshelfer den Anteil korrekter Proteinfaltungen ursprünglich fehlgefalteter TPP1-Proteine erhöhen und so eine gewisse Aktivität zurückgewonnen werden kann. Hierfür sollte cDNA der Mutationen Asp276Val,

Gly284Val, Ile287Asn und Ser475Leu in pcDNA3 –Expressionsplasmide kloniert werden und die TPP1- Expression sowie -Prozessierung der Mutanten und des TPP1-Wildtyps in HEK293T-Zellen und teilweise in Patientenfibroblasten mittels Western Blot gezeigt werden. Zusätzlich sollte ebendies nach Behandlung mit Arimoclomol, Celastrol und rekombinatem HSP70 erfolgen, sowie ergänzend die jeweilige Enzymaktivität ermittelt werden.

2 Material

2.1 Materialien und Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurden nachfolgend aufgeführte Materialien und Geräte verwendet. Die Hersteller dieser sind den Tabellen ebenso zu entnehmen.

Produktname	Hersteller	Niederlassung
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Neolab	Heidelberg, Deutschland
Blotsystem Criterion™ Blotter	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
CryoPure Röhrchen 1,6 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa	Düsseldorf, Deutschland
Filterpapier	Whatman	Dassel, Deutschland
Frischhaltefolie	Papstar	Kall, Deutschland
Glaskolben	Schott-AG	Mainz, Deutschland
Heizblock HLC	Haep Labor Consult	Bovenden, Deutschland
Incucell-Inkubator	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH	Planegg/München, Deutschland
Inkubationshaube TH15	Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Kompaktschüttler KS15	Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Küvetten (Polystyrol/Polystyrene)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Lichtmikroskop (AE31)	Motic	Wetzlar, Deutschland
Mikroplatte OptiPlate-96 F schwarz	Perkin Elmer	Baesweiler, Deutschland
Mikroplattenleser TECAN Infinite M200	TECAN	Crailsheim, Deutschland

Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	Whatman	Dassel, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	Brampton, Kanada
Pasteurpipetten aus Glas (230mm)	VWR International	Darmstadt, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße PP	nerbe plus GmbH	Winsen/Luhe, Deutschland
Pipetten (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, Multipette plus)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipetten Pipetman (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)	Gilson Deutschland	Limburg, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND	Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Real-Time PCR System CFX Connect™	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
Rollenmischer RM5	Ratek Instruments Pty Ltd	Victoria, Australien
Röntgenfilm Super RX-N	FUJIFILM	Düsseldorf, Deutschland
Rotator	neoLAB Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
SDS-Gel-Gießkammer	GE Healthcare	München, Deutschland
SDS-PAGE Kammer	GE Healthcare	München, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS	ThermoFisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Spannungsquelle EPS 301	GE Healthcare Life Sciences	München, Deutschland

Spektrophotometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Thermozykler Biometra T-Personal Combi	Biometra GmbH	Göttingen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator SONOPULS GM3100	BANDELIN electronic GmbH & Co.KG	Berlin, Deutschland
Vortex-Schüttler V-1	PEQLAB	Erlangen, Deutschland
Waage PB602-S	Mettler Toledo	Gießen, Deutschland
Wasseraufbereitungssystem Elix® Essential 5 UV	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, Deutschland
Wasserbad AQUAline AL 12	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Western-Blot-System Criterion™ Blotter	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
Wippschüttler (WS-10)	Edmund Bühler GmbH	Hechingen, Deutschland
Zellkultur-Flaschen	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten TC-Platte (6 Well, 12 Well)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-Schalen (6 cm)	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Heraeus™ Fresco 17	ThermoFisher Scientific	Dreieich, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Zentrifuge MICRO 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland

Zentrifuge MICRO 22R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen PP (15ml, 50ml) CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte des jeweilig genannten Herstellers sowie dessen Niederlassung

2.2 Chemikalien und Puffer

Tabelle 3 und Tabelle 4 zeigen die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung mit den jeweiligen Herstellern und deren Niederlassungen.

Bezeichnung	Hersteller	Niederlassung
2-Mercapthoethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
AAF-AMC (A3401)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Aminosäuren, nicht essentielle (MEM NEAA 100x)	gibco™, Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Ampicillin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Bradford Reagenz	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe, Deutschland
BSA (Rinderserumalbumin)	PAA	Cölbe, Deutschland
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Desthiobiotin	IBA GmbH	Göttingen, Deutschland

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (für Mutagenese)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Applichem	Darmstadt, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	Applichem	Darmstadt, Deutschland
FCS (Fötales Kälberserum)	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Gibco™, Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland	Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Applichem	Darmstadt, Deutschland
HABA	IBA GmbH	Göttingen, Deutschland
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Fluka	Buchs, Schweiz
Lysozym	Roth	Karlsruhe, Deutschland
MACSfectin™	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat 100mM (100x)	gibco™, Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland

Opti-MEM	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	Karlsruhe, Deutschland
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen™, ThermoFisher Scientific	Karlsruhe, Deutschland
PFA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Pfu-Turbo-Polymerase	Agilent Technologies	Santa Clara, United States
PIPES	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Proteinmarker (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standard)	BIO-RAD Laboratories GmbH	München, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sepharose-Glutathion- Beads (Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow)	GE Healthcare Life Sciences	München, Deutschland
Sterilium classic pure	Dode	Hamburg, Deutschland
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (stark)	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (schwach)	Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)- ethan)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tris	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	gibco™, Thermo Scientific	Dreieich, Deutschland
Tween-20	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Xylencyanol	Applichem	Darmstadt, Deutschland
-------------	-----------	------------------------

Table 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungen des jeweilig genannten Herstellers sowie dessen Niederlassung

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween-20) 5% Milchpulver
Blotpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% MeOH (Vol.)
DMEM++ (4,5 g/l Glucose)	89% DMEM 10% Fötale Kälberserum 1% Penicillin / Streptomycin
DMEM++++ (4,5 g/l Glucose)	87% DMEM 10% Fötale Kälberserum 1% Penicillin / Streptomycin 1% Pyruvat 1% nicht-essentielle Aminosäuren
DNA-Ladepuffer	75% Glycerin (Vol.) 2 mg/ml Bromphenolblau 4 mg/ml Xylencyanol 50 mM EDTA
DRAMA Marker	eigene Herstellung AG Tikkanen
ECL-Lösung (verstärkte Chemielumineszenz – Lösung)	100 mM Tris-HCl (pH 8,5) 1,25 mM Luminol 0,2 mM Cumarinsäure
Fixierungspuffer (4% PFA)	80 mM Pipes (pH 6,8) 2 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA (pH 8) 4% PFA
Glycerin-Stock-Puffer	65% Glycerin (Vol.) 0,1 M MgSO ₄ 25 mM Tris (pH 8)

Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB (Luria/Miller)-Medium	20 g LB broth 1 l dd H ₂ O
LB-Agar	15 g Agar-Pulver 1 l LB Medium
Lyse-Puffer	50 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Natriumacetatpuffer (TPP1-Aktivitätsassay)	50 mM NaAc (Essigsäure pH 4,7) 100 mM NaCl
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄
Ponceau-Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure
Proteinladepuffer (1x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 10% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 25 mM DTT
SDS-Polyacrylamidgel: Sammelgel (4%)	11,7 ml H ₂ O 624 µl 3 M Tris (pH 6,8) 75 µl SDS (20%) 2,55 ml Acrylamid 22,5 µl TEMED 75 µl APS
Trenngel (10%)	21 ml H ₂ O 5 ml 3 M Tris (pH 8,8) 200 µl SDS (20%) 13,4 ml Acrylamid 64 µl TEMED 400 µl APS

SOC.-Medium	LB-Medium substituiert mit 20 mM Glukose
Stop-Lösung (TPP1-Aktivitätsassay)	0,5 M EDTA (NaOH, pH 12)
Strep-tag-Protein Reinigungspuffer: Puffer E (Elutionspuffer)	2,5 mM Desthiobiotin 1 mM EDTA 150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8)
Puffer R (Regenerationspuffer)	1 mM EDTA 1 mM HABA 150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8)
Puffer W (Waschpuffer)	1 mM EDTA 150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8)
Substrat (TPP1-Aktivitätsassay)	20 mM AAF-AMC (Alanin-Alanin-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin, A3401 Sigma) in DMSO
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	40 mM Tris (pH 8) 1 mM EDTA
TBST (Tris buffered saline + Tween-20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris (pH 8) 0,1 mM EDTA

Table 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung

2.3 Kits und Säulen

Tabelle 5 enthält eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits und Säulen.

Bezeichnung	Hersteller	Niederlassung
NucleoBond® Xtra Endotoxin-free plasmid DNA purification (Midi- Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co	Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid DNA purification (Mini- Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co	Düren, Deutschland
Strep-Tactin Superflow 1 ml Bettvolumen	IBA GmbH	Göttingen, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Kits und Säulen sowie deren Hersteller mit Niederlassung

2.4 Antikörper

Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die beim Western Blot zum Einsatz gekommenen Primär- und Sekundärantikörper zu entnehmen.

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung Western Blot	Hersteller	Niederlassung
CLN2 (G-3) Sc-393961	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland
GAPDH	Maus	1:10000	Abcam	Eching, Deutschland
HSP70 (W27) Sc-24	Maus	1:20000	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, Deutschland

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Primärantikörper

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung Western Blot	Hersteller	Niederlassung
-------------	------	----------------------------	------------	---------------

HRP	Ziege Maus	α	1:10000	Dako	Hamburg, Deutschland
-----	---------------	---	---------	------	-------------------------

Tabelle 7: Übersicht über den in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Sekundärantikörper

2.5 Primer

In Tabelle 8 sind die eingesetzten Konstrukte dargestellt. Die verwendeten Primer und deren Sequenzen sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Konstrukt	Hersteller des Plasmids	Niederlassung
HSP70-pPR-IBA102	Dr. Annika Jurkat	AG Tikkanen, Universität Gießen
Leervektor pcDNA3	Invitrogen™, Thermofisher Scientific	Dreieich, Deutschland
TPP1 Wildtyp	Prof. Dr. Ritva Tikkanen	AG Tikkanen, Universität Gießen

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten CLN2-Konstrukte

Primer	Sequenz
TPP1 Asp276Val fwd	5' CGGGATTGAGGCCAGTCTAGTTGTGCAGTACCTGAT GAGTG 3'
TPP1 Asp276Val rev	5' CACTCATCAGGTAAGTGCACAAGTACTGGCCTCAA TCCCG 3'
TPP1 Gly284Val fwd	5' GCAGTACCTGATGAGTGCTGTGCGCAACATCTCCAC CTGGG 3'
TPP1 Gly284Val rev	5' CCCAGGTGGAGATGTTGGCAACAGCACTCATCAGGT ACTGC 3'
TPP1 Ser475Leu fwd	5' CCATGGGTGTCCGGAACCTTGGCCTCTACTCCAGTG TTTGG 3'
TPP1 Ser475Leu rev	5' CCAAACACTGGAGTAGAGGCCAAGGTTCCGGACAC CCATGG 3'

Tabelle 9: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Mutagenese-Primer mit ihren Sequenzen

2.6 Humane Zelllinien und Bakterienstämme

In dieser Doktorarbeit wurde mit Patientenfibroblasten und HEK293-Zellen gearbeitet. Die HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenepithelzellen, die sich seit den 1970er-Jahren großer Beliebtheit in der Wissenschaft erfreuen. Die meistverwendete Linie dieser Zellart sind die HEK293T-Zellen. Die Besonderheit der HEK293T-Zellen im Vergleich zu den HEK293-Zellen ist, dass sie das SV40-T-Antigen tragen und damit Vektoren mit der SV40-Replikationsregion replizieren können. Somit können die HEK293T-Zellen für die DNA-Replikation von Retro- und DNA-Viren verwendet werden. Ihr großer Vorteil gegenüber anderen Zelllinien liegt dazu noch darin, dass sie gut kultiviert und transfiziert werden können. Sie finden außerdem besonders gerne Anwendung bei der Untersuchung der Protein-Expression. So wurden die HEK293T-Zellen auch in den Versuchen dieser Doktorarbeit verwendet (Lin et al. 2014, Pear et al. 1993). In Tabelle 10 sind die verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme mit ergänzenden Informationen genannt.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Niederlassung
Escherichia coli Stamm XL1-Blue (Vervielfältigung des eingebrachten Plasmids durch chemisch kompetente Zellen im Rahmen der Mutagenese)	Stratagene	La Jolla, Kalifornien
Fibroblasten, Patientenzellen (Zellen mit Ile287Asn-Mutation (TPP1 Missense) GM09404)	Coriell Institute	USA
Fibroblasten, Wildtyp	Steven Gray	University of Texas, Southwestern, USA
HEK (Human Embryonic Kidney; HEK-293) (adhärent wachsende humane embryonale Nierenepithelzellen)	ATTC	Teddington, Vereinigtes Königreich

Tabelle 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme, die Bezugsquelle derer und weitere Informationen

2.7 Substanzen

In Tabelle 11 sind die Substanzen mit ihrer Bezugsquelle und der Niederlassung aufgeführt, mit welchen die Zellen in der jeweils angegebenen Konzentration behandelt wurden.

Bezeichnung	Konzentration	Bezugsquelle	Niederlassung
Arimoclomol	50 μ M	Carbosynth Ltd.	Compton Berkshire, Vereinigtes Königreich
Celastrol	250 nM	Selleck Chemicals	München, Deutschland
rekombinantes HSP70	300 nM	eigene Herstellung	-

Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Standardmethoden

3.1.1 Kultivierung von HEK- Zellen und Fibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit HEK-Zellen experimentiert, welche in Zellkulturgefäßen im Inkubator bei 37°C, 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert wurden. Als Anzuchtmedium diente DMEM++ mit 4,5 g/l Glucose, welches mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde.

Die Fibroblasten wurden bei gleichen Inkubationsbedingungen, jedoch in anderem Medium kultiviert. Hier wurde DMEM ++++ mit 4,5 g/l Glucose verwendet, welches neben 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin noch 1% Pyruvat (1 mM) und 1% nicht-essentielle Aminosäuren (MEM NEAA) enthielt.

3.1.2 Passagieren von HEK-Zellen und Fibroblasten

Um die in Zellkultur angelegten Zellen weiteren Experimenten zu unterziehen oder die Population aufgrund zu dichten Wachstums zu reduzieren, um sie im jeweiligen Versuch zu erhalten, war eine Passage der Zellen notwendig. Hierzu wurde bei ca. 100 % Konfluenz zunächst das Medium aus dem entsprechenden Kulturgefäß abgesaugt und verworfen. Es folgte eine Waschung der Zellen mit etwa 2 ml PBS, wobei beide Schritte vorsichtig vorgenommen wurden, um eine Irritation der Zellpopulation zu vermeiden. Anschließend wurden 200 µl mit EDTA versetztes Trypsin zugegeben, welches als proteolytisches Enzym durch Spaltung der extrazellulären Proteine die Ablösung der Zellen vom Gefäßboden und die Vereinzelnung dieser bewirkt. Damit es nicht zur Schädigung der Zellen kam, wurde die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C auf etwa 3 Minuten beschränkt. Hatten sich die Zellen nach dieser Zeit gut abgelöst, wurden 450 µl DMEM++ zu den trypsinisierten Zellen gegeben und diese resuspendiert. 200 µl der entstandenen Suspension wurden nachfolgend mittels steriler Pipette in neue Kulturgefäße überführt, welche zuvor mit 5 ml frischem DMEM++ versehen wurden. Die Zellen konnten nun durch Lagerung bei 37°C im Brutschrank im bestehenden Versuch erhalten oder für weitere Experimente genutzt werden. Bei den Fibroblasten wurde vor der Verwendung von Trypsin etwa 2 Minuten lang mit 0,05% EDTA/PBS behandelt.

3.1.3 Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmid-DNA

Um die vermehrte Expression von funktionsunfähigem TPP1 zu untersuchen, wurde die Plasmid-DNA mit und ohne Mutation in die Wirtszellen eingebracht. Es wurde ein DNA : MACSfectin – Verhältnis von 1 : 4 eingesetzt. MACSfectin enthält kationische Lipide, welche in wässrigem Milieu Mizellen bilden, mit denen die DNA komplexiert. Hierbei darf kein Serum anwesend sein. Die entstandenen Komplexe werden endozytotisch in die Zellen aufgenommen, wobei die Plasmid-DNA ins Zytoplasma gelangt und exprimiert wird.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurde in einem Eppendorfgefäß eine Lösung aus 100 µl DMEM-- und 0,4 µg Plasmid-DNA hergestellt. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden 1,6 µl Macsfectin in 100 µl DMEM -- gelöst. Die Flüssigkeiten beider Eppendorfgefäße wurden jeweils vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Schließlich wurde der Inhalt des zweiten Eppendorfgefäßes zum ersten gegeben und das Ganze mit der Pipette durchmischt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Komplexbildung. Während dieser Zeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt (1 ml neues DMEM++), welche erst am Tag zuvor in 12-Well-Platten ausgesät wurden und damit eine optimale Konfluenz (etwa 70-80%) für die Transfektion aufwiesen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung tropfenweise zu den Zellen pipettiert und das Zellkulturgefäß mehrfach axial bewegt, um eine optimale Durchmischung und Verteilung des Inhaltes zu gewährleisten. Abschließend wurde das Gefäß zurück in den Brutschrank gestellt. Am darauffolgenden Tag erfolgte im Rahmen des weiteren Versuchsvorgehens ein Mediumwechsel, welcher die Transfektion beendete. Nun konnten die Zellen auf 6-Well-Gefäße ausgesät und mit den zu prüfenden Substanzen Celastrol, Arimoclomol und rekombinantem HSP70 behandelt werden.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1 Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion lässt sich nicht nur dazu nutzen, DNA zu amplifizieren, sondern auch dazu, planmäßig DNA-Stränge in vitro zu verändern, um beispielsweise Punktmutationen einzubauen. Durch die PCR wird die Sequenz des Gens im Plasmid an der entsprechenden Stelle verändert und vervielfältigt. Als essentieller Bestandteile dieses Vorgehens sind entsprechende Mutageneseprimer notwendig. Diese wurden zuerst in DEPC-behandeltem Wasser aufgelöst, sodass eine 100 µM

Anfangskonzentration entstand. Davon wurden dann jeweils 10 µl Mutageneseprimer mit 90 µl TE-Puffer vermischt, sodass eine 10 µM Gebrauchslösung entstand. In 0,2 ml-fassende PCR-Eppendorfgefäße wurden hiernach folgende PCR-Ansätze pipettiert: 40,5 µl H₂O, 0,5 µl Plasmid-DNA (100-250 ng), 5 µl 10xPCR-Puffer, 1 µl Primer forward (10 µM), 1 µl Primer reverse (10 µM), 1 µl dNTPs, 1 µl Pfu-Turbo-Polymerase. Im Thermocycler wurde dann die eigentliche PCR gestartet, indem die Plasmid-DNA zu Beginn einmalig für 5 Minuten durch eine Temperatur von 95°C denaturiert und so in ihre Einzelstränge zerlegt wurde. An dieser Stelle beginnt nun der erste Zyklus: für eine Minute fand die Hitzedenaturierung der DNA bei 95°C statt, um sie in Einzelstränge zu zerlegen. Es folgte für eine weitere Minute bei 65°C das sogenannte „Annealing“, bei dem sich je Einzelstrang der entsprechende Primer an seinen gegensätzlichen Sequenzabschnitt anlagert. Nachfolgend wurde die Temperatur für 12 Minuten auf 68°C angehoben. Bei dieser hat die eingesetzte Pfu-Turbo-Polymerase ihr Temperaturoptimum. Der Zyklus wiederholte sich insgesamt 18 Mal. Nach dem 19. Zyklus wurde die Temperatur für weitere 7 Minuten auf 68°C gehalten, um der Polymerase zu erlauben, die Stränge vollständig zu synthetisieren. Zum Schluss wurde die Temperatur auf 10°C gesenkt und die PCR damit beendet.

Um die multiplizierte DNA zu extrahieren, kam eine Ethanol-fällung zum Einsatz. Hierfür wurden 50 µl des PCR-Ansatzes mit 5 µl 3 M Na-Acetatlösung gründlich gemischt. Dazu wurden 110 µl kaltes Ethanol (100%) gegeben, was ebenfalls gründlich untergemischt wurde. Schließlich wurde die Probe über Nacht bei -20°C belassen. Am nächsten Tag wurde sie für 10 Minuten bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet vorsichtig mit 200 µl eiskaltem Ethanol (80%) gespült und für 5 Minuten bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Nach dem Trockenvorgang wurde es in 22,5 µl Wasser gelöst.

Die für die Mutagenese verwendete parentale Plasmid-DNA ist methyliert, synthetisch erzeugte DNA hingegen nicht. Genau an dieser Stelle greift das Restriktionsenzym DpnI ein, welches nur methylierte DNA schneidet. Mit dieser Eigenschaft ist es optimal dazu geeignet, den nichtmutierten parentalen DNA-Strang des Plasmids zu verdauen, womit allein der mutagenisierte DNA-Strang intakt bleibt. Die Durchführung des Verdaus erfolgte folgendermaßen: Zunächst wurden 22,5 µl der Probe mit 2,5 µl 10x CutSmart-Puffer versetzt. Dazu wurde 1 µl DpnI gegeben. Bei einer Temperatur von 37°C erfolgte der Verdau für eine Stunde. Schließlich wurde das Restriktionsenzym bei 80°C für 10-20 Minuten hitzeinaktiviert.

3.2.2 Transformation

Für jede durchgeführte Mutagenese wurde ein Eppendorfgefäß mit 100 µl XI1-Blue-Zellen auf Eis aufgetaut. Jeweils 10 µl der Mutagenese-Reaktion wurden zu den kompetenten Zellen gegeben und für 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 42°C für genau 90 Sekunden und die erneute Lagerung auf Eis für 5 Minuten. Es wurden dann 500 µl LB SOC.-Medium hinzugefügt und die Eppendorfgefäße für 60 Minuten bei 37°C und 220 rpm in den Schüttelinkubator gegeben. Nachfolgend wurden die E.coli-Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin mittels einer Impföse ausplattiert. Die LB-Platte wurde über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt.

3.2.3 Plasmidpräparation (Mini)

Am Tag nach der Transformation erfolgte die Wachstumskontrolle der ausplattierten Zellen. Waren Kolonien gewachsen, so wurden jeweils drei von ihnen gepickt und in Bakterienröhrchen mit jeweils 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt. Diese Röhrchen wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 220 rpm geschüttelt.

Der Inhalt der Bakterienröhrchen wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und je 2 ml des Inhaltes in 2 ml-Eppendorfgefäße pipettiert. Diese wurden für 5 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Wieder wurden je 2 ml aus den Bakterienröhrchen zu dem Pellet gegeben, erneut abzentrifugiert und der Überstand komplett verworfen. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde das Plasmid DNA purification – System (Macherey-Nagel) verwendet. Dazu wurden jeweils 250 µl Resuspension Buffer (A1) auf das Pellet gegeben und solange kräftig gemischt, bis das Pellet vollständig resuspendiert war. Dann wurden 250 µl Lysis Buffer (A2) zugegeben, vorsichtig vermischt und genau 5 Minuten inkubiert. Danach wurden 300 µl Neutralization Buffer (A3) hinzugefügt und das Ganze kurz per Hand geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur, um das Lysat zu klären. Nun wurden die NucleoSpin®Plasmid-Säulen in Eppendorfgefäße gesteckt und der Überstand der Lysate in diese hineinpipettiert. Es wurde dabei sorgfältig darauf geachtet, das Präzipitat nicht mit in die Säulen zu geben. Nachfolgend wurde für eine Minute bei 11000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Zum Waschen der in den Säulen gesammelten DNA wurden 500 µl Wash Buffer (AW) in die Säule pipettiert und erneut wie oben zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend erfolgten ein weiterer Waschschrift mit 600 µl des Wash Buffers (A4) und

eine Zentrifugation bei 11000 Umdrehungen pro Minute für 1 Minute. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zum Trocknen erneut für 2 Minuten bei 11000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Säulen wurden zur Elution in frischen Eppendorfgläsern platziert. Jeweils 50 µl Elution Buffer (AE) wurde zum Lösen der DNA aus den Filtern auf diese aufpipettiert und für eine Minute bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Anschließend wurde für eine Minute und 11000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchlauf in neue Eppendorfgläser umgefüllt. Um zu kontrollieren, wie viel DNA der gewonnene Durchlauf nun enthielt, wurde spektrofotometrisch die DNA-Konzentration bestimmt. Zunächst wurden hierzu je Messstelle auf der Tecan Nanoquant-Platte 2-3 µl Elution Buffer AE aufpipettiert und als Leerwert gemessen. Anschließend wurden dieselben Messstellen mit jeweils 2 µl DNA beschickt und gemessen. Die fertigen DNA-Proben wurden schließlich zum Sequenzieren an Eurofins geschickt.

3.2.4 Plasmidpräparation (Midi)

Vorausgesetzt, die Mutagenesen waren erfolgreich, konnte mit der Midipräparation und der Gewinnung größerer Mengen DNA fortgefahren werden. Zur Sicherung der Proben wurden zusätzlich Glycerinstocks eingefroren. Hierzu wurden jeweils 900 µl Übernachtskultur mit 900 µl Glycerin-Stock-Puffer gemischt und in mit einem Barcode versehenen Cryo-Röhrchen eingefroren.

Für die Midipräparation wurde zunächst eine Kultur angelegt: Je 200 ml LB-Medium mit Ampicillin wurden in einen Erlenmeyerkolben eingefüllt und 1 ml der E.coli-Vorkultur zugegeben. Das Gemisch wurde vorsichtig resuspendiert und über Nacht in den Schüttelinkubator bei 220 rpm und 37°C gestellt. Am darauffolgenden Tag wurde dann die optische Dichte gemessen, und das passende Volumen für 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute und 20°C in der Beckman-Coulter-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände wurden dann entsorgt und die Pellets bei -20°C eingefroren oder sofort weiterbearbeitet. Am selben oder nächsten Tag wurde die Midipräparation mit dem Endotoxin-free Plasmid DNA Purification-System (Macherey-Nagel) fortgesetzt. Hierfür wurden je 16 ml gekühlter Resuspension Buffer (RES-EF) auf die gefrorenen Zellpellets gegeben und diese auf dem Rollenmischer komplett gelöst. Anschließend wurden je 16 ml Lysis Buffer (LYS-EF) hinzugefügt und sanft vermischt. Es erfolgte die Lyse für genau 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Neutralisation mit je 16 ml Neutralization Buffer (NEU-EF) und die fünfminütige Lagerung auf Eis. Zwischenzeitlich wurden je 15 ml Equilibration Buffer (EQU-EF) auf den Filterrand der Säulen gegeben, um diese vollständig zu benetzen. Die Lysate in den

Zentrifugenröhrchen wurden noch dreimal auf den Kopf geschwenkt und dann langsam in die entsprechenden Säulen geschüttet. Jeweils 5 ml Wash Buffer (FIL-EF) wurden danach eingefüllt und die Filter nach dieser Waschung verworfen. Dann wurde die Säule mit etwa 35 ml Wash Buffer (ENDO-EF) befüllt und danach mit 15 ml Wash Buffer (WASH-EF). Beide Male wurde der Durchlauf verworfen. Je Säule wurden nun 5 ml Elution Buffer (ELU-EF) eingefüllt, um die DNA aus der Säule auszuwaschen. Der Durchlauf wurde in einem neuen Röhrchen aufgefangen und bei Raumtemperatur mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und gründlich gemischt. Die Suspension wurde für 20 Minuten bei 15000 g und 10°C zentrifugiert und die Eppendorfgefäße wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag wurde die Suspension zunächst bei 15000 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Danach wurden je 2 ml 80%iges Ethanol zugegeben und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde mithilfe einer Pipette vorsichtig entfernt und das Pellet an der Luft für etwa 15 Minuten trocknen gelassen. Schließlich wurde es in 100 µl TE-EF-Buffer gelöst. Auch nach der Midipräparation erfolgte eine Konzentrationsmessung im TECAN-Reader wie im Abschnitt „3.2.3 Plasmidpräparation (Mini)“ beschrieben.

3.2.5 Überprüfung der DNA

Zu Beginn wurde ein Agarosegel aus 15 ml verflüssigter Agarose und 1,5 µl Ethidiumbromid als Färbemittel für Nukleinsäuren hergestellt. Die Agarose wurde für etwa eine Minute in der Mikrowelle verflüssigt und danach in einem Falconröhrchen mit dem Ethidiumbromid vermischt. Das Gemisch aus Agarose und Ethidiumbromid wurde in eine Kunststoff-Gießform gegeben und ein Kamm eingesteckt, der zur Aussparung der späteren Taschen diente. Nach Erkalten und damit Verfestigen der Agarose wurde die Gießform entfernt und das Gel in die mit Elektrophoresepuffer befüllte Trennapparatur gelegt. Die erste Tasche des Gels wurde mit 3 µl DRAMA-Marker befüllt, die weiteren Taschen mit 5 µl der zu prüfenden DNAs. Die DNAs wurden zuvor mit einem 6-fachen Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde die Apparatur bei 100 V für 45 Minuten angeschlossen. Die Nukleinsäuren wurden währenddessen nach ihrer Größe aufgetrennt und konnten dann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.2.6 Herstellung von Zellysaten aus HEK- und Fibroblastenzellen

Zum Zwecke der Untersuchung bestimmter Proteine fand die Gewinnung solcher mittels eines Zellaufschlusses der in Kulturen angelegten HEK- und Fibroblastenzellen statt. Grundsätzlich verliefen die nachfolgenden Arbeitsschritte auf Eis. Waren die

Zellkulturplatten nahezu konfluent bewachsen, konnten die Zellen geerntet werden. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen. Die anschließende Ernte geschah ebenfalls in je 1 ml 1x PBS. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst, mit einer Pipette resuspendiert und in 1,5 ml fassende Eppendorfgefäße gefüllt. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 5000 Umdrehungen pro Minute. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen. Je nach Größe des Zellpellets wurden dann etwa 200 µl -Lyse-Puffer für die HEK-Zellen und etwa 80 µl für die Fibroblasten zum Pellet gegeben und mindestens 30 Minuten auf Eis lysieren gelassen. Zwischendurch wurde das Eppendorfgefäß regelmäßig gründlich geschüttelt, im Falle der Fibroblasten wurden zusätzlich 2 Ultraschallstöße mit einer Amplitude von 95% gegeben. Nachdem das Pellet vollständig gelöst war, wurde das Lysat für 15 Minuten bei 15000 Umdrehungen pro Minute und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt. Das entstandene Pellet aus nicht löslichen Zellbestandteilen wurde verworfen.

3.2.7 Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentration

Die erhaltenen Zellysate mussten nun bezüglich ihrer Proteinkonzentration aneinander angeglichen werden, um gleichmäßig konzentrierte Gelproben herzustellen und so für den weiteren Versuchsverlauf vergleichbare Messwerte zu erhalten. Zu Beginn wurden die Konzentrationen mittels eines Spektrophotometers gemessen. Dazu wurden jeweils 2 µl der Lysate mit 1 ml Bradford-Reagenz (zuvor 1:5 mit Wasser verdünnt) vermischt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Das Gerät wurde zuvor mit einer Probe bestehend aus 2 µl Lyse-Puffer und 1 ml 1:5 verdünntem Bradford-Reagenz kalibriert. Die Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Proben für die Gele wurden dann mit Wasser aneinander angeglichen.

Da die Proteinkonzentrationen der Fibroblastenlysate sehr gering waren, wurde hier mit einer anderen Technik gemessen. Dazu wurden Triplets der Lysate, bestehend aus 10 µl 1:25 vorverdünntem Lysat und 200 µl 1:5 vorverdünnter Bradfordlösung auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Als Referenz wurden Triplets der BSA-Standardreihe aufgetragen (10 µl Probe und 200 µl 1:5 vorverdünnte Bradfordlösung). Bei einer Absorption von 595 nm wurden die Proteinkonzentrationen in einem Mikroplattenleser (TECAN Infinite M200, Magellan) gemessen.

3.2.8 SDS-PAGE

Die Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung des Proteingemisches nach der Größe der enthaltenen einzelnen Proteine. Sowohl der Lauf- als auch der Ladebuffer beinhalten SDS, welches an die Proteine bindet und diesen eine negative Ladung verleiht. Durch die gleichmäßige negative Ladung lassen sich die Proteine bei ihrer Wanderung zur Anode der Kettenlänge nach auftrennen. Die längeren Proteine werden dabei durch die Beschaffenheit des Gels stärker zurückgehalten als die kürzeren. Dazu notwendig ist ein Polyacrylamidgel, welches aus einem die Proteine anhand ihrer Größe auftrennenden Trenngel und einem Sammelgel, welches die Proteine zunächst auf eine Ebene zusammenführt, besteht. Die Herstellung dessen gestaltete sich folgendermaßen: Die Bestandteile des Trenngels wurden wie in Tabelle 4 beschrieben zusammenpipettiert und rasch zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, die durch einen Abstandhalter separiert waren. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel (siehe Tabelle 4) etwa einen Zentimeter hoch auf das Trenngel pipettiert. Ein eingesteckter Kamm diente als Platzhalter für die späteren Taschen. Sobald das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und das Gel vorsichtig aus der Vorrichtung genommen. Nun konnte es in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut werden. In die Taschen wurden die vorbereiteten Proben, die zuvor noch mit 4x Ladebuffer und bei 95°C für 5 Minuten gekocht wurden, vorsichtig hineinpipettiert. Pro Tasche wurden 30 µl eingefüllt. Die erste Tasche wurde als Referenz mit 2 µl Proteinmarker befüllt. Schließlich erfolgte die Auftrennung in 1x Lämmli-Puffer bei 300 V und zunächst 15 mA pro Gel, und sobald das Trenngel erreicht wurde bei 20 mA pro Gel für etwa 60 Minuten.

3.2.9 Western-Blot

Der Western Blot dient der Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran und damit der Bereitstellung dieser für weitere Methoden, beispielsweise Nachweisreaktionen. Für den Transfer der Proteine wurden die Gele aus der Elektrophorese-Apparatur herausgenommen und vorsichtig das Sammelgel abgetrennt. Ein geöffnetes Blotting-Gitter wurde in eine Wanne mit 1x Blotsalz gelegt. Beginnend mit der schwarzen Seite des Gitters wurden folgende Bestandteile in angegebener Reihenfolge aufgelegt: angefeuchteter Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, angefeuchteter Schwamm. Das geschlossene Gitter wurde in eine mit 1x Blotsalz gefüllte und gekühlte Blotkammer gestellt und diese bei 300 V und 400 mA für eine Stunde angeschlossen. Während dieser Zeit wanderten

die Proteine aus dem Gel entlang eines senkrecht zum Gel ausgerichteten elektrischen Feldes auf die Nitrocellulosemembran und blieben dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen im selben Muster haften. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran anschließend mit dem Farbstoff Ponceau S angefärbt, welcher alle Proteine unspezifisch und reversibel färbt. Die Färbung konnte anschließend mithilfe von TBST wieder entfernt werden.

3.2.10 Immundetektion

Zunächst wurden die freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran für 30 Minuten durch eine 5%ige Lösung aus Milchpulver in 1x TBST blockiert. Dieses ist für die Antikörper nicht zu erkennen. Nach einer Waschung mit 1x TBST folgte die Zugabe des primären Antikörpers, der über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper aufgefangen und 5 Waschungen der Membran mit 1x TBST durchgeführt, die jeweils etwa 5 Minuten dauerten. Anschließend erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers für 1 Stunde. Dieser ist mit der Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt, welche die Umsetzung der Derivate von Luminol in deren oxidierte Form katalysiert, bei welcher eine Lumineszenz erkennbar werden kann. Nachdem erneut 5 Waschungen mit 1x TBST für jeweils 5 Minuten durchgeführt wurden, konnte die Membran entwickelt werden. Dazu wurde sie zunächst getrocknet, auf Frischhaltefolie gelegt und eine Lösung aus 1 ml ECL (Chemilumineszenz-Verstärker) und 1 µl 10%igem H₂O₂ (Substrat für HRP) aufpipettiert und gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde die Membran unverzüglich trockengetupft, in transparente Adhäsionsfolie eingeschlagen und in eine Röntgenkassette geklebt. In der Dunkelkammer wurden je nach Signalstärke nacheinander Filme für die Dauer zwischen 1 Sekunde und 30 Minuten aufgelegt und in der Entwicklermaschine entwickelt.

Im Falle eines zu schwachen Signals, beispielsweise häufig zu finden bei Fibroblasten, wurde mit einem stärkeren Reagenz gearbeitet (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Thermo Scientific). Hier wurden 400 µl der schwachen Lösung (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) mit 200 µl der starken Lösung (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate) vermischt, für 3 Minuten inkubiert und danach entwickelt.

3.2.11 Stripping

Um weitere Immundetektionen durchzuführen, gibt es die Möglichkeit, die gebundenen Antikörper mittels Stripping von der Membran zu lösen. Hierzu wurden die Antikörper auf dieser zunächst für 5 Minuten in 0,1 M NaOH denaturiert und dann für 5 Minuten in destilliertem Wasser abgewaschen. Für weitere 5 Minuten wurde die Membran in 1x TBST und dann für 30 Minuten in 5%ige Lösung aus Milchpulver in 1x TBST gelegt.

3.3 Aktivitätsassay

3.3.1 Fluorimetrischer TPP1-Aktivitätsassay (modifiziert nach Lukacs et al.)

Neben der Immundetektion wurde die Enzymaktivität der in dieser Arbeit untersuchten Proteine gemessen. Für den Aktivitätsassay wurde zunächst ein Substratmix aus 375 mM AAF-AMC und NaAc-Puffer vorbereitet. Anschließend wurden pro Lysat Triplikate bestehend aus 1 µl Lysat (siehe 3.2.6), 9 µl NaAc-Puffer und 20 µl Substratmix hergestellt. Die resultierende Konzentration des Substrats AAF-AMC lag bei 0,25 mM. Als Referenz diente ein Ansatz, der statt des Lysates 1 µl NaAc-Puffer enthielt. Über Nacht erfolgte bei 37°C die Inkubation für etwa 22 Stunden. Durch Zugabe und gründliches Durchmischen von jeweils 200 µl Stop-Lösung wurde die Reaktion dann beendet. Für die anschließende Fluoreszenzmessung im TECAN Infinite M200 wurden jeweils 180 µl der Ansätze auf eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm gemessen. Zum Schluss erfolgte die Analyse der Messungen, indem sie auf die Referenz bezogen und gemittelt wurden.

3.4 Herstellung von rekombinantem HSP70

3.4.1 Prinzip der Aufreinigung mittels Twin-Strep-tag

Das Prinzip der Affinitätschromatographie bietet die Möglichkeit, aus einer Lösung verschiedener Stoffe einen bestimmten Stoff aufzureinigen. In unserem Fall haben wir mit dem synthetischen Peptid Twin-Strep-tag gearbeitet, welches durch die Markierung von rekombinanten Proteinen der Isolation und dem Nachweis dieser dient. Aufgrund seiner geringen Größe und seiner inerten Eigenschaft beeinflusst es weder die Proteinfaltung noch die Proteinfunktion.

Das Zwillings-Peptid wird in einen Vektor kloniert, wodurch rekombinante Proteine exprimiert werden, die N- oder C-terminal ein Twin-Strep-tag aufweisen.

Twin-Strep-tag besteht aus insgesamt 28 Aminosäuren und zeigt eine starke Affinität zu Strep-Tactin durch das doppelt enthaltene Strep-tag II (Aminosäuresequenz: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Strep-tag wurde speziell für die Biotin-Bindetasche von Strep-Tactin entwickelt.

Diese hohe Affinität wird zur Isolation des markierten Proteins genutzt. Hierzu dient die sogenannte Strep-Tactin Superflow Säule, welche mit einer speziellen Matrix gefüllt ist, an der Strep-Tactin fixiert ist. Wird nun ein Stoffgemisch in Lösung auf diese Säule gegeben, bindet das markierte Protein mit seinem Twin-Strep-Tag-Ende hoch affin an das Strep-Tactin in der Säule. Die restlichen Proteine binden nicht und können mit einem Waschpuffer ausgewaschen werden. Um das markierte Protein aus der Säule herauszulösen, wird ein Puffer mit Desthiobiotin zugegeben. Desthiobiotin bindet kompetitiv zu Twin-Strep-tag an der Biotin-Bindestelle am Strep-Tactin, wodurch das markierte Protein aus der Säule herausgelöst werden kann. Die nun entstandene Bindung zwischen Desthiobiotin und Strep-Tactin in der Säule ist nur schwach affin, wodurch Desthiobiotin leicht mittels Zugabe von HABA entfernt werden kann. HABA kann schließlich durch einen Waschpuffer herausgewaschen werden und die Säule ist für eine erneute Nutzung vollständig regeneriert.

3.4.2 Aufreinigung des rekombinanten HSP70

Um die Induktion von Proteinen in Bakterien vorzubereiten, wurde eine Übernachtskultur angelegt: Hierzu wurden 4 ml LB-Medium (250 µg/ml Ampicillin enthalten) mit *E. coli* Rosetta (transformiert mit dem Plasmid HSP70-pPR-IBA102) angeimpft. Die anschließende Inkubation erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 220 Umdrehungen pro Minute und einer Temperatur von 37°C über Nacht.

Am darauffolgenden Tag wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml dieser Übernachtskultur angeimpft und fortlaufend einer optischen Dichtemessung bei 600nm Wellenlänge unterzogen (OD_{600}). Sobald die Suspension eine optische Dichte zwischen 0,4 und 0,6 erreicht hatte, konnte die Induktion von HSP70 mit 0,15 mM IPTG bei 20°C folgen. Nach 20 Stunden wurden die Bakterien für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienzellpellet mit eiskaltem 1x PBS gewaschen.

Für die Proteinaufreinigung wurden zum gefrorenen Bakterien-Pellet, welches das mit Twin-Strep-tag markierte rekombinante HSP70 exprimiert, 2 ml Puffer W, 1,5 µM Aprotinin, 23 µM Leupeptin, 1,5 µM Pepstatin A und 1µM PMSF zugefügt. Auf Eis wurde das Pellet gründlich resuspendiert. Um die Zellstrukturen aufzubrechen, wurden darüber hinaus eine Minute lang Ultraschall-Impulse (Sonoplus GM3100,

BANDELIN) mit einer Amplitude von 85% in Intervallen von zwei Sekunden gegeben. Anschließend erfolgte eine Zugabe von Lysozym auf eine Endkonzentration von 200 µg/ml, die gründliche Durchmischung dessen und die Inkubation des Ansatzes für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer. Nachdem die Suspension bei 30 Minuten auf Eis geruht hat, wurden wie zuvor erneut Ultraschallstöße gegeben. Die Entnahme von 50 µl der Suspension diente dazu, eine Kontrolle der Expression und den Anteil von Einschlusskörperchen (Inclusion bodies) zu gewinnen. Der Rest der Suspension wurde in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 24000 g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt. Nach der Äquilibration der Spezialsäule Strep-Tactin Superflow mit 2 ml Puffer W wurde der Überstand auf die Säule gegeben und der Durchfluss in zwei Eppendorfgefäßen aufgefangen. Zum Waschen der Säule erfolgte dann fünf Mal die Zugabe von 1 ml Puffer W, zur Elution des Twin-Strep-tag-Proteins danach sechs Mal die Zugabe von 0,5 ml Puffer E. Sowohl beim Waschen als auch bei der Herauslösung des Twin-Strep-tag-Proteins wurde jeder einzelne Durchlauf in separaten Eppendorfgefäßen aufgefangen. Um die Säule für eine erneute Aufreinigung verwenden zu können, wurde sie mit einer dreimaligen Waschung mit je 5 ml Puffer R regeneriert. Anschließend konnte sie in Puffer W bei 4°C gelagert werden, wobei Parafilm zur Sicherung des Verschlusses diente. Zu jeweils 30 µl des Überstandes der zentrifugierten Suspension, der ersten beiden Durchflüsse, der Waschungen und der Elutionen wurden nun 10 µl 4x Ladepuffer zugefügt. Das aus der Suspension hergestellte Pellet wurde mit 40 µl H₂O und 20 µl 4x Ladepuffer versetzt. Die einzelnen Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C gekocht.

Zur Analyse des Erfolges der Proteinreinigung erfolgte das Auftragen von jeweils 30 µl auf ein Polyacrylamidgel (10%) zur Detektion des rekombinanten HSP70 und die Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Elutionsfraktionen nach Bradford. Dies wurde durch Färbung mit Coomassieblau und Vergleich mit einem BSA-Standard realisiert.

3.5 Statistik

Für die Experimente dieser Arbeit erfolgten mehrere unabhängige Versuchsdurchführungen. Zur Darstellung kommen die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser.

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

4 Ergebnisse

4.1 Experimente mit CLN2-Fibroblasten

Die für die nachfolgenden Versuche verwendeten Fibroblasten waren zum einen humane dermale Fibroblasten als Wildtypzellen und zum anderen Patientenzellen mit der TPP1-Missense-Mutation Ile287Asn mit homozygotem Genotyp CLN^{-/-}. Die Patientenzellen stammen von einer asiatischen Patientin, deren Bruder im Alter von 11 Jahren an derselben Krankheit verstarb. Die Zellen wurden aus einer öffentlichen Zellbank bezogen.

4.1.1 Stimulation der Zellen mit Celastrol

Zu Beginn wurden erste Versuche mit der Substanz Celastrol durchgeführt. Celastrol ist ein Naturstoff, der aus den Wurzeln von *Tripterygium wilfordii*, einem Spindelbaumgewächs aus Ostasien, gewonnen wird. Es induziert die Hitzeschockprotein 70-Familie (HSP70) durch Aktivierung des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors 1 (HSF1) (Chen et al. 2018). HSP70 agiert als Faltungshelfer und bindet an Proteine. Dadurch kann es diesen Proteinen zur korrekten Faltung verhelfen, und verhindert, dass neusynthetisierte lösliche Proteine verklumpen. Es wirkt als molekulares Chaperon (Löffler und Petrides 2003). Celastrol kann zudem die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Damit ist es potentiell geeignet, die korrekte Faltung von TPP1 in Zellen mit einer CLN2-Mutation herbeizuführen und so funktionsfähiges Enzym zu schaffen. Ebenso wird untersucht, ob Celastrol die Konformation des Vorläuferproteins so stabilisiert, dass mehr von diesem nachgewiesen werden kann. Die angewendete Wirkstoffkonzentration lag bei 250 nM.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurden zunächst die Bedingungen für weitere Versuchsabläufe untersucht. Hierzu wurden Kontrollfibroblasten und Patientenfibroblasten mit der Ile287Asn-Mutation herangezogen, welche eine der häufigsten TPP1-Mutationen ist. Als erster Anhaltspunkt diente die Angabe über 39 Behandlungsstunden mit Celastrol, welche auf Erfahrungen aus anderen Studien der Arbeitsgruppe Tikkanen basierte. Abbildung 3 zeigt den Western Blot der jeweils 39 Stunden mit Celastrol behandelten Fibroblasten und der Vergleichsprobe der unbehandelten Zellen. Der unbehandelte Wildtyp zeigt eine mittelkräftige Bande auf Höhe des prozessierten TPP1. Bei Celastrol-Behandlung exprimiert der Wildtyp eine

geringere Menge an reifem TPP1. Bei den Ile287Asn-Zellen wurde kein prozessiertes TPP1 detektiert, weder bei den unbehandelten noch bei den behandelten Zellen. Die Celastrol-Behandlung scheint hier eher für eine Verringerung des TPP1-Vorläufers verantwortlich zu sein. Die jeweilige Abschwächung der Signale kann auf toxische Effekte des Celastrols zurückzuführen sein (Chen et al. 2018).

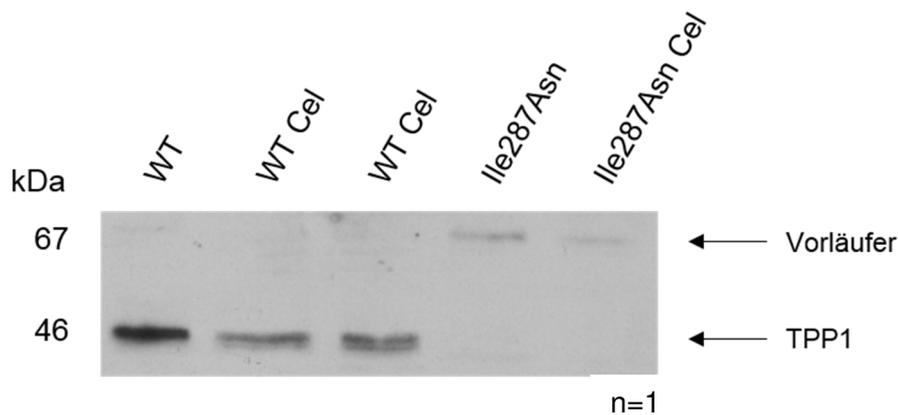


Abbildung 3: Western Blot von unbehandeltem Wildtyp (WT), mit Celastrol behandeltem WT (zwei Ansätze), unbehandeltem Ile287Asn und mit Celastrol behandeltem Ile287Asn: Die Zellen wurden 39 Stunden mit Celastrol behandelt. Nach der Lyse der Zellen und der Auftrennung von jeweils 11,25 µg Protein auf einem 10%igen Gel mittels SDS-PAGE folgten die Immundetektion mit TPP1-Antikörper und die Filmentwicklung. Die geladenen Proteinmengen waren bei allen Proben gleich. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind gekennzeichnet. „n“ ist die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

Um die Expression eines funktionsfähigen TPP1-Proteins zusätzlich auf einer anderen Ebene zu prüfen, wurden photometrische Enzymaktivitätsmessungen durchgeführt. Da der photometrische Assay als sehr sensitiv gilt, war davon auszugehen, dass eine potentielle Aktivität des TPP1-Enzyms im Assay eher erkennbar ist als im Western Blot. In mehreren voneinander unabhängigen Experimenten wurde die Wirkung einer 3-tägigen Celastrol-Behandlung untersucht. Der Aktivitätsassay dazu ist in Abbildung 4 dargestellt. Die TPP1-Aktivität des unbehandelten Wildtyps diente als Referenz. Durch die 3-tägige Celastrol-Behandlung büßte der Wildtyp rund 20% seiner Aktivität ein, was wiederum auf toxische Effekte von Celastrol zurückgeführt werden kann. Die unbehandelte Ile287Asn-Mutation zeigt im Vergleich eine äußerst geringe Enzymaktivität. Durch die Behandlung dieser mit Celastrol konnte kein nachweisbarer Effekt auf die Aktivität von TPP1 erzielt werden. Die Ergebnisse des gezeigten

Aktivitätsassays stimmen mit den Beobachtungen auf den Western Blots überein (zu vergleichen mit dem Western Blot auf Abbildung 5), eine Signifikanz lag nicht vor.

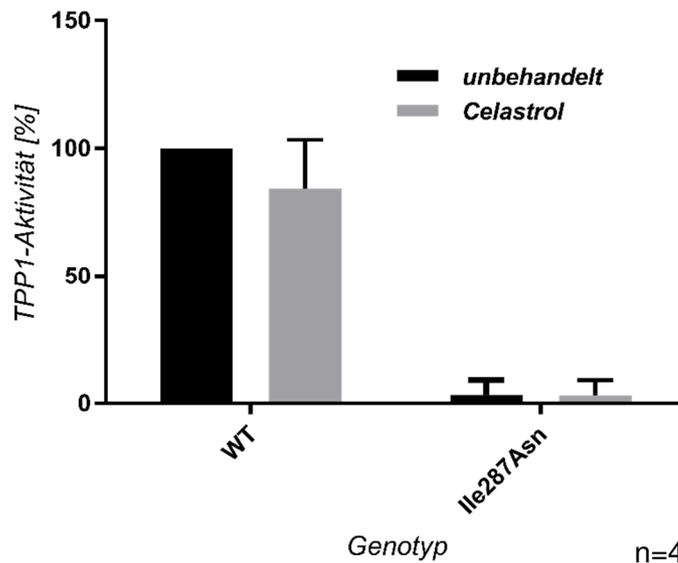


Abbildung 4: Relative TPP1-Aktivität der mit Celastrol behandelten Wildtyp (WT)- und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt vs. 3 Tage behandelt): Es wurden Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat (Alanin-Alanin-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin) hergestellt. Diese wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Die Fluoreszenzmessung von jeweils 180 µl erfolgte bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm im TECAN Infinite M200. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) ist beschrieben.

Da weder die Behandlungsdauer von 39 Stunden noch die von 3 Tagen einen positiven Effekt auf die Expression von TPP1 in den Fibroblasten hatte, wurde eine Zeitreihe angelegt, anhand welcher verschiedene Behandlungszeiten untersucht wurden. Die Fibroblasten mit der Ile287Asn-Mutation wurden für 0 Tage, 2 Tage, 3 Tage, 5 Tage, 6 Tage und 7 Tage behandelt, der Wildtyp wurde für 0 Tage, 3 Tage und 6 Tage behandelt. Wie auf dem Western Blot in Abbildung 5 erkennbar ist, steigt die Expression des TPP1-Vorläufers bei Ile287Asn mit zunehmender Behandlungsdauer bis zu ihrem Maximum bei 7 Tagen an. Bezüglich des prozessierten TPP1 war kein Effekt erkennbar. Der Wildtyp verzeichnete im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zunächst TPP1-Einbußen, welche bei längerer Celastrol-Behandlung allerdings wieder verschwanden. Dies scheint jedoch nicht signifikant zu sein, hingegen eher schlechterem Zellwachstum bzw. der Toxizität von Celastrol geschuldet.

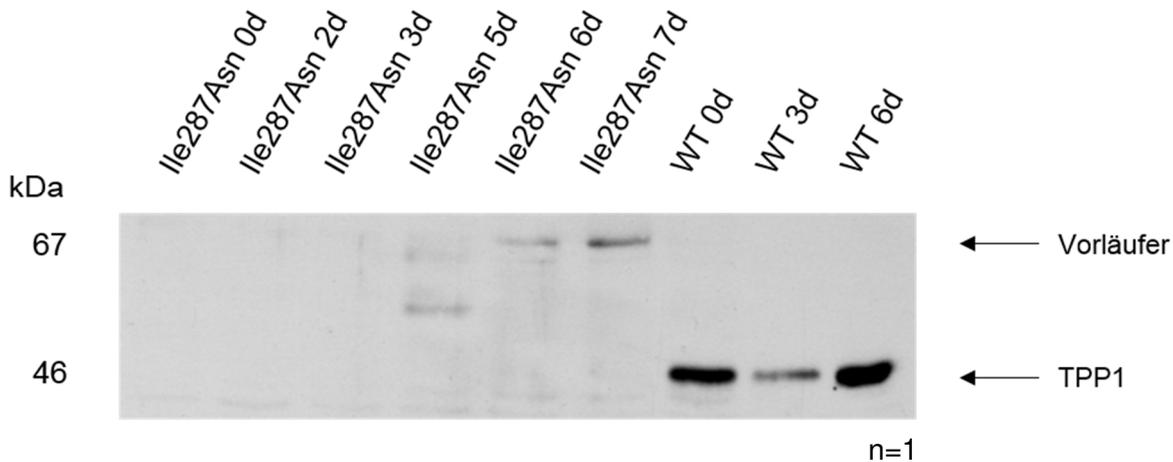


Abbildung 5: Western Blot der Zeitreihe von Ile287Asn und Wildtyp (WT) mit Celastrol-Behandlung wie angegeben (d=days): Die Ile287Asn-Patientenzellen wurden für 0, 2, 3, 5, 6 und 7 Tage mit Celastrol behandelt. Die WT-Zellen wurden für 0, 3 und 6 Tage mit Celastrol behandelt. Durch adäquates Splitten der Zellen wurde eine 100%ige Konfluenz für die Zellernte angestrebt. Nach dieser wurden jeweils 24 μ g Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Es wurden die gleichen Proteinmengen bei allen Proben geladen. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind gekennzeichnet. „n“ bezeichnet die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

Abbildung 6 zeigt zunächst die gemessene Aktivität der mit Celastrol behandelten Wildtypen. In Übereinstimmung mit dem Western Blot ist im Vergleich zum unbehandelten Wildtypen eine minimale Aktivitätsreduktion bei 3-tägiger Behandlung und eine Steigerung bei 6-tägiger Behandlung zu verzeichnen. In der vergleichenden Darstellung ist die verminderte Aktivität der Ile287Asn-Mutante von etwa 10% der Wildtyp-Aktivität deutlich erkennbar. Die Ergebnisse sind nicht signifikant. Die Ile287Asn-Fibroblasten ließen bei unterschiedlicher Behandlungsdauer keine signifikanten Aktivitätsunterschiede erkennen. Aufgrund der Erkenntnisse wurde für die nachfolgenden Versuche eine Celastrol-Behandlungsdauer von 6 Tagen festgelegt. Es ist darauf hinzuweisen, dass das Zeitreihen-Experiment nur einmal durchgeführt wurde.

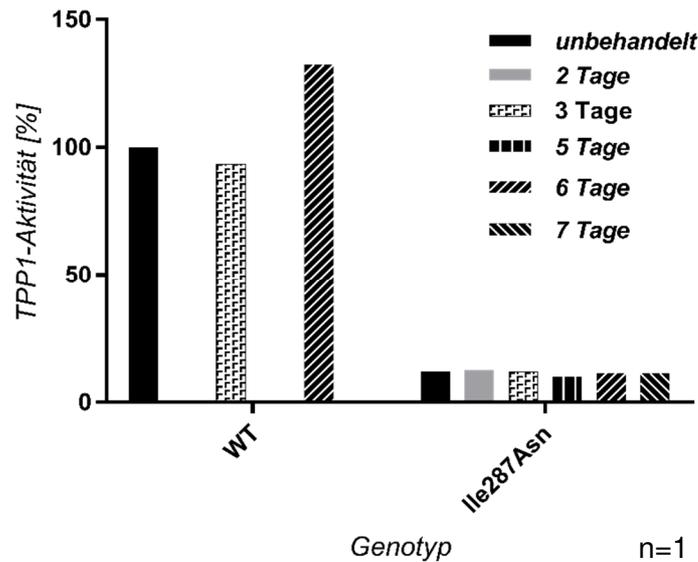


Abbildung 6: TPP1-Aktivität in % der mit Celastrol behandelten Wildtyp- (WT: unbehandelt, 3 Tage, 6 Tage) und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt, 2 Tage, 3 Tage, 5 Tage, 6 Tage, 7 Tage): Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Es folgte die Fluoreszenzmessung (Exzitation 355 nm, Emission 460 nm) im TECAN Infinite M200. „n“ beschreibt die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

4.1.2 Stimulation der Zellen mit Arimoclomol

Die Substanz Arimoclomol ist eine Hydroxylaminverbindung, die, wie Celastrol, bei zellulärem Stress den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 aktiviert. Dadurch wird die HSP70-Produktion angeregt (Kieran et al. 2004). Auch Arimoclomol überwindet die Blut-Hirn-Schranke und hat bei oraler Einnahme eine Bioverfügbarkeit von 80-90% (Orphazyme). Da HSP70 die korrekte Proteinfaltung unterstützt, wurde experimentell untersucht, inwieweit eine durch die Stimulation mit Arimoclomol erhöhte HSP70-Verfügbarkeit in den Zellen Einfluss auf die Expression funktionsfähigen TPP1 nimmt. Die in den Versuchen benutzte Wirkstoffkonzentration betrug 50 µM.

Das in Abbildung 7 gezeigte Experiment wurde mehrfach unabhängig voneinander durchgeführt. Es zeigt die Wildtyp-Aktivität, welche als Referenz auf 100 Prozent gesetzt wurde und den für 3 Tage mit Arimoclomol behandelten Wildtypen, der im Mittel keine signifikanten Unterschiede aufweist, dabei aber eine recht hohe Standardabweichung hat. Das Experiment lässt außerdem erkennen, dass die Ile287Asn-Mutation sowohl unbehandelt als auch nach 3-tägiger Behandlung mit Arimoclomol keine nennenswerte Aktivität aufweist.

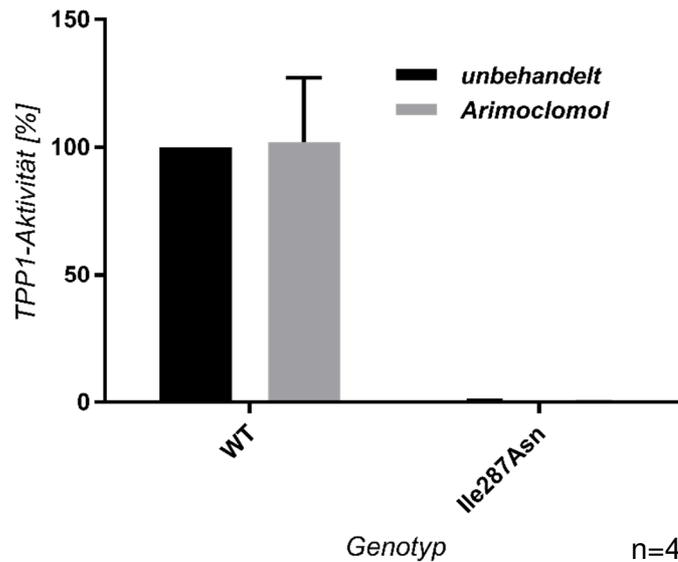


Abbildung 7: Relative TPP1-Aktivität der mit Arimoclomol behandelten Wildtyp (WT)- und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt, 3 Tage): Es wurden Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat hergestellt. Nach 22-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Lösung durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm im TECAN Infinite M200. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) ist gekennzeichnet.

Auch für die Behandlung mit der Substanz Arimoclomol wurde eine Zeitreihe mit denselben Bedingungen wie zuvor angelegt. In Abbildung 8 ist kein Unterschied zwischen den Signalen der unbehandelten Wildtyp-Fibroblasten und dem für 3 Tage behandelten Wildtyp zu erkennen. Bei 6-tägiger Behandlung wird eine Steigerung des prozessierten Proteins sichtbar. Die Fibroblasten mit der Ile287Asn-Mutation exprimieren bei keiner der Behandlungsdauern reifes TPP1, jedoch vermehrt sich das Vorläuferprotein mit zunehmender Behandlungsdauer mit seinem Maximum bei etwa 5 Tagen. Der Western Blot zeigt, dass durch Arimoclomol bei keiner der Behandlungszeiten eine TPP1-Expression in den mutierten Zellen hervorgerufen werden konnte. Der Vorläufer wird durch die Behandlung minimal stabilisiert.

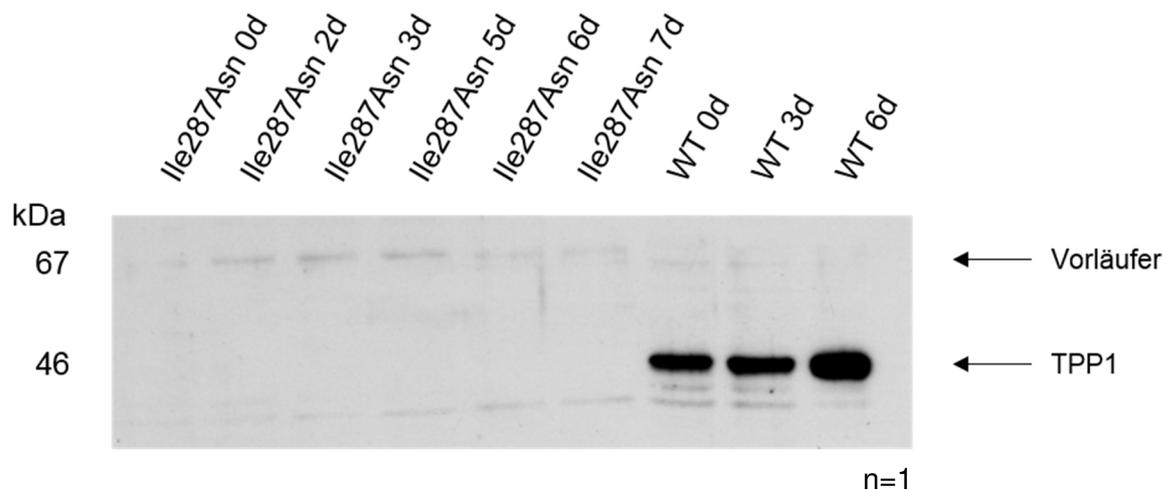


Abbildung 8: Western Blot der Zeitreihe von Ile287Asn und Wildtyp (WT) mit Arimoclomol-Behandlung wie angegeben (d=days): Die Ile287Asn-Patientenzellen wurden für 0, 2, 3, 5, 6 und 7 Tage mit Arimoclomol behandelt. Die WT-Zellen wurden für 0, 3 und 6 Tage mit Arimoclomol behandelt. Durch adäquates Splitten der Zellen wurde eine 100%ige Konfluenz für die Zellernte angestrebt. Nach dieser wurden jeweils 24 μ g Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Es wurden die gleichen Proteinmengen bei allen Proben geladen. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1 und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

Die mit Arimoclomol behandelten Wildtyp-Fibroblasten (Abbildung 9) zeigen eine Aktivitätssteigerung mit zunehmender Behandlungsdauer, passend zum Western Blot. Auffällig ist die Verdopplung der Aktivität bei 6-tägiger Arimoclomol-Behandlung auf über 200% im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar. Auch in dieser Zeitreihe ist bei den behandelten Ile287Asn-Fibroblasten keine messbare Aktivität nachzuweisen. Dies lässt darauf schließen, dass die Arimoclomol-Behandlung der Fibroblasten der Patienten mit der Ile287Asn-Mutation keine Verbesserung bringt. Auch hier wurden die Zellen in den weiteren Versuchen 6 Tage lang mit Arimoclomol behandelt. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass das Zeitreihen-Experiment nur einmal durchgeführt wurde.

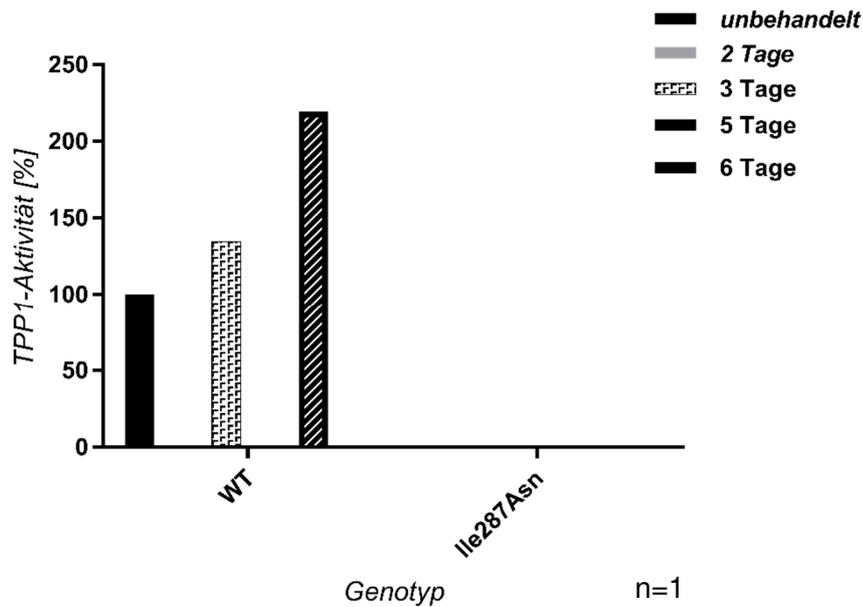


Abbildung 9: Relative TPP1-Aktivität der mit Arimocloamol behandelten Wildtyp- (WT; unbehandelt, 3 Tage, 6 Tage) und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt, 2 Tage, 3 Tage, 5 Tage, 6 Tage, 7 Tage): Es wurden Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat hergestellt. Diese wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Die Fluoreszenzmessung von jeweils 180 µl erfolgte bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm im TECAN Infinite M200. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) ist gekennzeichnet.

Da die Kultivierung der Fibroblasten aufgrund der limitierten Passagierbarkeit schwierig war und die Gewinnung von Lysaten mit verwertbaren Proteinkonzentrationen nicht zuverlässig gewährleistet werden konnte, wurde nachfolgend mit HEK293T-Zellen experimentiert.

4.2 Experimente mit TPP1-Knockout-HEK293T-Zellen

4.2.1 Mutagenese von TPP1-Asp276Val, TPP1-Gly284Val und TPP1-Ser475Leu in das Plasmid pcDNA3

Zu Beginn der Versuche wurden zunächst DNA-Konstrukte folgender TPP1-Mutationen generiert: TPP1-Asp276Val, TPP1-Gly284Val und TPP1-Ser475Leu. Die DNA des Wildtyps und der Ile287Asn-Mutante lagen bereits vor.

Die Mutagenese wurde mittels einer PCR umgesetzt, durch welche der Einbau von Punktmutationen in die Sequenz der pcDNA3-Plasmide erfolgte. Als Enzym diente die Pfu-Turbo-Polymerase. Nach einer Ethanol-fällung folgte ein Verdau des nichtmutierten parentalen DNA-Stranges des Plasmids mit dem Restriktionsenzym DpnI.

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend in Escherichia Coli XL1-Blue transformiert, dort vervielfältigt und später extrahiert. Nach einer Sequenzierung war sichergestellt, dass die Mutagenesen erfolgreich waren (Abbildung 10 - Abbildung 12).

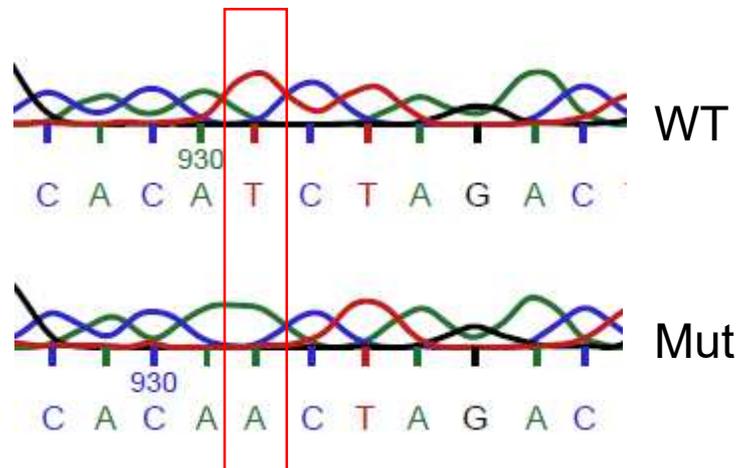


Abbildung 10: DNA-Sequenzen von TPP1-Asp276Val im Vergleich zu TPP1-WT: In der DNA-Sequenz von TPP1-Asp276Val ist die Punktmutation (A>T) im Vergleich zum TPP1-WT zu sehen, das Codon ist von GAT (Asp) zu GTT (Val) verändert. Die Abbildung zeigt die Sequenz des kodogenen Strangs.

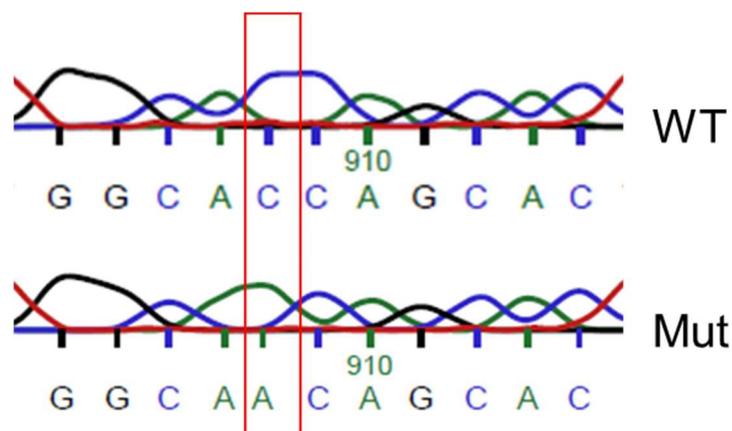


Abbildung 11: DNA-Sequenzen von TPP1-Gly284Val im Vergleich zu TPP1-WT: In der DNA-Sequenz von TPP1-Gly284Val ist die Punktmutation (G>T) im Vergleich zum TPP1-WT zu sehen, das Codon ist von GGT (Gly) zu GTT (Val) verändert. Die Abbildung zeigt die Sequenz des kodogenen Strangs.

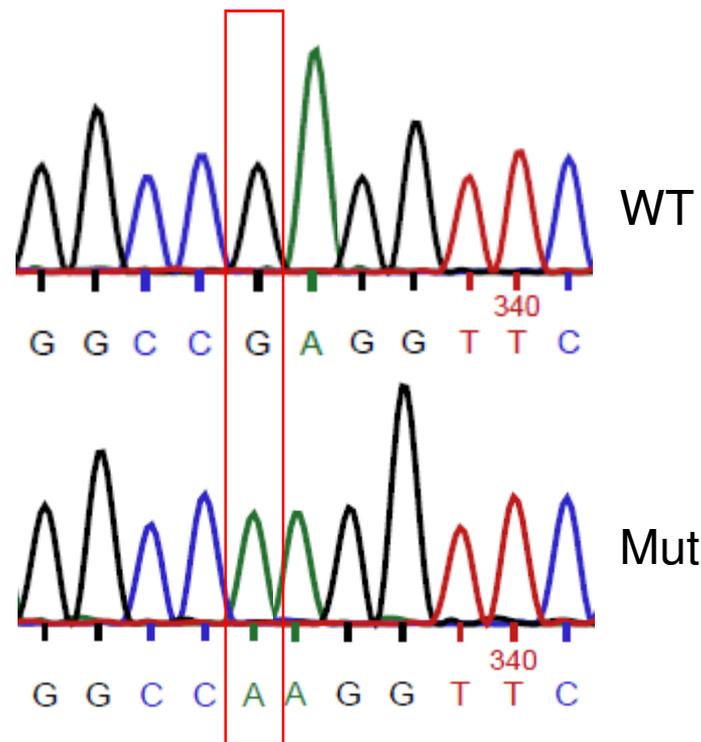


Abbildung 12: DNA-Sequenzen von TPP1-Ser475Leu im Vergleich zu TPP1-WT: In der DNA-Sequenz von TPP1-Ser475Leu ist die Punktmutation (C>T) im Vergleich zum TPP1-WT zu sehen. Das Codon TCG (Ser) wurde dabei zu TTA (Leu) verändert. Die Abbildung zeigt die Sequenz des kodogenen Strangs.

4.2.2 Expression der TPP1-Mutationen in transient transfizierten HEK293T-Zellen

Um die Expression und Aktivität des TPP1-Proteins mit den verschiedenen Mutationen darzustellen und deren Behandlung mit HSP70-fördernden Wirkstoffen zu untersuchen, wurde mit Western Blots und fluorimetrischen Aktivitätsassays gearbeitet. Hierbei stand zu Anfang die transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten. Hierzu wurden HEK293T-Zellen verwendet, die kein endogenes TPP1-Protein auf Grund eines CRISPR/Cas9-vermittelten Knockouts exprimieren sollten. Die Zellen exprimierten nach der Transfektion folgende Missense-Mutationen von TPP1: Asp276Val, Gly284Val, Ile287Asn und Ser475Leu. Diese Mutationen kommen in CLN2-Patienten häufig vor. Nachdem die Zellen transfiziert waren, wurden sie nach einer bestimmten Anzahl von Tagen lysiert und die Lysate anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Ausprägung der Expression von TPP1 der verschiedenen Mutanten und des Wildtyps mit und ohne Behandlung wurde mittels Western Blots gezeigt. Hierbei

diente eine zusätzliche Detektion von GAPDH, einem Haushaltsgen, als Ladekontrolle. Das unprozessierte TPP1-Protein war bei einem Molekulargewicht von 67 kDa zu erwarten, das prozessierte TPP1 bei 46 kDa und die Ladekontrolle GAPDH bei 37 kDa.

Zu Beginn der Arbeit mit den HEK293T-Zellen wurde ein Vergleich des TPP1-Wildtyps mit den TPP1-Mutanten und den nicht transfizierten KO-HEK-Zellen angestellt. Alle Mutanten, mit denen gearbeitet wurde, sind Missense-Mutanten, bei denen durch eine Punktmutation eine Aminosäure ausgetauscht ist. Zwei dieser Mutanten, Asp276Val und Ser475Leu, sind gesondert zu betrachten. Bei diesen ist von einer Mutation im Aktiven Zentrum des Enzyms auszugehen. Dadurch wird das Enzym zwar prozessiert, es kann allerdings kein Substrat mehr umgesetzt werden, was zur Inaktivität des Enzyms führt. Deutlich zeichnen sich im Western Blot auf Abbildung 13 die sehr kräftigen Banden von WT, Asp276Val und Ser475Leu bei 46 kDa ab. Der Wildtyp zeigt als Referenz eine typische Gewichtung von Vorläufer- zu reifem TPP1. Sowohl bei der Asparaginsäure- als auch der Serinmutante sind trotz Missense-Mutation augenscheinlich normale Mengen prozessiertes TPP1 vorhanden, was bei der Serinmutante durch die Mutation im aktiven Zentrum zu erklären ist. Als Besonderheit dieses Blots sollte beachtet werden, dass die Asp276Val-Mutante nur in diesem Versuch eine kräftige TPP1-Bande aufwies. In allen weiteren Versuchen war kein so aussagekräftiges Signal detektierbar. Es ist nicht klar, weshalb die Ergebnisse so unterschiedlich ausfielen. Die Plasmid-DNA wurde überprüft und war in Ordnung. Sie kann somit als Ursache ausgeschlossen werden. Da alle weiteren Blots ein anderes Ergebnis zeigen, ist dieser erste hier anzuzweifeln. Bemerkenswert ist, dass bei den nicht-transfizierten Zellen eine schwache Bande bei 46 kDa zu beobachten ist, die auf eine kleine Menge endogenes TPP1 hinweist. Dies resultiert daraus, dass für diese Versuche HEK293T-Zellen von Klon 45 verwendet wurden, der eigentlich ein TPP1-KO-Klon ist. In dem kodierenden Bereich des TPP1 fehlen jedoch genau sechs Basenpaare. Dadurch ist die Polypeptidkette um zwei Aminosäuren kürzer, man spricht von einer sogenannten „In-frame-Deletion“. Das Leseraster bleibt erhalten und es entsteht ein kleiner Rest an prozessiertem TPP1 mit mehr oder weniger ausgeprägter Proteinfunktion. Ebenso zeigen Ile287Asn und Gly284Val diese schwachen Signale auf Höhe des prozessierten Proteins. Bei Ile287Asn scheint die Stärke des Signals äquivalent zu dem der nicht transfizierten Zellen zu sein. Durch die Fehlstrukturierung des Proteins häuft sich nicht prozessiertes TPP1 an, hier als Vorläuferbande bei etwa 67 kDa sichtbar. Ähnlich ist es bei der Glycin-Mutante. Das Vorläufer-Signal ist stärker als das auf Höhe des reifen TPP1. Letzteres hingegen ist etwas stärker als das endogene Signal der nicht transfizierten Zellen. Eine

sehr kleine Menge TPP1 konnte bei dieser Missense-Mutation prozessiert werden. Wie sich in späteren Versuchen zeigt, war dieses Ergebnis jedoch nicht reproduzierbar.

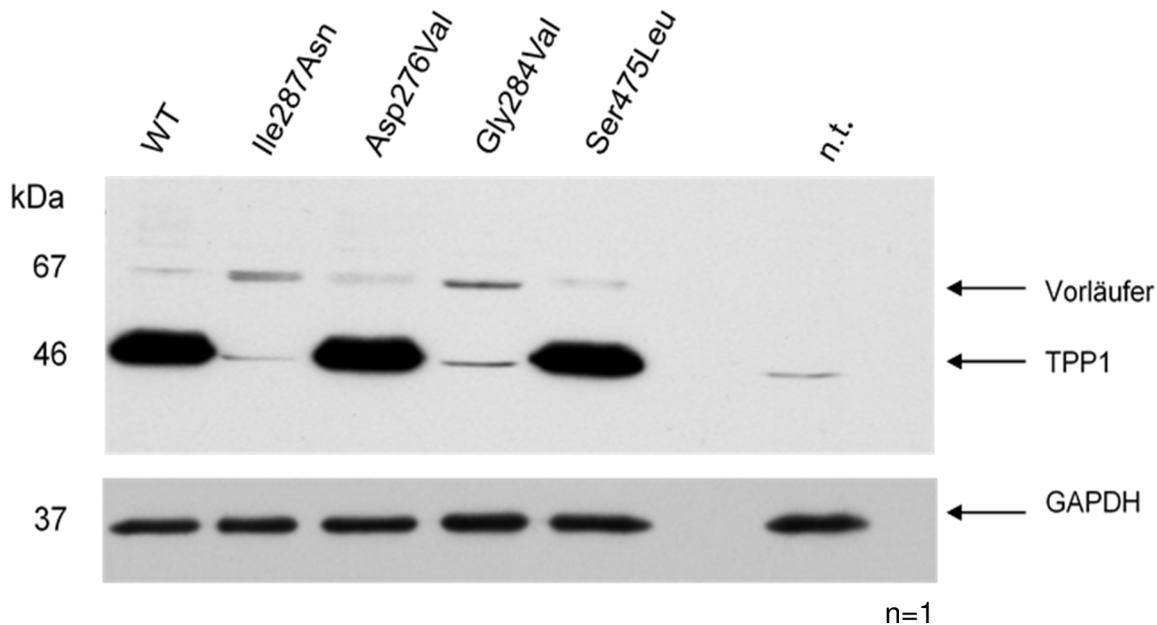


Abbildung 13: *Western Blot von TPP1-WT, Ile287Asn, Asp276Val, Gly284Val, Ser475Leu und nicht transfizierten Zellen (n.t.) unbehandelt:* Der TPP1-WT und die vier TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und diese 7 Tage danach lysiert. Die nicht-transfizierten Zellen wurden als Negativkontrolle mituntersucht. Die Proteinkonzentration nach Bradford wurde bestimmt und jeweils 30 µg Protein auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel gegeben. Es folgte die Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und die Immundetektion mit TPP1-Antikörper. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1 und GAPDH sind gekennzeichnet. „n“ beschreibt die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen ein Vorexperiment mit 6-tägiger Behandlungsdauer mit den Substanzen Celastrol und Arimoclomol.

Die Substanzen Celastrol und Arimoclomol stimulieren die Produktion von natürlichem HSP70 in den Zellen, was die korrekte Faltung von fehlgefalteten und damit funktionsuntüchtigen Proteinen unterstützt. Für alle Versuche über mehrere Tage gilt, dass die Ernte der unbehandelten Zellen am Ende der Zeit erfolgte. In den beiden Western Blots sind die Auswirkungen von Celastrol und Arimoclomol auf den Wildtyp und die Mutationen bei 6-tägiger Behandlung vergleichend nebeneinander dargestellt. Bei den nicht transfizierten Zellen ist wie auch im Versuch zuvor ein schwaches Signal auf Höhe des prozessierten TPP1 zu sehen. Die Besonderheit bei der Verwendung von

Klon 45 (s. oben) gilt es bei der Beurteilung der Blots (Abbildung 14 und Abbildung 15) zu beachten. Für spätere Versuche wurde ein anderer Klon benutzt, der kein verbleibendes Grundsignal hat.

Die Menge an prozessiertem TPP1 wurde im Vorversuch beim Wildtypen durch Arimoclomol leicht verringert, ebenso der Vorläufer. Mit Celastrol fielen Vorläufer und prozessiertes TPP1 etwas kräftiger aus. Die Signale auf Höhe von TPP1 entsprechen bei allen Mutanten außer Ser475Leu dem der nicht transfizierten Zellen und entstammen daher keiner medikamentösen Wirkung. Durch die Behandlung mit Celastrol sind sie jeweils leicht abgeschwächt, was auf toxische Effekte zurückgeführt werden kann. Asp276Val zeigt keinen Vorläufer, das vorhandene Vorläufersignal von Gly284Val scheint durch beide Substanzen abgeschwächt zu werden. Bei der Active-Site-Mutante Ser475Leu ist ein kräftiges TPP1-Signal zu sehen. Bezüglich Arimoclomol kann wenig Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe ausgemacht werden, durch Celastrol scheint etwas mehr TPP1 entwickelt zu werden. Das Vorläufersignal von Ser475Leu ist sehr schwach. Die Ergebnisse sind nicht signifikant.

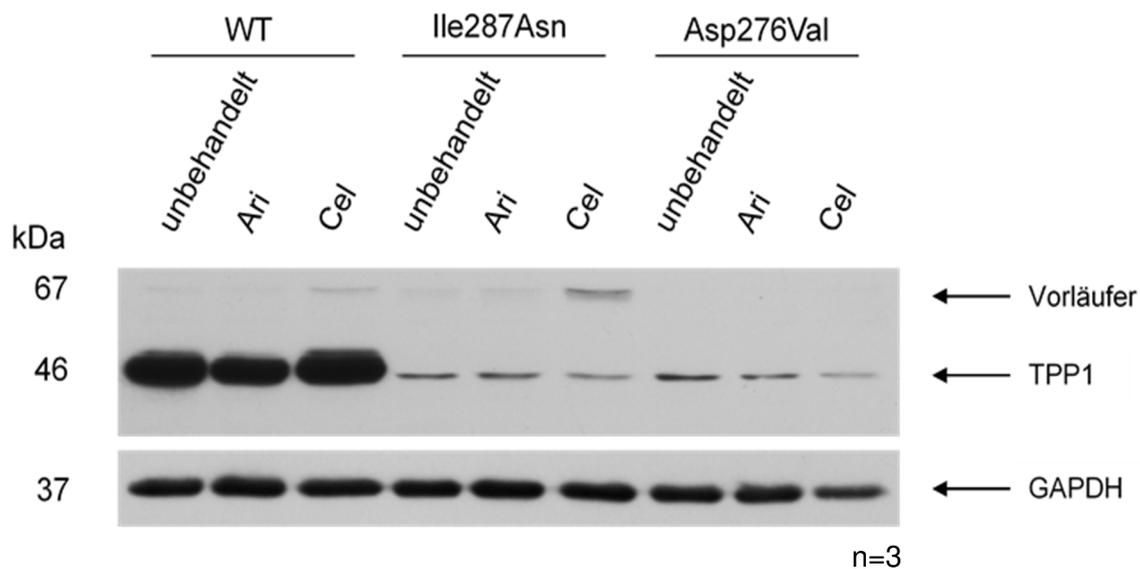


Abbildung 14: Western Blot von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs unbehandelt und mit Arimoclomol- und Celastrol-Behandlung (6 Tage): Der TPP1-WT und die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für jeweils 0 Tage und 6 Tage mit Arimoclomol und Celastrol behandelt. Durch adäquates Splitten der Zellen wurde eine 100%ige Konfluenz für die Zellernte angestrebt. Nach der Ernte und Lyse wurden jeweils 40 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

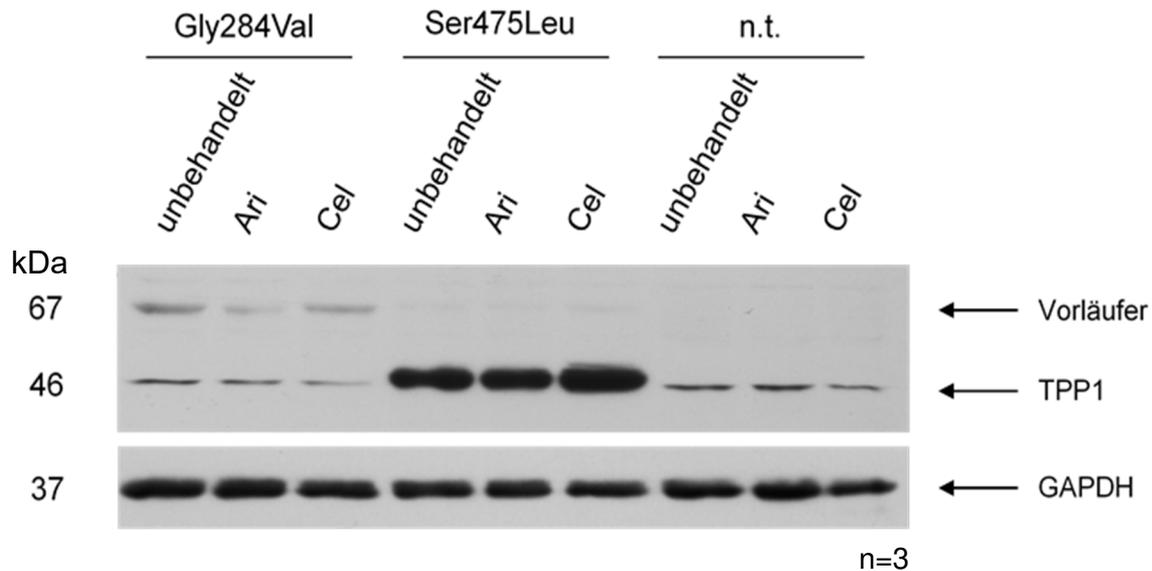


Abbildung 15: Western Blot von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht-transfizierten (n.t.) KO-HEKs unbehandelt und mit Arimoclomol- und Celastrol-Behandlung (6 Tage): Die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für jeweils 0 Tage und 6 Tage mit Arimoclomol und Celastrol behandelt. Durch adäquates Splitten der Zellen wurde eine 100%ige Konfluenz für die Zellernte angestrebt. Ebenso wurde mit den nicht transfizierten Zellen verfahren. Nach der Ernte und Lyse wurden jeweils 40 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

Im Aktivitätsassay konnte mit Arimoclomol beim Wildtyp kein Unterschied erzielt werden, durch die 6-tägige Celastrol-Behandlung aber eine sehr geringfügige, nicht signifikante Steigerung der Aktivität ermittelt werden. In Analogie zu den Western Blots entstanden bei den Mutationen und bei den nicht transfizierten Zellen Signale in zu vernachlässigender Höhe, siehe Abbildung 16.

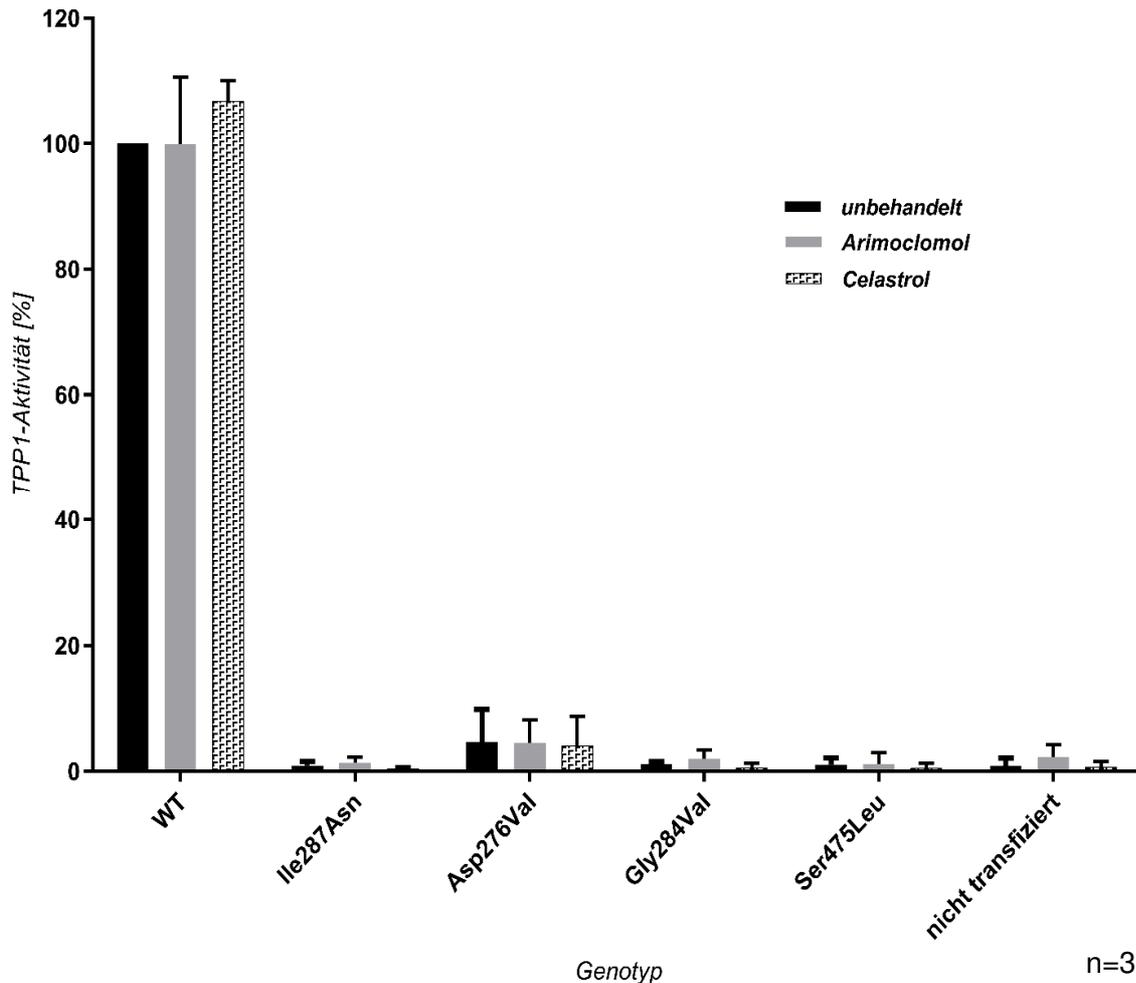


Abbildung 16: Relative TPP1-Aktivität der mit Arimocloamol und Celastrol behandelten Wildtyp (WT)- und Mutanten-KO-HEKs (6 Tage): Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert und nachfolgend durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm fand dann die Fluoreszenzmessung von jeweils 180 µl im TECAN Infinite M200 statt. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen ist beschrieben („n“).

Da mit einer 6-tägigen Behandlung der HEK293T-Zellen keine Prozessierung von TPP1 bei den Mutanten zu erzielen war, wurde auch für diese Zellart eine Zeitreihe angelegt, mit der verschiedene Behandlungszeiten untersucht werden konnten.

4.2.3 Stimulation der Zellen mit Celastrol

Nachdem die Transfektion der TTP1-KO-HEK-Zellen mit den Plasmid-Konstrukten abgeschlossen war, wurden diese in einer Zeitreihe für 0 Tage, 5 Tage und 7 Tage mit der Substanz Celastrol behandelt. Der Zeitreihenversuch wurde als Vorbereitungsversuch nur einfach durchgeführt und diente der Orientierung, mit welcher

Behandlungsdauer der größte Effekt auf die Prozessierung des TPP1 erzielt werden kann. Der Western Blot in Abbildung 17 lässt zunächst die Wirkung der Substanz auf die Wildtyp-Zellen erkennen, welche als Positivkontrolle dienten. Hier ist zu sehen, dass die TPP1-Expression mit zunehmender Behandlungsdauer leicht abnimmt. Die Ile287Asn-Mutation zeigt hingegen auf Ebene des prozessierten TPP1 keine Reaktion auf die Behandlung. Die vorhandene Menge an Vorläufer-Protein reduziert sich durch die Behandlung. Die Asp276Val-Mutante zeigt weder auf Vorläufer- noch auf TPP1-Ebene ein Signal.

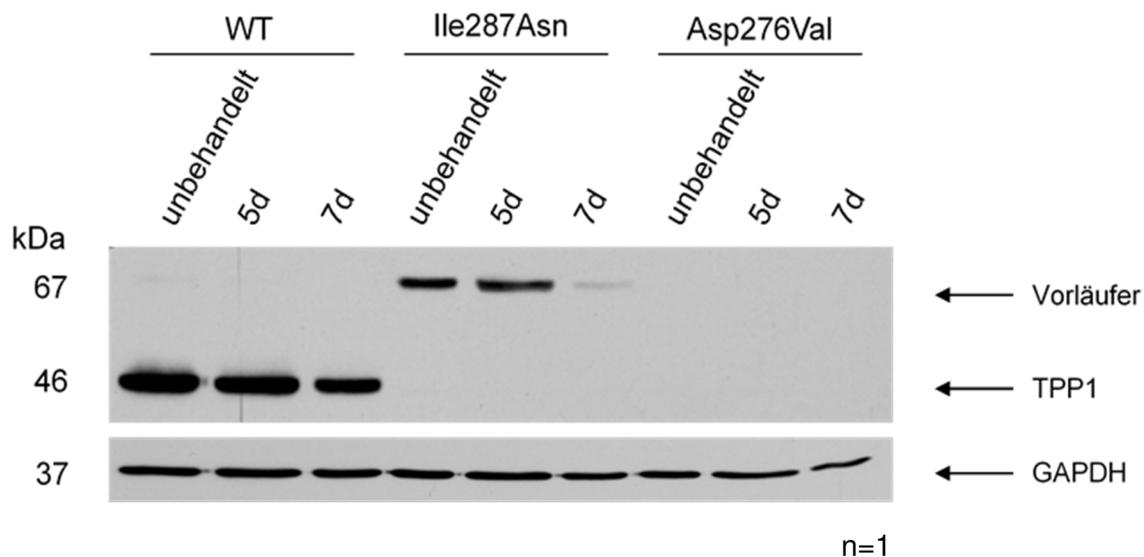


Abbildung 17: Western Blot der Zeitreihe von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs mit Celastrol-Behandlung wie angegeben (d=days): Der TPP1-WT und die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für jeweils 0 Tage, 5 Tage und 7 Tage mit Celastrol behandelt. Nach dem Splitten, der Ernte und der Lyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1 und GAPDH sind gekennzeichnet. „n“ ist die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

Auf die gleiche Art wurde mit den KO-HEKs mit der Gly284Val-Mutation, der Ser475Leu-Mutation und den nicht transfizierten Zellen verfahren. Gly284Val zeigt ebenfalls eine Abnahme des Vorläufers, aber kein reifes TPP1. Ser475Leu hat als Active-Site-Mutante eine kräftige Bande auf Höhe des prozessierten TPP1. Die nicht transfizierten Zellen zeigen als Negativkontrolle kein Signal (Abbildung 18).

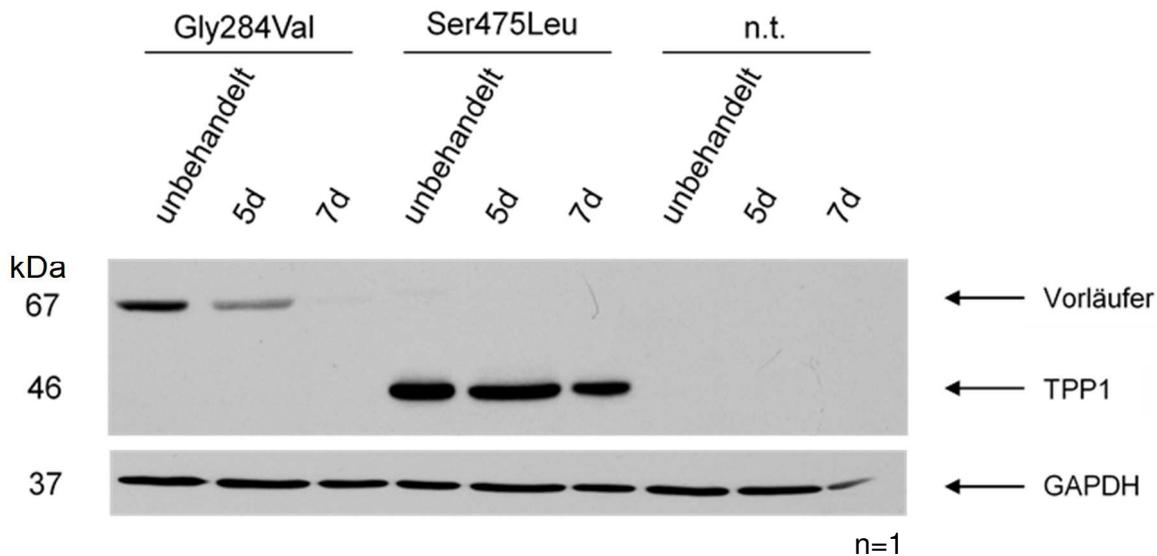


Abbildung 18: Western Blot der Zeitreihe von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht transfizierten (n.t.) KO-HEKs mit Celastrol-Behandlung wie angegeben (d=days): Die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und danach für jeweils 0 Tage, 5 Tage und 7 Tage mit Celastrol behandelt. Durch adäquates Splitten der Zellen wurde eine 100%ige Konfluenz für die Zellernte angestrebt. Ebenso wurde mit den nicht transfizierten Zellen verfahren. Nach der Ernte und Lyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

In Abbildung 19 ist das Ergebnis der Aktivitätsmessung der mit Celastrol behandelten Wildtypen zu sehen. Es zeigt, dass der Wildtyp durch die Behandlung bis zu 50% seiner Aktivität einbüßt. Bei keiner der Mutanten war eine Aktivität zu verzeichnen, weder mit Celastrol noch ohne dieses. Die nicht transfizierten KO-HEK-Zellen zeigten keine Aktivität und dienten als Negativkontrolle. Da keinerlei Effekt der Substanz Celastrol auf das prozessierte TPP1 festgestellt werden konnte, wurde auf eine weitere Untersuchung und auf die Wiederholung des Versuchs verzichtet.

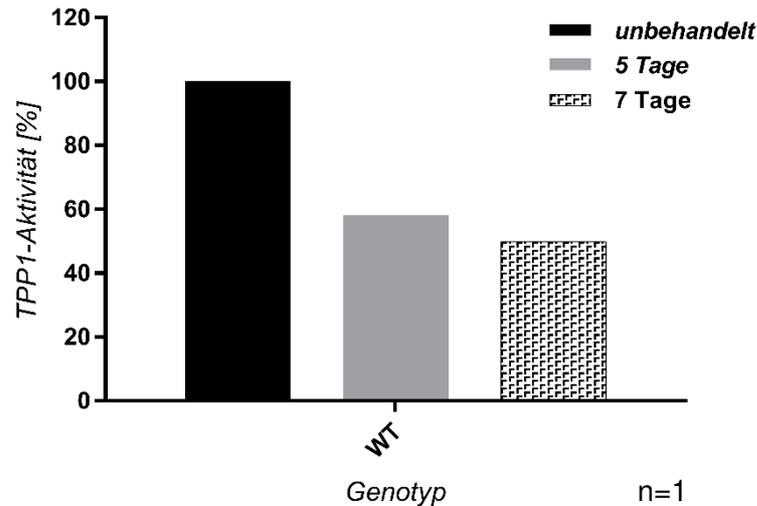


Abbildung 19: TPP1-Aktivität in % der mit Celastrol behandelten Wildtyp (WT)-transfizierten KO-HEKs (unbehandelt, 5 Tage, 7 Tage): Es wurden Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat hergestellt. Diese wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Die Fluoreszenzmessung von jeweils 180 µl erfolgte bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm im TECAN Infinite M200. „n“ beschreibt die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

4.2.4 Stimulation der Zellen mit Arimoclolomol

Auf Abbildung 20 und Abbildung 21 ist die Zeitreihe mit Arimoclolomol dargestellt. Sie lässt erkennen, dass die Menge an Wildtyp-TPP1 mit zunehmender Behandlungsdauer analog zur Zeitreihe mit Celastrol sinkt. Ebenso reduziert sich auch die Menge des Vorläufers bei der Ile287Asn-Mutation, prozessiertes TPP1 ließ sich nicht detektieren. Asp276Val zeigte erneut kein Signal.

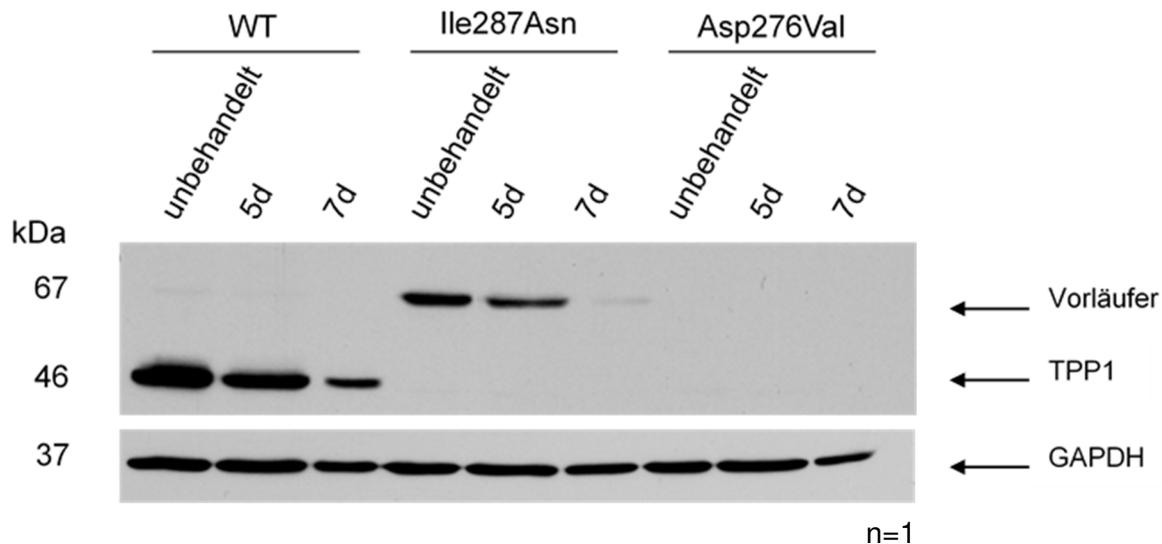


Abbildung 20: Western Blot der Zeitreihe von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs mit Arimoclomol-Behandlung wie angegeben (d=days): Der TPP1-WT und die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für jeweils 0 Tage, 5 Tage und 7 Tage mit Arimoclomol behandelt. Nach dem Splitten, der Ernte und der Lyse wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

Auch bei der Gly284Val-Mutation konnte keine Vermehrung von prozessiertem TPP1 erzielt werden. Der Vorläufer nimmt auch bei zunehmender Behandlungsdauer mit Arimoclomol ab, was in Abbildung 21 gut zu erkennen ist. Die Ser475Leu-Mutante zeigt starke Signale auf TPP1-Höhe, die typisch für die Active-Site-Mutante sind. Diese werden schwächer bei der 5-tägigen und der 7-tägigen Behandlung mit Arimoclomol. Ein äußerst schwaches Vorläufersignal beim unbehandelten Ser475Leu geht durch die Behandlung verloren. Die nicht transfizierten Zellen haben weder Vorläufer- noch TPP1-Signale.

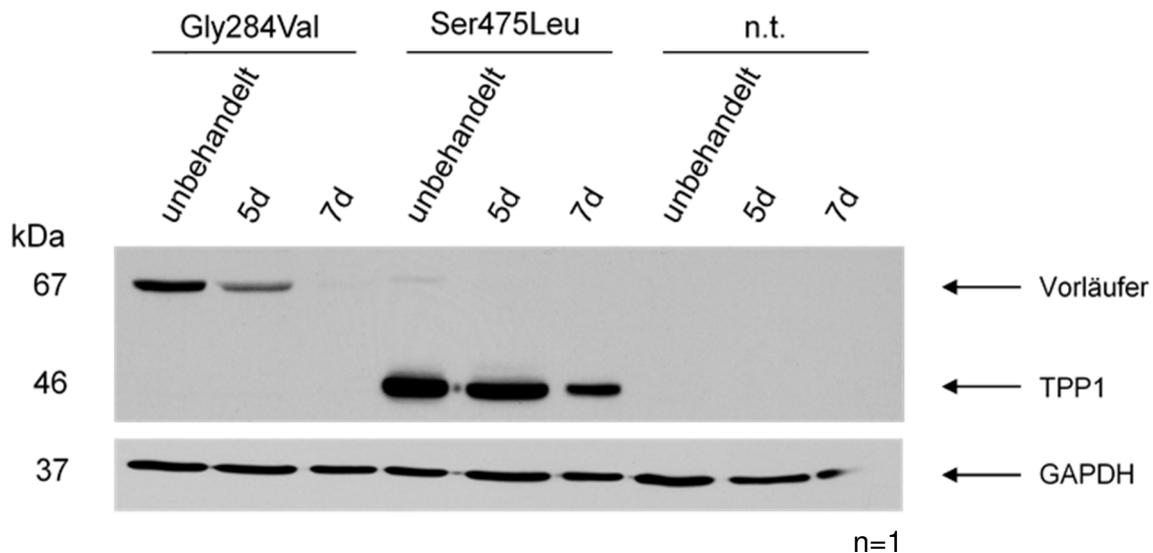


Abbildung 21: Western Blot der Zeitreihe von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht transfizierten (n.t.) KO-HEKs mit Arimoclomol-Behandlung wie angegeben (d=days): Die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für jeweils 0 Tage, 5 Tage und 7 Tage mit Arimoclomol behandelt. Nach dem Splitten, der Ernte und der Lyse wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

In der Aktivitätsmessung (Abbildung 22) verlor der Wildtyp bei zunehmender Behandlungsdauer an Aktivität des TPP1-Proteins. Den Western Blots entsprechend konnte durch die Arimoclomol-Behandlung keine Aktivität der Mutanten erzielt werden, auch die nicht transfizierten Zellen hatten keine Aktivität. Bei dem Zeitreihenexperiment mit Arimoclomol wurde auf die Wiederholung des Versuchs und weitere Untersuchungen verzichtet, da keine signifikante Auswirkung von Arimoclomol auf das reife TPP1 festgestellt werden konnte.

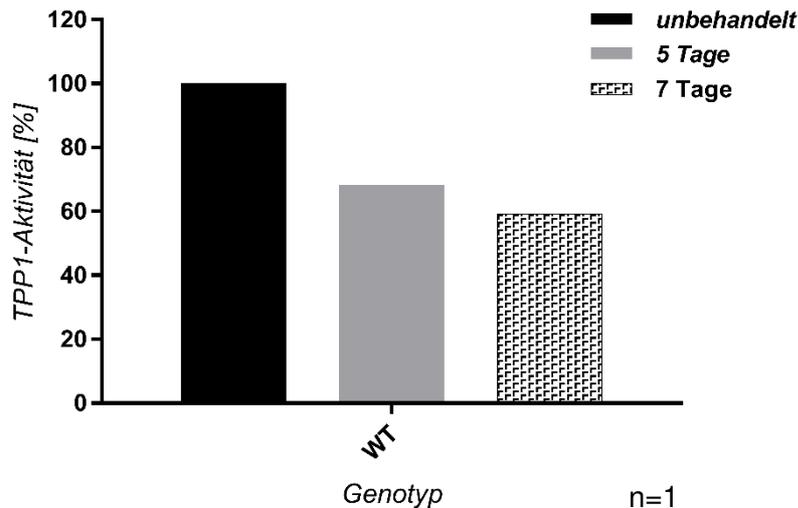


Abbildung 22: TPP1-Aktivität in % der mit Arimocloamol behandelten Wildtyp (WT)-KO-HEKs (unbehandelt, 5 Tage, 7 Tage): Es wurden Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat hergestellt. Sie wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert, abgestoppt (EDTA) und bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm die Fluoreszenz im TECAN Infinite M200 gemessen. „n“ bezeichnet die Anzahl der Versuchsdurchführungen.

4.2.5 Stimulation der Zellen mit rekombinantem HSP70

Mithilfe der Substanzen Celastrol und Arimocloamol wurde versucht, eine Kaskade in Gang zu setzen, welche letztendlich den Hitzeschockfaktor 70 (HSP70) in den mutierten Zellen hochreguliert, sodass dieser als Faltungshelfer agieren kann, um eine korrekte Faltung des TPP1 zu ermöglichen. Da durch die Behandlung mit den beiden Substanzen keine positive Wirkung auf die Expression von TPP1 in den Zellen nachzuweisen war, wurde geprüft, ob die direkte Behandlung mit rekombinantem HSP70 einen Effekt erzielt. Hierzu wurde eine Konzentration von 300 nM und eine Behandlungsdauer von 1 Tag gewählt, da diese Bedingungen bereits in der Arbeitsgruppe Tikkanen genutzt wurden. Zusätzlich wurde mittels eines HSP70-Antikörpers geprüft, ob vermehrt HSP70 in den Zellen zu finden ist.

Auf den Western Blots (Abbildung 23 und Abbildung 24) wird deutlich, dass hohe Mengen an endogenem HSP70 in den Zellen eine Darstellung des aufgenommenen HSP70 unmöglich machen. Das getaggte HSP70 müsste etwas größer sein als das endogene und damit theoretisch sichtbar, jedoch ist es möglicherweise unter der Nachweisgrenze.

Der Wildtyp tritt mit einer starken TPP1-Bande auf, sein TPP1-Vorläufer ist unter der Behandlung mit rekombinantem HSP70 stärker ausgeprägt als unbehandelt. Bei der Ile287Asn-Mutation ist mit Behandlung ein minimal stärkeres Signal des prozessierten TPP1 zu sehen. Auffällig ist hier jedoch das äußerst starke Vorläufersignal sowohl unbehandelt als auch behandelt. Asp276Val zeigt sehr wenig prozessiertes TPP1, sowohl mit als auch ohne HSP70. Es wurde kein Vorläufer detektiert. Die Ergebnisse sind als nicht signifikant einzustufen.

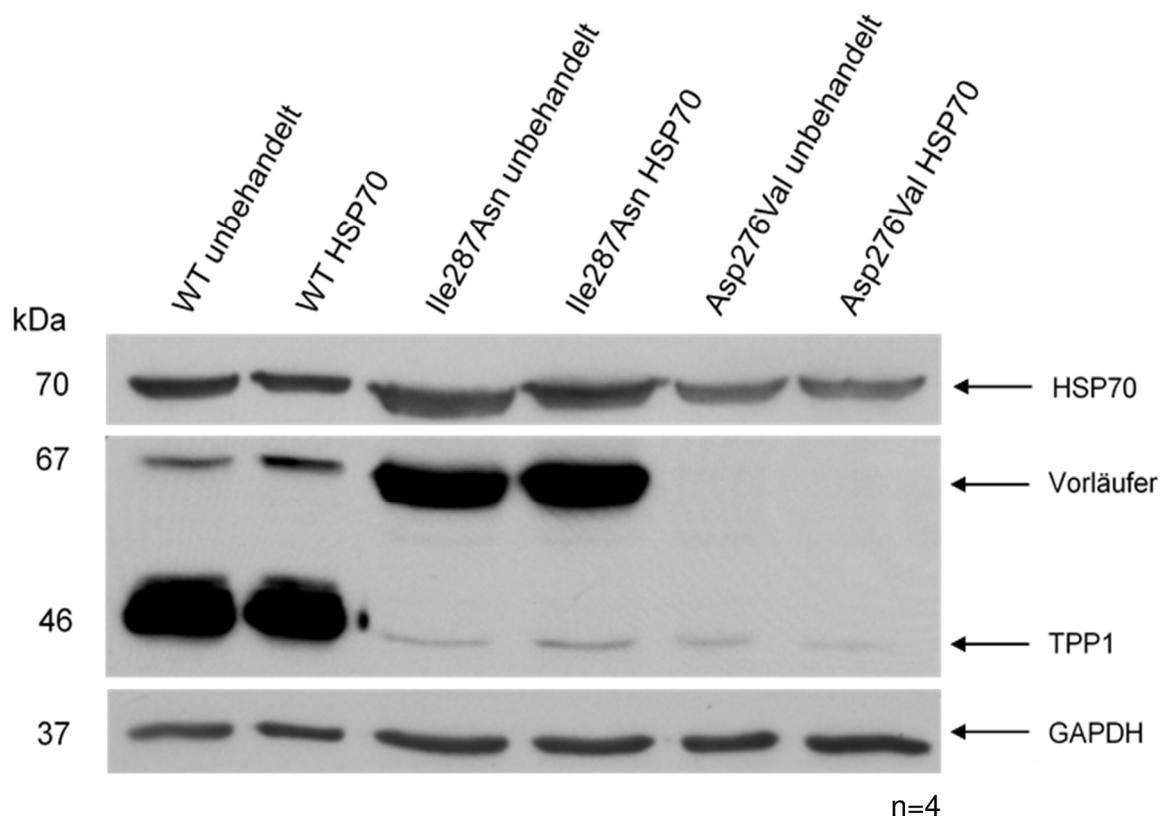


Abbildung 23: Western Blot von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs unbehandelt und mit HSP70-Behandlung (24 Stunden): Der TPP1-WT und die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für 24 Std. mit rekombinantem HSP70 behandelt. Nach der Zellernte und Lyse wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1- und HSP70-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde zusätzlich GAPDH detektiert. HSP70, der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

Bei Gly284Val wird kein TPP1 prozessiert, allerdings zeigt es eine deutliche Vorläuferbande, die durch die Behandlung mit rekombinantem HSP70 stärker hervortritt. Die Ser475Leu-Mutation lässt als Active-Site-Mutation unabhängig von der Behandlung das typische starke TPP1-Signal bei 46 kDa erkennen. Auch hier ist die vorhandene

Vorläuferbande durch rekombinantes HSP70 stärker ausgeprägt. Die nicht transfizierten Zellen zeigen als Negativkontrolle kein Signal. Es lag keine Signifikanz vor.

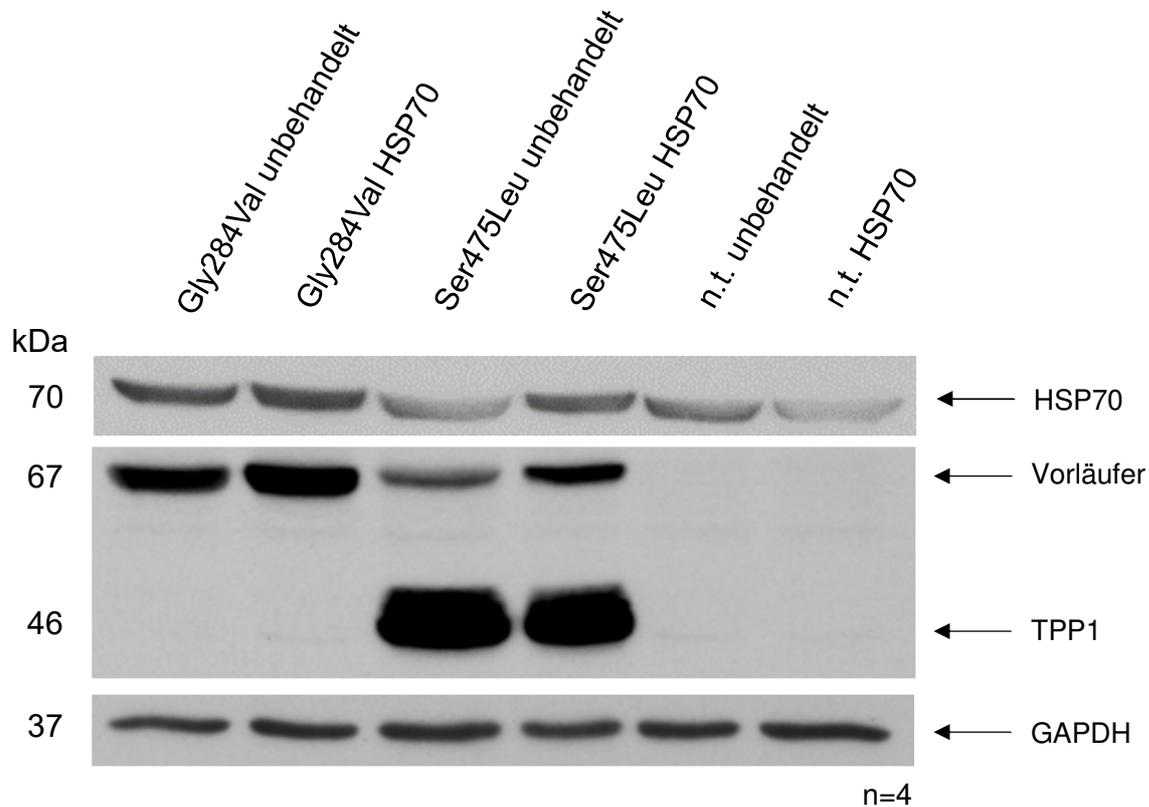


Abbildung 24: Western Blot von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht transfizierten (n.t.) KO-HEKs unbehandelt und mit HSP70-Behandlung (24 Stunden): Die TPP1-Mutanten wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und am Tag danach für 24 Std mit rekombinatem HSP70 behandelt. Ebenso wurde mit den nicht transfizierten Zellen verfahren. Nach der Zellernte und Lyse wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit TPP1- und HSP70-Antikörper detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. HSP70, der unprozessierte TPP1-Vorläufer, das prozessierte TPP1, GAPDH und die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) sind gekennzeichnet.

Die TPP1-Aktivität dieser HEK-Zellen ist in Abbildung 25 grafisch dargestellt. Die Aktivität des Wildtyp-TPP1 verändert sich durch die Behandlung mit rekombinatem HSP70 nicht. Bei den Mutanten ist ebenfalls keine Veränderung durch die Behandlung festzustellen. Es konnte weder bei diesen noch bei den nicht transfizierten Zellen eine aussagekräftige Aktivität detektiert werden. Das minimal verstärkte Signal der

behandelten Ile287Asn-HEKs aus dem Western Blot in Abbildung 23 zeigt sich hier nicht in einer erhöhten Aktivität. Auch hier ist nicht von signifikanten Ergebnissen zu sprechen.

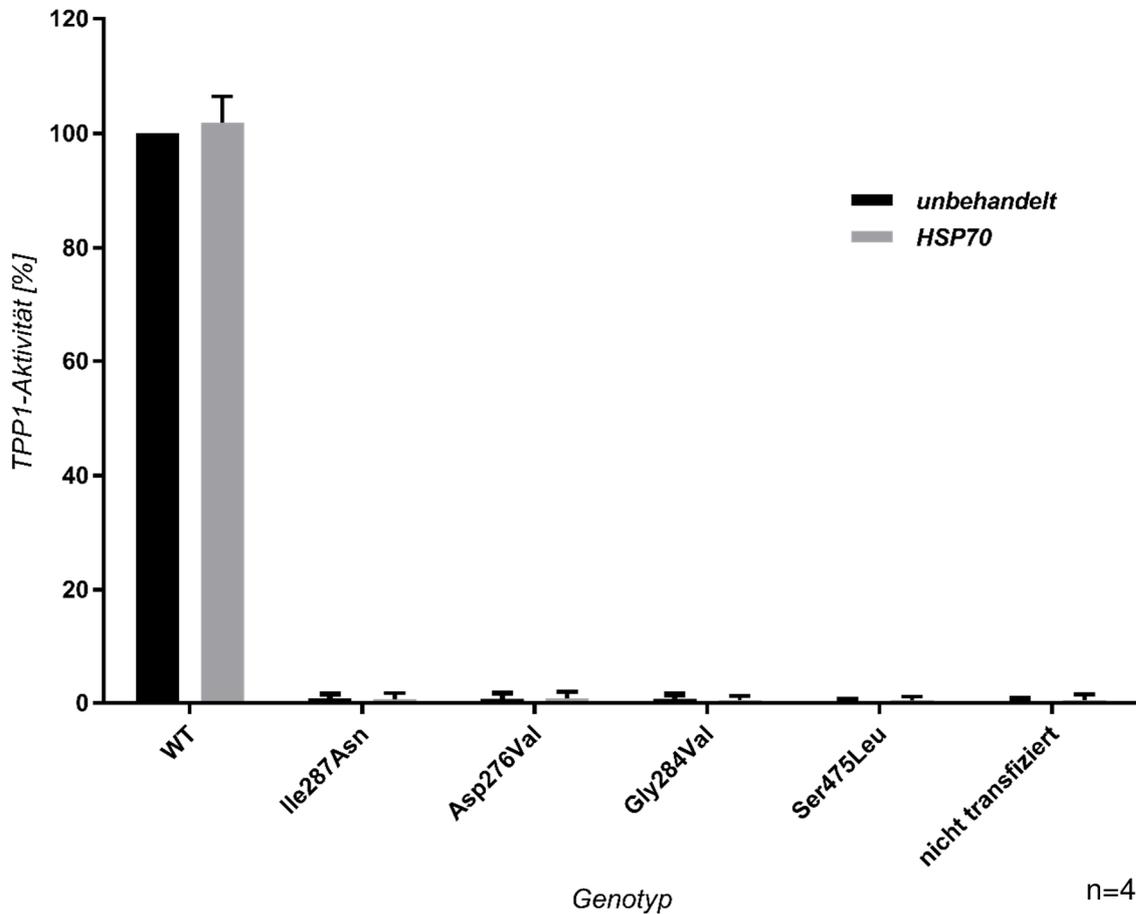


Abbildung 25: TPP1-Aktivitätsassay der mit rekombinatem HSP70 behandelten Wildtyp (WT)- und Mutanten-KO-HEKs (24 Stunden): Triplikate aus Lysat, NaAc-Puffer und 0,25 mM AAF-AMC-Substrat wurden für etwa 22 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Die Fluoreszenzmessung von jeweils 180 µl erfolgte bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm im TECAN Infinite M200. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen („n“) ist gekennzeichnet.

5 Diskussion

5.1 Auswahl der untersuchten Mutationen

In der Literatur werden derzeit 129 existierende Mutationen für CLN2 angegeben (MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, <https://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN2mutationtable.htm>, zuletzt überprüft 11.2019). Diese Doktorarbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Missense-Mutationen, während Nonsense-Mutationen in einer anderen Doktorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht werden. Von der Vielzahl der derzeit bekannten Mutationen wurden vorrangig solche ausgewählt, die besondere Merkmale aufweisen: Die Ile287Asn-Mutation ist eine Punktmutation, bei welcher ein Austausch von Isoleucin zu Asparagin vorliegt. Das Codon ändert sich von ATC nach AAC. Die Mutation befindet sich im für die Katalyse entscheidenden Bereich, der bei der Prozessierung des Vorläufers erhalten bleibt. Aufgrund des fehlerhaften Aufbaus des Proteins geht die proteolytische Aktivität weitgehend verloren. Ile287Asn ist eine der am häufigsten bei den cLINCL-Patienten vorkommenden Aminosäuresubstitutionen, weshalb sie sich gut für die Untersuchung einer neuen Therapieoption eignete.

Die Ser475Leu-Mutation ist eine Punktmutation und befindet sich im aktiven Zentrum des Moleküls. Es resultiert eine Veränderung der Nukleotidsequenz von GCT nach GTT und damit ein Austausch von Cytosin gegen Thymin. Das Protein entsteht in vollständiger Länge. Da aufgrund des veränderten aktiven Zentrums folglich die Umsetzung des Substrats misslingt, ist das vollständige Enzym funktionsunfähig und zeigt keine enzymatische Aktivität. Die Ser475Leu-Mutation wurde bewusst für die Untersuchungen ausgewählt, da sie eine korrekte Prozessierung aufweist, jedoch keine Aktivität hat. Folglich diente sie in den Western Blots als Positivkontrolle für die Prozessierung und in den Aktivitätsassays als Negativkontrolle.

Asp276Val ist eine Missense-Mutation, die als die häufigste in Südamerika gilt und insbesondere in Argentinien in 14 Familien mit je mindestens einem erkrankten Kind vorkommt. Die Mutation ist in 28% der CLN2-Allele zu finden und wurde aufgrund ihrer Häufigkeit in die Untersuchungen eingebunden. Bei der Mutation wird die Nukleotidsequenz TAG zu TTG. Die Asp276Val-Mutation befindet sich in der katalytischen Domäne und ist am Katalysevorgang beteiligt (Pal et al. 2009, Kohan et al. 2013, MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, <https://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN2mutationtable.htm>, zuletzt überprüft 11.2019). Bei Patienten, deren CLN2-Allele beide die Asp276Val-Mutation aufweisen, konnte keine

Restaktivität von TPP1 gemessen werden (Kohan et al. 2013). Guhaniyogi et al. vermuten zudem, dass auch die Asp276-Aminosäure ein Teil des aktiven Zentrums von TPP1 ist, und der Stillstand der Enzymaktivität bei der Mutation hierin begründet ist (vergleiche Ser475Leu). Sie sprechen von einem aktiven Zentrum bestehend aus Ser475-Glu272-Asp276 (Guhaniyogi et al. 2009). Auch Pal et al. sprechen von einer Beteiligung an der katalytischen Aktivität des Asp276 (Pal et al. 2009), Walus et al. beschreiben 2005, dass die katalytische Aktivität von TPP1 um 79% reduziert war, wenn ein Austausch von Aspartat mit Alanin vorlag (Walus et al. 2005). Bei den Versuchen mit Asp276Val ergaben sich meist Schwierigkeiten, überhaupt ein Signal im Western Blot zu bekommen. Neben dem Verlust der Aktivität des Enzyms scheint somit ein Faltungsproblem zu bestehen. Aus diesem Grund ist diese Mutation gut dazu geeignet, solche Ansätze zu untersuchen, die auf Faltungskorrektur durch HSP70 abzielen.

Die Gly284Val-Mutation ist eine Missense-Mutation, die bislang nur in kanadischen Familien gefunden wurde. Es wird vermutet, dass sie eine der ursprünglichen CLN2-Mutationen ist, da sie in 55% der kanadischen CLN2-Familien auftritt und 32% der Mutationsallele darstellt. Die Nukleotidsequenz TGG wechselt in dieser Mutation zu TTG, indem ein Guanin durch ein Thymin ersetzt ist. Als Folge entsteht ein Enzym, das durch seine fehlerhafte Struktur und Faltung nahezu funktionsunfähig ist (Ju et al. 2002). Die Mutation liegt zwar in der Nähe des aktiven Zentrums, ist jedoch nicht an der Katalyse beteiligt.

Die Gly284Val- und die Asp276Val-Mutation eignen sich aus folgenden Gründen damit gut für die Untersuchung der Faltungstherapie: Kann durch die Faltungstherapie unter Umständen eine Korrektur der Faltung und eine anschließende Prozessierung des Vorläufer-Proteins erzielt werden, so könnte sich eine Restaktivität entwickeln, die zur Linderung der Krankheitssymptome ausreichen könnte.

5.2 Chaperone als Therapieansatz für die Neuronale

Ceroidlipofuszinose

Die Idee, das Protein vor seinem Aufbau zu stabilisieren, sodass Fehlfaltungen und frühzeitigem Abbau vorgebeugt werden kann, führte diese Untersuchungen zu den sogenannten Faltungshelfern. Zu diesen Faltungshelfern gehören die Chaperone.

Natürliche Chaperone sind Proteine, die von Natur aus in den Zellen vorkommen. Sie funktionieren als Faltungshelfer und sorgen bei fast allen neusynthetisierten Proteinen dafür, dass diese nicht aggregieren, sondern korrekt falten können (Hendrick und Hartl 1995). Neusynthetisierte Proteine neigen aufgrund ihrer hydrophoben Seitenketten von Natur aus zu Verklumpungen. Die Chaperone verhindern die Aggregation dieser, indem

sie sich an ihr Zielprotein anlagern und die ungefalteten Regionen schützen, bis die Proteine ihre endgültige Konformation erreicht haben. Dabei werden die Chaperone selbst nicht zu einem Teil des Proteins. Sie unterstützen zudem den intrazellulären Transport (Chaudhuri und Paul 2006). Nach Skowyra et al. können Chaperone sogar manche bereits gebildete Aggregate auflösen (Skowyra et al. 1990).

Zu den natürlichen Chaperonen gehört auch die Gruppe der Hitzeschockproteine, darunter Hitzeschockprotein 70 (HSP70). HSP70 ist unter anderem bei der Faltung eines sehr großen Anteils der Proteine als Helfer involviert und an der Regulation der Hitzeschockantwort beteiligt.

Von diesen molekularen Chaperonen sind die chemischen und pharmakologischen Chaperone abzugrenzen. Unter chemischen Chaperonen versteht man von außen zugeführte (exogene) Stoffe, welche die Proteinfaltung insofern unterstützen, dass sie die Proteine vor thermischen und chemischen Einflüssen schützen und damit deren Denaturierung verhindern, z.B. Glycerol (Chaudhuri und Paul 2006, Welch und Brown 1996). Chemische Chaperone werden bei der Herstellung rekombinanter Proteine benutzt, um größere Proteinmengen herstellen zu können. Als Arzneimittel gelten sie hingegen derzeit nicht als geeignet, da für eine erkennbare Wirkung zu große Mengen verabreicht werden müssten, die starke toxische Nebenwirkungen hätten (Valenzano et al. 2011, Chaudhuri und Paul 2006).

Auch die pharmakologischen Chaperone wirken gegen Fehlfaltung und verhindern damit den Abbau des Proteins. Sie binden an spezifische Rezeptorkonformationen und verhindern damit den vorzeitigen Abbau noch unreifer Proteine. Sie halten die Proteine zudem nach der Proteinqualitätskontrolle noch länger im Endoplasmatischen Retikulum und erhöhen dadurch die Chancen, dass fehlgefaltete Proteine korrigiert werden können, dass die bis dahin nicht abgeschlossene Faltung von Proteinen zu Ende gebracht werden kann oder dass der Signalweg der UPR (Unfolded Protein Response) eingeleitet werden kann (Valenzano et al. 2011, Chaudhuri und Paul 2006, Marotta et al. 2017).

Meist handelt es sich bei den Pharmakologischen Chaperonen um Enzym-Inhibitoren, die das natürliche Substrat imitieren und an das aktive Zentrum binden. Hierdurch erfährt das Protein eine Stabilisierung und der Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Lysosom wird unterstützt. Im Lysosom begünstigt der niedrige pH-Wert die Dissoziation des Inhibitors vom Protein, und es gewinnt seine Aktivität zurück. Noch reizvoller sind nicht-inhibitorische pharmakologische Chaperone, da sie allosterisch binden und das Enzym somit nicht zeitweise inaktivieren. Jedoch ist nicht gänzlich klar, ob diese allosterischen Bindungsstellen bei falsch gefalteten Proteinen bestehen.

Eine Therapie mit pharmakologischen Chaperonen hätte den großen Vorteil, dass die Chaperone niedermolekular sind und damit oral verabreicht werden können. Sie zeigen eine sehr gute Gewebsverteilung und erreichen sogar das zentrale Nervensystem, da sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Valenzano et al. 2011). Bisher gibt es jedoch keine pharmakologischen Chaperone für CLN2.

In der Theorie unterstützen Chaperone die Proteine bei ihrer Faltung und verhelfen dazu, dass eine größere Anzahl der Proteine korrekt gefaltet wird. Im Laufe der Versuchsreihen für diese Doktorarbeit haben wir die Wirkung des Hitzeschockproteins HSP70, welches zu den molekularen Chaperonen gehört, auf unterschiedliche Weisen für die beschriebenen CLN2-Mutationen geprüft. Zunächst haben wir die Zellkulturen mit den Substanzen Arimoclolomol und Celastrol behandelt.

Arimoclolomol ist ein Medikament, welches bereits für andere Erkrankungen (u.a. Amyotrophe Lateralsklerose, kurz ALS) in Phase II/III bzw. in Phase III klinischen Studien getestet wird (Orphazyme). Es ist ein Aktivator der Hitzeschockantwort, indem es den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 aktiviert und damit für eine Stimulation der HSP70-Produktion sorgt. Es kann oral eingenommen werden und überwindet die Blut-Hirn-Schranke (Orphazyme). In unseren Versuchen haben wir mit einer Wirkstoffkonzentration von 50 μM gearbeitet, da diese Konzentration, überprüft durch Versuche der Arbeitsgruppe Tikkanen, nicht toxisch wirkt. Laut bisher veröffentlichten Studien wurde Arimoclolomol gut von den Patienten vertragen (Kirkegaard et al. 2016).

Aus der Wurzel des ostasiatischen Spindelbaumgewächses *Tripterygium wilfordii* können pharmakologisch aktive Stoffe extrahiert werden. Darunter existieren einige Klassen bioaktiver Substanzen, deren Wirkmechanismus derzeit auf vielen Ebenen untersucht und ihr Effekt auf zahlreiche Erkrankungen erforscht wird (Chen et al. 2018). Die aus der Rinde der Wurzel extrahierten Wirkstoffe haben antientzündliche Effekte (Liu et al. 2010, Xue et al. 2012), pharmakologische Wirkung gegen bestimmte Autoimmunerkrankungen (Chen et al. 2010) und versprechen Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen und Stoffwechselstörungen. Sie werden in klinischen Studien bereits erfolgreich gegen Autoimmunerkrankungen und entzündliche Erkrankungen eingesetzt (Marks 2011). Auch für neurodegenerative Erkrankungen (Alzheimer, ALS oder Parkinson) versprechen Tierversuche mit Celastrol eine neuroprotektive Wirkung (Cascao et al. 2017). Die Substanzen Triptolid und Celastrol gelten als die vielversprechendsten Vertreter dieser Gruppe (Chen et al. 2018).

Celastrol ist ein pentazyklisches Triterpen (Liu et al. 2015). Neben seiner anti-inflammatorischen Wirkung und den für die oben genannte Gruppe typischen pharmakologischen Wirkungen zeigt es Effekte im Kampf gegen Krebs und Fettleibigkeit. Celastrol aktiviert die Transkription des Hitzeschock-

Transkriptionsfaktors 1 (HSF1), welcher die Hitzeschockprotein-Gene reguliert (Chen et al. 2018). Dadurch wird die Expression des Hitzeschockproteins 70 (HSP70) hochreguliert. Auch Celastrol ist ZNS-gängig. Durch den gezielten Einsatz von Celastrol und die Kombination mit anderen Wirkstoffen kann der therapeutisch positive Effekt des Arzneimittels in den Vordergrund rücken. Ein großer Nachteil von Celastrol hingegen ist seine zelltoxische Wirkung, welche stark konzentrationsabhängig ist und den Einsatz beschränkt. Derzeit wird daran gearbeitet, neuartige, weniger zelltoxische Derivate von Celastrol zu entwickeln (Chen et al. 2018, Kim et al. 2017).

In meinen Versuchen habe ich Celastrol mit einer Wirkstoffkonzentration von 250 nM verwendet. Mit den zur Verfügung stehenden Ile287Asn-Patientenfibroblasten wurde zu Beginn der Versuche eine Zeitreihe durchgeführt, bei der eine leicht verstärkte Expression des Vorläuferproteins unter Celastrol-Einwirkung registriert werden konnte. Celastrol scheint somit eine günstige Konformation des TPP1-Vorläufers zu schaffen, wodurch dieser nicht verfrüht abgebaut wurde und länger detektiert werden konnte. Jedoch kam es aufgrund der Mutation nicht zur Reifung des Vorläufers, und es konnte folglich kein aktives TPP1 detektiert werden. Das TPP1 war bei den mit Celastrol und auch den mit Arimoclomol behandelten Kontroll-Wildtypzellen nach drei Behandlungstagen rückläufig. Nach siebentägiger Behandlung hingegen konnte eine im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp vermehrte TPP1-Expression festgestellt werden. Der Gedanke liegt nahe, dass zelltoxische Eigenschaften von Celastrol für die Reduktion des TPP1 verantwortlich sind. Jedoch wurde auch für die Arimoclomol-Zellen beobachtet, dass es nach 3 Tagen eine rückläufige und nach 7 Tagen eine progrediente Entwicklung des TPP1 gab. Es kann vermutet werden, dass sich die Zellen an die Behandlung gewöhnen. Zu Beginn starben viele Zellen ab, später überlebten jedoch besonders die weniger empfindlichen Zellen, was im Ergebnis zu einer größeren nachzuweisenden Proteinmenge führte. Generell war die Kultivierung der CLN2-Fibroblasten aber um einiges anspruchsvoller als die der HEK293T-Zellen. Für die SDS-PAGE wurden die Proteinkonzentrationen der Proben zwar gemessen und für die Gelansätze aneinander angeglichen, jedoch birgt die Vielschrittigkeit des gesamten Versuchsaufbaus zahlreiche Fehlerquellen. Zudem wurde das Zeitreihenexperiment als Vorversuch nur einmal durchgeführt, weshalb keine Aussage über ein möglicherweise erneutes Auftreten der Ergebnisse gemacht werden kann.

Für die Versuche mit HEK293T-Zellen und den Substanzen Arimoclomol und Celastrol wurde zunächst in einem Vorversuch eine optimale Behandlungszeit von 6 Tagen angenommen. Da so jedoch keine steigernde Wirkung auf die Expression von prozessiertem TPP1 erzielt werden konnte, wurde für jede Substanz eine Zeitreihe

angelegt. Die Zeitreihen wurden jeweils für 0 Tage, 5 Tage und 7 Tage Behandlungszeit erstellt. Die unbehandelten Proben wurden jeweils erst nach Ablauf der Zeitreihe geerntet, um eine gleiche Kultivierungsdauer zu erreichen. Damit wurde sichergestellt, dass der Effekt der Substanzen zu erkennen ist und nicht der Effekt durch die nur transiente Transfektion abnehmende Plasmidmenge. Bei keiner der Zeitpunkte ließ sich eine positive Auswirkung durch die Behandlung erkennen. Lediglich auf Ebene des Vorläufers reduzierte sich mit längerer Stimulationszeit die vorhandene Menge an Protein. Auch die Proteinmenge des Wildtyp-TPP1 reduzierte sich analog bei längerer Stimulation (analog zu den Ergebnissen der Patientenfibroblasten-Versuche). Dies lässt sich bezüglich Celastrol vermutlich auf dessen zelltoxische Eigenschaften zurückführen. Da eine toxische Wirkung von Arimoclomol bislang nicht publiziert wurde, liegt nahe, dass es zudem Probleme bei der Zellkultivierung gegeben haben könnte. Das Zellsterben könnte bedingt sein durch zu spätes Auffrischen des Nährmediums in Kombination mit einer zu hohen Zellzahl im Kulturgefäß.

Sowohl mit Arimoclomol als auch mit Celastrol ließen sich keine Erfolge erzielen. In der Folge untersuchten wir also, ob HSP70 generell eine erkennbare Wirkung auf die fehlgebildeten Proteine hat. Dies wurde mit rekombinatem HSP70 durchgeführt, welches zuvor mithilfe von E.coli-Bakterien produziert wurde. Es wurde eine Wirkstoffkonzentration von 300 nM verwendet. Auch mit rHSP70 konnte keine gesteigerte Expression von reifem TPP1 erreicht werden. Die Vermutung, dass es durch HSP70 zu einer Faltungskorrektur und anschließenden Prozessierung und Rückgewinnung einer Restaktivität kommt, konnte leider nicht bestätigt werden. Durch eine Stimulationszeit von 24 Stunden zeigte sich jedoch eine leicht gesteigerte Menge an Vorläuferprotein, was durch die stabilisierende Wirkung des HSP70 bedingt sein könnte. Augenscheinlich diente das vermehrte Vorhandensein des Vorläufers der Prozessierung hingegen ebenfalls nicht.

Zusammengefasst konnte weder mit rekombinatem HSP70 noch mit Arimoclomol und Celastrol eine Steigerung der Expression von TPP1 und eine vermehrte Enzymaktivität erreicht werden.

Bei der Auswertung der Western Blots meiner Versuchsreihen sind folgende Auffälligkeiten zutage getreten:

In einem ersten Versuch mit den HEK293T-Zellen wurde die TPP1-Prozessierung aller unbehandelten Mutanten überprüft (Abbildung 13). Dabei zeigte die Asp276Val-Mutante ausschließlich in diesem Versuch eine starke Bande auf Höhe des prozessierten TPP1. Im Vergleich dazu fiel das Ergebnis der anderen Versuche anders aus, was vermuten lässt, dass diese Mutante stark beeinträchtigt ist und somit sehr schlecht faltet. Aus diesem Grund ist sie in fast allen Western Blots schlecht sichtbar. Die Plasmid-DNA

konnte als Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da sie mittels Sequenzierung überprüft wurde und in Ordnung war.

Im Zeitreihenversuch mit Celastrol (0d, 5d, 7d) fällt auf, dass der Vorläufer sowohl der Ile287Asn-Mutante als auch der Gly284Val-Mutante durch die Celastrolbehandlung mit zunehmender Behandlungsdauer unterdrückt wird. Hier könnte es gut sein, dass der ER-Stress durch Celastrol reduziert werden und eine Apoptose verhindert werden kann. Dies sollte in weiteren Versuchen experimentell untersucht werden.

Viele neurodegenerative Erkrankungen sind stark mit Stressreaktionen im Endoplasmatischen Retikulum verbunden, so auch die NCL-Erkrankungen. Das ER ist ein sehr wichtiges Zellorganell, das für die Neubildung von Proteinen und deren Export zuständig ist. Sammeln sich im ER gehäuft falsch bzw. unvollständig gefaltete Proteine an, wird ein Antwortmechanismus, die sogenannte UPR, ausgelöst. Dieser Signalweg sorgt für die Hemmung der Translation und den Abbau der sich akkumulierenden Proteine, um das Gleichgewicht der Zelle wiederherzustellen und den Austritt von strukturell fehlerhaften Proteinen zu verhindern. Auch die erhöhte Expression von Chaperonen als Faltungshelfer gehört zu dieser Zellantwort. Kann das Gleichgewicht nicht mehr erreicht werden, kommt es zum programmierten Zelltod. Dies führt in der Folge zur Zelldegeneration, so auch zu neurodegenerativen Vorgängen. Ein Zusammenhang der UPR zu einigen der NCL-Typen (CLN1, CLN3, CLN6 und CLN8) besteht, er ist jedoch für die CLN2 bislang nicht bekannt.

Bei den Versuchen mit rHSP70 (Abbildung 24) trat erstmals eine sehr starke Bande auf Höhe des Vorläufers der Ile287Asn-Mutation auf, sowohl bei den unbehandelten Zellen als auch bei denen mit 24-stündiger Behandlung. Bei allen anderen Versuchen war an dieser Stelle keine deutliche Bande zu erkennen. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen in den rHSP70-Versuchen viel kürzer kultiviert wurden als in den Versuchen mit Arimoclomol und Celastrol. Damit wären Einflussfaktoren reduziert, die aufgrund von Kultivierungsbedingungen zum Zellsterben hätten führen können. Zudem war der Nachweis des HSP70 in ebendiesen Versuchen schwierig: Die Signalstärke des detektierten HSP70 variiert von Mutante zu Mutante, obwohl die Zellen mit den gleichen Mengen HSP70 behandelt wurden. Die Unterschiede liegen hier wohl in den unterschiedlichen Mengen von endogen vorhandenem HSP70. Das Signal dessen ist außerdem so stark, dass das von extern aufgenommene und im Verhältnis viel geringer vorhandene rekombinante HSP70 nicht zu erkennen ist. Auf den Western Blots (Abbildung 23 und Abbildung 24) wird deutlich, dass hohe Mengen an endogenem HSP70 in den Zellen eine Darstellung des aufgenommenen HSP70 unmöglich machen. Mithilfe eines speziellen Antikörpers, welcher das getaggte HSP70 erkennt, kann in weiteren Versuchen die Menge des extern zugeführten HSP70 sichtbar gemacht

werden. Dies kann dazu dienen, die Aufnahme des rekombinanten HSP70 zu kontrollieren und zu untersuchen, ob eine höhere Menge von aufgenommenem HSP70 Effekte auf die Expression und Aktivität von TPP1 hat.

5.3 Ausblick

NCL2 ist eine der häufigsten Formen der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen. Seit der erstmaligen Beschreibung der Erkrankung im Jahr 1908 durch Jansky und anschließend auch durch Bielschowsky steht die CLN2 im Zentrum einiger Forschungsgruppen (Wheeler et al. 2001).

Die von mir untersuchte Chaperon-Therapie führte nicht zum Erfolg für die ausgewählten Mutanten. Eine Möglichkeit dafür ist, dass dieser Arbeit solche Mutationen zugrunde lagen, die sich nicht beeinflussen lassen, und andere Mutationen vielleicht auf die getesteten Substanzen respondieren würden, da sie durch die Mutation anders beeinträchtigt sind. Es ist zudem auch durchaus möglich, dass diese Art der Therapie auf andere Untergruppen der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen wirkt, jedoch nicht auf CLN2. Vor diesem Hintergrund könnten zukünftig Versuchsreihen mit weiteren Mutanten durchgeführt werden. Auch die Untersuchung weiterer bekannter pharmakologischer Chaperone und die Suche nach neuen Chaperonen bietet Potenzial.

Daneben ist es essentiell, die Prozessierung und Aktivität von TPP1 unter Stimulation von molekularen Chaperonen auch an Patientenzellen zu untersuchen, um die Wirkung auf Zellen von betroffenen Menschen, welche die defekte DNA-Sequenz bereits von Natur aus aufweisen, zu überprüfen.

In dieser Arbeit wurde mit einer konkreten Dosis und Behandlungszeit gearbeitet, die in der Arbeitsgruppe Tikkanen bereits verwendet wurde. Das Erstellen einer Dosisreihe und das Ermitteln der jeweilig optimalen Dosis und Behandlungszeit bietet neue Versuchsbedingungen, mit denen weitere Versuche durchgeführt werden sollten.

Während der Literaturrecherche bin ich zudem auf Hinweise gestoßen, die auf die möglicherweise bessere Wirkung durch eine kombinierte Gabe von Celastrol und Arimoclolomol aufmerksam machen. Demnach bewirke die gemeinsame Gabe von Arimoclolomol und Celastrol eine gesteigerte Produktion von Hitzeschockproteinen im Vergleich zur alleinigen Gabe von Arimoclolomol (Deane und Brown 2016). Diese Kombinationstherapie sollte in weiteren Versuchen erprobt werden.

Betrachtet man die Stressreaktionen im ER und die Zusammenhänge der UPR, wird schnell klar, dass dieser Antwortmechanismus einen guten Angriffspunkt bietet, um erfolgreiche Therapieoptionen für die NCL-Erkrankungen zu gewinnen. Wird die Zellantwort noch besser verstanden und kann so eingegriffen werden, dass es vermehrt

zur korrekten Proteinfaltung kommt, damit eine Akkumulation fehlerhafter Proteine zunehmend erfolgreich verhindert werden kann und es schlussendlich seltener zur Apoptose kommt, können die schwerwiegenden Folgen der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen möglicherweise aufgehalten werden (Marotta et al. 2017).

6 Zusammenfassung

Die Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) spaltet als lysosomale Aminopeptidase Tripeptide von ihren Substraten ab. TPP1 wird als inaktive Vorstufe synthetisiert und durch die saure Umgebung im Lysosom autokatalytisch durch Spaltung aktiviert. Die Kristallstruktur von TPP1 ist kugelförmig, sein Gen liegt in der Chromosomen-Region 11p15.4.

Die seltene lysosomale Speichererkrankung Neuronale Ceroidlipofuszinose 2 (kurz: NCL2, auch CLN2) ist die Folge von Mutationen im *TPP1*-Gen und wird autosomal-rezessiv vererbt. Die eingeschränkte Funktion des Enzyms TPP1 führt zu Störungen des Substratabbaus und folglich zur intralysosomalen Ansammlung von wachsartigem Ceroidlipofuszin-Material. Dies führt zum weitgehenden Funktionsverlust der Lysosomen. Die Symptome der klassischen Spätinfantilen Neuronalen Ceroidlipofuszinose (cLINCL) zeigen sich erstmals im frühen Kindesalter zwischen 1 und 4 Jahren: psychomotorische Entwicklungsstörungen in Kombination mit epileptischen Anfällen und Demenz durch neurodegenerative Vorgänge. Bereits vorhandene motorische Fähigkeiten gehen verloren und es kommt zum Sehkraftverlust. Meist werden die Patienten nicht älter als 15 Jahre.

Bislang ist nur die Enzymersatztherapie für CLN2 zugelassen. Diese ist jedoch wenig alltagstauglich, da den Patienten lebenslang etwa alle zwei Wochen rekombinantes TPP1 intravenös, teilweise direkt ins ZNS, verabreicht werden muss. Nicht selten zeigen sich Immunreaktionen gegen das verabreichte Enzym. Aus diesen Gründen wird derzeit nach anderen Therapiemöglichkeiten gesucht, wobei die Faltungstherapie eine Alternative für TPP1-Mutationen darstellen könnte. Die Idee hinter der Faltungstherapie ist, die Strukturveränderungen des mutierten TPP1 zu umgehen, indem die korrekte Faltung des Enzyms unterstützt wird. Hierzu können Chaperone dienen. HSP70 ist ein molekulares Chaperon, das natürlicherweise in den Zellen vorkommt. Es gehört zur sogenannten Hitzeschockantwort, die durch zellulären Stress ausgelöst wird. Als Haupt-Transkriptionsfaktor für Hitzeschockproteine steuert der Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) Prozesse im Zellstoffwechsel, die dem zellulären Schutz dienen und reguliert die Transkription der Hitzeschockproteine, wie HSP70, bei zellulärem Stress hoch. HSP70 agiert als Faltungshelfer und sorgt für die Stabilisierung der Proteine in ihrer Faltungsphase, sodass Fehlfaltungen vorgebeugt werden können.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung der Wirkung von HSP70 auf die Expression, Prozessierung und Aktivität von mutiertem TPP1. Es wurden sehr häufig

vorkommende TPP1-Mutationen ausgewählt: die Missense-Mutationen Asp276Val, Gly284Val, Ile287Asn und Ser475Leu. Die zugrundeliegenden Zellsysteme waren Patientenfibroblasten und transfizierte HEK293T-Zellen. Aufgrund des schlechten Wachstums der Patientenzellen erfolgten die weiteren Versuche mit HEK293T-Zellen. Um eine Steigerung von HSP70 in den Zellen zu erreichen, wurden die transfizierten Zellen mit den Substanzen Arimoclolomol, Celastrol oder mit rekombinantem HSP70 behandelt. Arimoclolomol aktiviert die Hitzeschockantwort und sorgt durch die Aktivierung von HSF1 für eine gesteigerte HSP70-Expression. Celastrol ist ein Naturprodukt aus der Wurzel eines ostasiatischen Spindelbaumgewächses. Auch dieses aktiviert HSF1 und bewirkt eine vermehrte HSP70-Präsenz in den Zellen. Arimoclolomol und Celastrol werden derzeit bereits für andere neurodegenerative Erkrankungen in klinischen Studien getestet. In dieser Doktorarbeit sollte überprüft werden, ob durch die Behandlung der Zellen mit den genannten Substanzen eine Steigerung von HSP70 und damit verbunden vermehrt korrekt gefaltetes TPP1 erreicht werden kann.

Zunächst fand die Klonierung des Wildtyps und der Mutanten in den Expressionsvektor pcDNA3 statt. Es folgten der Nachweis der TPP1-Expression und -Prozessierung im Western Blot und die Messung der TPP1-Aktivität mit einem fluorometrischen Aktivitätsassay. Durch die transiente Expression des Wildtyps und der Mutanten in HEK293T-Zellen konnte Folgendes gezeigt werden: Nur bei den Active-Site-Mutanten Asp276Val und Ser475Leu wurde das mutierte TPP1 prozessiert. Bei den anderen Mutanten sammelte sich der TPP1-Vorläufer an. Die Mutation der Active-Site-Mutanten liegt in deren aktivem Zentrum. Der Rest des Proteins wird korrekt aufgebaut und war im Western Blot detektierbar. Da das fehlerhafte aktive Zentrum jedoch keine Substrate binden kann, war auch keine Enzymaktivität vorhanden. Eine Stabilisierung des Faltungsprozesses erzielte bei diesen beiden Mutationen folglich keine Aktivität, da es sich nicht um ein Faltungsproblem handelt. Bei den Mutanten Gly284Val und Ile287Asn hingegen handelt es sich um genau solche Mutationen mit Faltungsfehlern. Diese Mutanten ließen sich unter Umständen durch die Verbesserung des Faltungsprozesses mithilfe von Chaperonen korrigieren. Im Vergleich zur Aktivität des Wildtyps konnte bei diesen beiden Mutanten keine aussagekräftige Aktivität des mutierten TPP1 festgestellt werden (unter 5%). Auch unter Stimulation mit den Substanzen Arimoclolomol, Celastrol und rekombinantem HSP70 ergaben sich keine signifikanten Änderungen dieser Ergebnisse.

Die Chaperontherapie stellt damit keine Alternative zur zugelassenen Enzymersatztherapie dar. Zumindest für die hier untersuchten Mutationen lieferten die Versuche keine positiven Ergebnisse. Inwieweit die Faltungstherapie auf andere CLN2-Mutationen wirkt, muss noch in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

7 Summary

The enzyme tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) is a lysosomal aminopeptidase that cleaves tripeptides from the N-terminus of its substrates. TPP1 is synthesized as an enzymatically inactive precursor, which is further cleaved autocatalytically in the acidic environment of the lysosome. The enzyme is trimmed to the 368 C-terminal amino acids during processing and is thereby activated. The crystal structure of the TPP1-molecule is globular and its gene is located on chromosome 11p15.4.

The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2 (short: NCL2 or CLN2) is a lysosomal storage disorder. It is also known as classic late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (cLINCL). The disease belongs to the neuronal ceroid lipofuscinoses, which occur with an incidence of 1 in 30,000 liveborn children. CLN2 is an autosomal recessive disorder. Compromized activity of TPP1 leads to impairment of the cleavage of its substrates and accumulation of waxy ceroid lipofuscin material in lysosomes. Over time, this results in a loss of function of the lysosomes. The symptoms of cLINCL appear in early childhood at the age of 1 to 4 years: psychomotor developmental disorders together with seizures and dementia caused by neurodegenerative decline. Cognitive and motor abilities that have been already achieved are lost. Consequently, vision loss is likely to occur. Mortality is high among patients, and death frequently occurs by 15 years.

Enzyme replacement therapy is the only one therapy for CLN2 so far, which, however, is not well compatible with everyday life. In the course of the therapy, recombinant TPP1 needs to be administered by intravenous injection every two weeks, partially directly into the CNS. The drug can possibly trigger immune reactions.

For these reasons, we are looking for other treatment options such as folding therapy which might be an alternative for TPP1 mutations that result in misfolding of the protein. The idea of folding therapy is to support the correct folding of the protein and avoid structural changes. Chaperones can be useful, as they are known to support protein folding. HSP70 is a molecular chaperone that occurs naturally in cells. It is part of the heat shock response, which is triggered by cellular stress that can be thermal or chemical, for instance. Heat shock factor 1 (HSF1) is the main transcriptional factor for heat shock proteins. It controls the processes of the cellular metabolism in order to protect the cells. HSF1 up-regulates the transcription of the heat shock proteins like HSP70 in times of cellular stress. HSP70 supports protein folding by stabilizing proteins during this process, which helps to prevent misfolding.

The purpose of this work was to investigate the effect of HSP70 on the expression, processing and activity of mutant forms of TPP1. Frequently occurring TPP1-mutations were chosen for the investigation: the missense mutations Asp276Val, Gly284Val, Ile287Asn and Ser475Leu. Experiments were performed in patient fibroblasts and transfected HEK293T cells. A change to HEK293T cells was necessary due to the poor growth of the patient fibroblasts. To attain more HSP70 in the cells, transfected cells were treated with the substances Arimoclomol, Celastrol or recombinant HSP70. Arimoclomol is an activator of the heat shock response and enhances the HSP70-expression by activation of HSF1. Celastrol is a natural product from the extract of the root of an East Asian spindle tree greenhouse. Celastrol activates HSF1 and thereby a higher HSP70 presence in the cells. Arimoclomol and Celastrol are currently tested for other neurodegenerative diseases in clinical trials. These substances are encouraging further studies as therapeutic agents for NCL-diseases. This study aimed at investigating whether treatment of the cells with the previously mentioned substances can trigger an increase of HSP70 and thus enhanced expression of correctly folded TPP1.

First, the wildtype and the mutants were cloned into the expression vector pcDNA3. Then the expression and processing of TPP1 was tested using Western blots. The activity of TPP1 was measured by a fluorometric activity assay. The transient expression of the wildtype and the mutants in HEK293T-cells showed the following: Only the active site mutations Asp276Val and Ser475Leu generated processed TPP1. The other mutations showed an accumulation of the precursor. Active site mutations are characterized by an amino acid change located in the active center. Since the remaining part of the protein is built correctly, it can be detected in the Western blot. However, the mutated active site cannot bind substrates. Consequently, there is no remaining enzyme activity. Stabilizing the process of folding did not increase the activity of these two mutations because their functional impairment was not based on a folding error, but direct lack of catalytic activity. However, Gly284Val and Ile287Asn are mutations with a defective folding. If the process of folding could be improved with the help of chaperones, the mutations could theoretically be corrected. However, compared to the wildtype activity, there was no significant activity of the mutant TPP1 to be detected (less than 5%). Treatment with Arimoclomol, Celastrol and recombinant HSP70 did not change these results significantly.

In conclusion, chaperone therapy does not represent an alternative to the approved enzyme replacement therapy today. Regarding the mutations tested in this work, the investigations did not provide positive results. Future research should examine to what extent folding therapy is effective for other CLN2 mutations.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AAF AMC	Alanin-Alanin-Phenylalanin-7-amido-4-methylcoumarin
AGA	Aspartylglukosaminidase
AGU	Aspartylglukosaminurie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
Ari	Arimocloamol
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Asp276Val	TPP1-Mutation
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Cel	Celastrol
cLINCL	engl. classical Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, dt. klassische spätinfantile Neuronale Ceroidlipofuszinose
CLN	engl. Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, dt. Neuronale Ceroidlipofuszinose
CLN ^{-/-}	homozygot von Neuronaler Ceroidlipofuszinose betroffen
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	engl. days, dt. Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DpnI	Restriktions-Endonuklease
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli

ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERT	engl. Enzyme Replacement Therapy, dt. Enzymersatztherapie
EtOH	Ethanol
FCS	engl. fetal calf serum; dt. Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gly284Val	TPP1-Mutation
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HABA	2-[4'-hydroxy-benzeneazo]Benzoessäure
HEK-Zellen	engl. Human Embryonic Kidney Cells; dt. humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	engl. horse radish peroxidase; dt. Meerrettichperoxidase
HSF1	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1
HSP	Hitzeschockprotein
Ile	Isoleucin
Ile287Asn	TPP1-Mutation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB	engl. lysogeny broth, dt. Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
Lys	Lysin
mRNA	engl. messenger RNA, dt. Boten-RNA
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
NaAc	Natriumacetat

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCL	Neuronale Ceroidlipofuszinose
NEAA	engl. Non Essential Amino Acid Solution, dt. Lösung aus nicht-essentiellen Aminosäuren
nM	Nanomolar
NMD	engl. nonsense mediated mRNA decay, zellulärer Qualitätskontrollmechanismus
NP-40	ein Nonylphenoethoxylat mit MO=40
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PTC	prämaures Terminationscodon
rHSP70	rekombinantes Hitzeschockprotein 70
rpm	engl. revolutions per minute; dt. Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Ser475Leu	TPP1-Mutation
SV40	Simian-Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	engl. Tris-buffered saline with Tween20, dt. Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TPP1	Tripeptidylpeptidase 1
Trp	Tryptophan
UPR	engl. Unfolded Protein Response; dt. Antwort auf ungefaltete Proteine

V	Volt
Val	Valin
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Korrelation der typischen Symptome der klassischen spätinfantilen Neuronalen Ceroidlipofuszinose (CLN2) mit dem Alter des Auftretens	4
Abbildung 2: Prozessierung von Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1)	7
Abbildung 3: Western Blot von unbehandeltem Wildtyp (WT), mit Celastrol behandeltem WT (zwei Ansätze), unbehandeltem Ile287Asn und mit Celastrol behandeltem Ile287Asn	43
Abbildung 4: Relative TPP1-Aktivität der mit Celastrol behandelten Wildtyp (WT)- und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt vs. 3 Tage behandelt)	44
Abbildung 5: Western Blot der Zeitreihe von Ile287Asn und Wildtyp (WT) mit Celastrol-Behandlung wie angegeben (d=days)	45
Abbildung 6: TPP1-Aktivität in % der mit Celastrol behandelten Wildtyp- (WT; unbehandelt, 3 Tage, 6 Tage) und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt, 2 Tage, 3 Tage, 5 Tage, 6 Tage, 7 Tage)	46
Abbildung 7: Relative TPP1-Aktivität der mit Arimoclomol behandelten Wildtyp (WT)- und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt, 3 Tage)	47
Abbildung 8: Western Blot der Zeitreihe von Ile287Asn und Wildtyp (WT) mit Arimoclomol-Behandlung wie angegeben (d=days)	48
Abbildung 9: Relative TPP1-Aktivität der mit Arimoclomol behandelten Wildtyp- (WT; unbehandelt, 3 Tage, 6 Tage) und Ile287Asn-Patientenfibroblasten (unbehandelt, 2 Tage, 3 Tage, 5 Tage, 6 Tage, 7 Tage)	49
Abbildung 10: DNA-Sequenzen von TPP1-Asp276Val im Vergleich zu TPP1-WT	50
Abbildung 11: DNA-Sequenzen von TPP1-Gly284Val im Vergleich zu TPP1-WT	50
Abbildung 12: DNA-Sequenzen von TPP1-Ser475Leu im Vergleich zu TPP1-WT	51
Abbildung 13: Western Blot von TPP1-WT, Ile287Asn, Asp276Val, Gly284Val, Ser475Leu und nicht transfizierten Zellen (n.t.) unbehandelt	53

Abbildung 14: Western Blot von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs unbehandelt und mit Arimoclomol- und Celastrol-Behandlung (6 Tage)	54
Abbildung 15: Western Blot von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht-transfizierten (n.t.) KO-HEKs unbehandelt und mit Arimoclomol- und Celastrol-Behandlung (6 Tage)	55
Abbildung 16: Relative TPP1-Aktivität der mit Arimoclomol und Celastrol behandelten Wildtyp (WT)- und Mutanten-KO-HEKs (6 Tage)	56
Abbildung 17: Western Blot der Zeitreihe von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs mit Celastrol-Behandlung wie angegeben (d=days)	57
Abbildung 18: Western Blot der Zeitreihe von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht transfizierten (n.t.) KO-HEKs mit Celastrol-Behandlung wie angegeben (d=days)	58
Abbildung 19: TPP1-Aktivität in % der mit Celastrol behandelten Wildtyp (WT)-transfizierten KO-HEKs (unbehandelt, 5 Tage, 7 Tage)	59
Abbildung 20: Western Blot der Zeitreihe von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs mit Arimoclomol-Behandlung wie angegeben (d=days)	60
Abbildung 21: Western Blot der Zeitreihe von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht transfizierten (n.t.) KO-HEKs mit Arimoclomol-Behandlung wie angegeben (d=days)	61
Abbildung 22: TPP1-Aktivität in % der mit Arimoclomol behandelten Wildtyp (WT)-KO-HEKs (unbehandelt, 5 Tage, 7 Tage)	62
Abbildung 23: Western Blot von Wildtyp (WT)-, Ile287Asn- und Asp276Val-KO-HEKs unbehandelt und mit HSP70-Behandlung (24 Stunden)	63
Abbildung 24: Western Blot von Gly284Val-, Ser475Leu- und nicht transfizierten (n.t.) KO-HEKs unbehandelt und mit HSP70-Behandlung (24 Stunden)	64
Abbildung 25: TPP1-Aktivitätsassay der mit rekombinantem HSP70 behandelten Wildtyp (WT)- und Mutanten-KO-HEKs (24 Stunden)	65

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Neuronalen Ceroidlipofuszinosen (NCL)	3
Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte des jeweilig genannten Herstellers sowie dessen Niederlassung	20
Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungen des jeweilig genannten Herstellers sowie dessen Niederlassung	23
Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung	25
Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Kits und Säulen sowie deren Hersteller mit Niederlassung	26
Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Primärantikörper	26
Tabelle 7: Übersicht über den in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Sekundärantikörper	27
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten CLN2-Konstrukte	27
Tabelle 9: Übersicht über die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Mutagenese-Primer mit ihren Sequenzen	27
Tabelle 10: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Bakterienstämme, die Bezugsquelle derer und weitere Informationen	28
Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen	29

11 Literaturverzeichnis

Banning, Antje; Gülec, Christina; Rouvinen, Juha; Gray, Steven J.; Tikkanen, Ritva (2016): Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. In: *Scientific reports* 6, S. 37583. DOI: 10.1038/srep37583.

Batten, Frederick Eustace (1903): Cerebral degeneration with symmetrical changes in the maculae in two members of a family. In: *Trans Ophthalmol Soc UK*, 23, S. 386–390.

Beck, Michael (2018): Treatment strategies for lysosomal storage disorders. In: *Developmental medicine and child neurology* 60 (1), S. 13–18. DOI: 10.1111/dmcn.13600.

Brean, Are (2004): Beretning om et maerkeligt Sygdomstilfaelde--Stengel-Batten-Spielmeier-Vogts sykdom. In: *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* 124 (7), S. 970–971.

Carcel-Trullols, Jaime; Kovacs, Attila D.; Pearce, David A. (2015): Cell biology of the NCL proteins. What they do and don't do. In: *Biochimica et biophysica acta* 1852 (10 Pt B), S. 2242–2255. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.04.027.

Cascao, Rita; Fonseca, Joao E.; Moita, Luis F. (2017): Celastrol. A Spectrum of Treatment Opportunities in Chronic Diseases. In: *Frontiers in medicine* 4, S. 69. DOI: 10.3389/fmed.2017.00069.

Chaudhuri, Tapan K.; Paul, Subhankar (2006): Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. In: *The FEBS journal* 273 (7), S. 1331–1349. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05181.x.

Chen, Shao-Ru; Dai, Yan; Zhao, Jing; Lin, Ligen; Wang, Yitao; Wang, Ying (2018): A Mechanistic Overview of Triptolide and Celastrol, Natural Products from *Tripterygium wilfordii* Hook F. In: *Frontiers in pharmacology* 9, S. 104. DOI: 10.3389/fphar.2018.00104.

Chen, Yuan-Wu; Lin, Gu-Jiun; Chuang, Yi-Ping; Chia, Wei-Tso; Hueng, Dueng-Yuan; Lin, Chih-Kung et al. (2010): Triptolide circumvents drug-resistant effect and enhances 5-fluorouracil antitumor effect on KB cells. In: *Anti-cancer drugs* 21 (5), S. 502–513. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328337337c.

Deane, Catherine A. S.; Brown, Ian R. (2016): Induction of heat shock proteins in differentiated human neuronal cells following co-application of celastrol and arimocloamol. In: *Cell stress & chaperones* 21 (5), S. 837–848. DOI: 10.1007/s12192-016-0708-2.

Donsante, Anthony; Boulis, Nicholas M. (2018): Progress in gene and cell therapies for the neuronal ceroid lipofuscinoses. In: *Expert opinion on biological therapy* 18 (7), S. 755–764. DOI: 10.1080/14712598.2018.1492544.

Ezaki, J.; Takeda-Ezaki, M.; Oda, K.; Kominami, E. (2000): Characterization of endopeptidase activity of tripeptidyl peptidase-I/CLN2 protein which is deficient in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *Biochemical and biophysical research communications* 268 (3), S. 904–908. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2207.

- Ezaki, Junji; Tanida, Isei; Kanehagi, Nobuo; Kominami, Eiki (1999): A Lysosomal Proteinase, the Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis Gene (CLN2) Product, Is Essential for Degradation of a Hydrophobic Protein, the Subunit c of ATP Synthase. In: *Journal of Neurochemistry* 72 (6), S. 2573–2582. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722573.x.
- Geraets, Ryan D.; Langin, Logan M.; Cain, Jacob T.; Parker, Camille M.; Beraldi, Rosanna; Kovacs, Attila D. et al. (2017): A tailored mouse model of CLN2 disease. A nonsense mutant for testing personalized therapies. In: *PloS one* 12 (5), e0176526. DOI: 10.1371/journal.pone.0176526.
- Guhaniyogi, Jayita; Sohar, Istvan; Das, Kalyan; Stock, Ann M.; Lobel, Peter (2009): Crystal structure and autoactivation pathway of the precursor form of human tripeptidyl-peptidase 1, the enzyme deficient in late infantile ceroid lipofuscinosis. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (6), S. 3985–3997. DOI: 10.1074/jbc.M806943200.
- Hendrick, J. P.; Hartl, F. U. (1995): The role of molecular chaperones in protein folding. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (15), S. 1559–1569.
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01161576>: Safety Study of a Gene Transfer Vector (Rh.10) for Children With Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (LINCL). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01161576, zuletzt geprüft am 13.11.2019.
- <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2017-000645-48/FI>: Open-label study to evaluate efficacy and safety of Cystadane for the treatment of aspartylglucosaminuria. Cystadane in the treatment of AGU. Klinische Studie, Tikkanen, Ritva et al. (2017): Universität Gießen, zuletzt geprüft am 22.11.2019.
- <https://www.cln2connection.com/en-uk/overview/natural-history>: CLN2 Connection, zuletzt geprüft am 27.11.2019.
- <https://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=TPP1%20Gene%20>: TPP1 Gene(Protein Coding), zuletzt geprüft am 04.12.2019.
- Ju, W.; Zhong, R.; Moore, S.; Moroziewicz, D.; Currie, J. R.; Parfrey, P. et al. (2002): Identification of novel CLN2 mutations shows Canadian specific NCL2 alleles. In: *Journal of medical genetics* 39 (11), S. 822–825.
- Junaid, M. A.; Wu, G.; Pullarkat, R. K. (2000): Purification and characterization of bovine brain lysosomal pepstatin-insensitive proteinase, the gene product deficient in the human late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *Journal of Neurochemistry* 74 (1), S. 287–294. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0740287.x.
- Katz, Martin L.; Coates, Joan R.; Sibigtroth, Christine M.; Taylor, Jacob D.; Carpentier, Melissa; Young, Whitney M. et al. (2014): Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in a canine model of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2 disease). In: *Journal of neuroscience research* 92 (11), S. 1591–1598. DOI: 10.1002/jnr.23423.
- Kieran, Dairin; Kalmar, Bernadett; Dick, James R. T.; Riddoch-Contreras, Joanna; Burnstock, Geoffrey; Greensmith, Linda (2004): Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. In: *Nature medicine* 10 (4), S. 402–405. DOI: 10.1038/nm1021.

- Kim, Si Hyoung; Kang, Jun Goo; Kim, Chul Sik; Ihm, Sung-Hee; Choi, Moon Gi; Yoo, Hyung Joon; Lee, Seong Jin (2017): Cytotoxic effect of celastrol alone or in combination with paclitaxel on anaplastic thyroid carcinoma cells. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 39 (5), 1010428317698369. DOI: 10.1177/1010428317698369.
- Kirkegaard, Thomas; Gray, James; Priestman, David A.; Wallom, Kerri-Lee; Atkins, Jennifer; Olsen, Ole Dines et al. (2016): Heat shock protein-based therapy as a potential candidate for treating the sphingolipidoses. In: *Science translational medicine* 8 (355), 355ra118. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad9823.
- Kohan, Romina; Carabelos, María Noelia; Xin, Winnie; Sims, Katherine; Guelbert, Norberto; Cismondi, Inés Adriana et al. (2013): Neuronal ceroid lipofuscinosis type CLN2. A new rationale for the construction of phenotypic subgroups based on a survey of 25 cases in South America. In: *Gene* 516 (1), S. 114–121. DOI: 10.1016/j.gene.2012.12.058.
- Kohlschütter, Alfried; Goebel, Hans-Hilmar; Schulz, Angela; Lukacs, Zoltan (2005): Die neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen: Demenzerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen. In: *Deutsches Ärzteblatt* 102 (5), S. 284–288, zuletzt geprüft am 22.08.18.
- Kohlschütter, Alfried; Schulz, Angela (2016): CLN2 Disease (Classic Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis). In: *Pediatric endocrinology reviews : PER* 13 Suppl 1, S. 682–688.
- Lin, Yao-Cheng; Boone, Morgane; Meuris, Leander; Lemmens, Irma; van Roy, Nadine; Soete, Arne et al. (2014): Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. In: *Nature communications* 5, S. 4767. DOI: 10.1038/ncomms5767.
- Liu, C. G.; Sleat, D. E.; Donnelly, R. J.; Lobel, P. (1998): Structural organization and sequence of CLN2, the defective gene in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *Genomics* 50 (2), S. 206–212. DOI: 10.1006/geno.1998.5328.
- Liu, Junli; Lee, Jaemin; Salazar Hernandez, Mario Andres; Mazitschek, Ralph; Ozcan, Umut (2015): Treatment of obesity with celastrol. In: *Cell* 161 (5), S. 999–1011. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.011.
- Liu, Yuxin; Chen, Hui-Ling; Yang, Gengliang (2010): Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F protect dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced inflammatory damage. In: *The American journal of Chinese medicine* 38 (4), S. 801–814. DOI: 10.1142/S0192415X10008251.
- Löffler, Georg; Petrides, Petro E. (Hg.) (2003): Biochemie und Pathobiochemie. [mit Poster]. Siebte, völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Malatack, J. Jeffrey; Consolini, Deborah M.; Bayever, Eliel (2003): The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease. In: *Pediatric neurology* 29 (5), S. 391–403.
- Marks, William H. (2011): *Tripterygium wilfordii* Hook F. versus Sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis. A well-designed clinical trial of a botanical demonstrating effectiveness. In: *Fitoterapia* 82 (1), S. 85–87. DOI: 10.1016/j.fitote.2010.11.024.

- Marotta, Davide; Tinelli, Elisa; Mole, Sara E. (2017): NCLs and ER. A stressful relationship. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1863 (6), S. 1273–1281. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.04.003.
- Mink, Jonathan W.; Augustine, Erika F.; Adams, Heather R.; Marshall, Frederick J.; Kwon, Jennifer M. (2013): Classification and natural history of the neuronal ceroid lipofuscinoses. In: *Journal of child neurology* 28 (9), S. 1101–1105. DOI: 10.1177/0883073813494268.
- Mole, Sara E.; Williams, Ruth E. (1993, aktualisiert 2013): Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses. In: Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora J. H. Bean, Karen Stephens und Anne Amemiya (Hg.): GeneReviews((R)). Seattle (WA).
- MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, University College London, Gower Street, London. WC1E 6BT. United Kingdom. (2018): CLN2mutationtable. Online verfügbar unter <https://www.ucl.ac.uk/ncl/CLN2mutationtable.htm>, zuletzt geprüft 11.2019.
- Orphazyme: About Arimoclol. Online verfügbar unter <https://www.orphazyme.com/about-arimoclol/>, zuletzt geprüft am 26.09.2019.
- Pal, Aritra; Kraetzner, Ralph; Gruene, Tim; Grapp, Marcel; Schreiber, Kathrin; Grønborg, Mads et al. (2009): Structure of tripeptidyl-peptidase I provides insight into the molecular basis of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (6), S. 3976–3984. DOI: 10.1074/jbc.M806947200.
- Paulus, Werner; Schröder, J. Michael; Remmele, Wolfgang; Klöppel, Günter; Kreipe, Hans H. (2012): Pathologie. Neuropathologie. 3., neubearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Pathologie). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-02324-8>.
- Pear, W. S.; Nolan, G. P.; Scott, M. L.; Baltimore, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (18), S. 8392–8396. DOI: 10.1073/pnas.90.18.8392.
- Platt, Frances M.; Boland, Barry; van der Spoel, Aarnoud C. (2012): The cell biology of disease. Lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. In: *The Journal of cell biology* 199 (5), S. 723–734. DOI: 10.1083/jcb.201208152.
- Schulz, Angela; Kohlschütter, Alfred; Mink, Jonathan; Simonati, Alessandro; Williams, Ruth (2013): NCL diseases - clinical perspectives. In: *Biochimica et biophysica acta* 1832 (11), S. 1801–1806. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.04.008.
- Selden, Nathan R.; Al-Uzri, Amira; Huhn, Stephen L.; Koch, Thomas K.; Sikora, Darryn M.; Nguyen-Driver, Mina D. et al. (2013): Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *Journal of neurosurgery. Pediatrics* 11 (6), S. 643–652. DOI: 10.3171/2013.3.PEDS12397.
- Siakotos, A. N.; Watanabe, I.; Saito, A.; Fleischer, S. (1970): Procedures for the isolation of two distinct lipopigments from human brain. Lipofuscin and ceroid. In: *Biochemical medicine* 4 (5), S. 361–375.
- Skowyra, D.; Georgopoulos, C.; Zylitz, M. (1990): The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. In: *Cell* 62 (5), S. 939–944.

- Steinfeld et al. (2011): Diagnostik und Therapie der juvenilen Neuronalen Ceroid Lipofuszinose (JNCL). Online verfügbar unter https://cme.medlearning.de/ncl-stiftung/ncl_rez2/pdf/cme.pdf, zuletzt geprüft am 26.09.2019.
- Steinfeld, Robert; Steinke, Hans-Bertram; Isbrandt, Dirk; Kohlschütter, Alfried; Gärtner, Jutta (2004): Mutations in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase I to lysosomes. In: *Human molecular genetics* 13 (20), S. 2483–2491. DOI: 10.1093/hmg/ddh264.
- Tian, Yu; Sohar, Istvan; Taylor, John W.; Lobel, Peter (2006): Determination of the substrate specificity of tripeptidyl-peptidase I using combinatorial peptide libraries and development of improved fluorogenic substrates. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (10), S. 6559–6572. DOI: 10.1074/jbc.M507336200.
- Valenzano, Kenneth J.; Khanna, Richie; Powe, Allan C.; Boyd, Robert; Lee, Gary; Flanagan, John J.; Benjamin, Elfrida R. (2011): Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. In: *Assay and drug development technologies* 9 (3), S. 213–235. DOI: 10.1089/adt.2011.0370.
- Vines, D.; Warburton, M. J. (1998): Purification and characterisation of a tripeptidyl aminopeptidase I from rat spleen. In: *Biochimica et biophysica acta* 1384 (2), S. 233–242.
- Walus, Mariusz; Kida, Elizabeth; Wisniewski, Krystyna E.; Golabek, Adam A. (2005): Ser475, Glu272, Asp276, Asp327, and Asp360 are involved in catalytic activity of human tripeptidyl-peptidase I. In: *FEBS letters* 579 (6), S. 1383–1388. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.035.
- Welch, W. J.; Brown, C. R. (1996): Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. In: *Cell stress & chaperones* 1 (2), S. 109–115.
- Wheeler, R. B.; Schlie, M.; Kominami, E.; Gerhard, L.; Goebel, H. H. (2001): Neuronal ceroid lipofuscinosis. Late infantile or Jansky Bielschowsky type--re-revisited. In: *Acta neuropathologica* 102 (5), S. 485–488.
- Wiechers, Lisa; Samanta, Ananya; Nagel-Wolfrum, Kerstin (2017): Das Überlesen von Nonsense-Mutationen. In: *medizinische genetik* 29 (2), S. 217–224. DOI: 10.1007/s11825-017-0136-4.
- Xu, Miao; Motabar, Omid; Ferrer, Marc; Marugan, Juan J.; Zheng, Wei; Ottinger, Elizabeth A. (2016): Disease models for the development of therapies for lysosomal storage diseases. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1371 (1), S. 15–29. DOI: 10.1111/nyas.13052.
- Xue, Mei; Jiang, Zhen-zhou; Wu, Tao; Li, Ji; Zhang, Liang; Zhao, Yan et al. (2012): Anti-inflammatory effects and hepatotoxicity of Tripterygium-loaded solid lipid nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats. In: *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 19 (11), S. 998–1006. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.06.006.

12 Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mit diesen Zeilen möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bis zu meiner Promotion großartig unterstützt haben.

Mein großer Dank gilt meiner wunderbaren Familie und meinem Ehemann Daniel, die mich durch alle Höhen und Tiefen des Studiums begleitet haben. Ihr habt mir mit eurer Liebe immer den Rücken gestärkt und gebt mir Kraft auf allen meinen Wegen.

Für die stetige und unablässige Betreuung möchte ich mich im Besonderen bei Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen bedanken. Sie hat diese Arbeit von Beginn an begleitet, mir verlässlich zur Seite gestanden und auf ihre herzliche Art den gesamten Entstehungsprozess mit hilfreichen Ratschlägen vorangetrieben.

Ebenso gilt mein großer Dank Dr. Antje Banning, die mir besonders in der Phase des Schreibens und der Erhebung der Statistik mit vielen sehr wertvollen Tipps weitergeholfen hat. Sie hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und hat diese freundlich mit wissenschaftlicher Kompetenz beantwortet.

Das liebenswürdige Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe Tikkanen hat es mir leicht gemacht, mich für die Zeit meiner Doktorarbeit sehr wohl zu fühlen. Vielen Dank an Ralf Füllkrug und Petra Janson für die geduldige und herzliche Einarbeitung und Betreuung im Labor. Das Arbeiten mit euch hat mir viel Freude bereitet.

Ohne all eure Unterstützung wäre ich nie bis zu diesem Punkt gelangt. Ihr seid mir immer unheimlich gute und wichtige Ansprechpartner gewesen. Dafür danke ich euch von Herzen.