

**Nonsense-Mutationen des TPP1- Gens bei cLINCL: Potential der  
Readthrough-Therapie**

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

vorgelegt von  
**Vivian Kramer**  
aus Heppenheim

Gießen 2021



**Nonsense-Mutationen des TPP1- Gens bei cLINCL: Potential der  
Readthrough-Therapie**

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

vorgelegt von  
**Vivian Kramer**  
aus Heppenheim

Gießen 2021



Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Biochemie

Gutachter/in:

Prof. Dr.

Ritva

Tikkanen

Gutachter/in:

PD Dr.

Preising

Tag der Disputation: 18.05.2021



Für meine Familie



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Lysosomen und lysosomale Hydrolasen</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Grundlagen der Proteinbiosynthese</b> .....	<b>1</b>
1.2.1	Nonsense-Mutationen .....	2
1.2.2	Missense-Mutationen .....	2
1.2.3	Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau.....	2
1.3	<b>Die neuronalen Ceroidlipofuszinosen</b> .....	<b>3</b>
1.4	<b>Die klassische spätinfantile neuronale Ceroidlipofuszinose (CLN2)</b> .....	<b>6</b>
1.4.1	Pathogenese – Die Rolle der Tripeptidylpeptidase 1 .....	7
1.4.2	Bisherige Therapieoptionen.....	8
1.5	<b>Readthrough Substanzen</b> .....	<b>14</b>
1.5.1	Gentamicin .....	14
1.5.2	PTC124.....	17
1.5.3	Amlexanox.....	17
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>20</b>
2.1	<b>Materialien und Geräte</b> .....	<b>20</b>
2.2	<b>Chemikalien und Puffer</b> .....	<b>21</b>
2.3	<b>Kits und Säulen</b> .....	<b>24</b>
2.4	<b>Antikörper</b> .....	<b>24</b>
2.5	<b>Plasmid</b> .....	<b>25</b>
2.6	<b>Primer</b> .....	<b>25</b>
2.7	<b>Humane Zelllinien, Bakterienstämme und Mutanten</b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1	<b>Zellbiologische Standardmethoden</b> .....	<b>28</b>
3.1.1	Kultivierung von HEK-Zellen und Fibroblasten.....	28
3.1.2	Passagieren von HEK-Zellen und Fibroblasten .....	28
3.1.3	Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmid-DNA.....	28
3.1.4	Behandlung mit Amlexanox, Gentamicin und Ataluren.....	29
3.2	<b>Molekularbiologische Standardmethoden</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
3.2.2	Mutagenese .....	31
3.2.3	Plasmidpräparation (Mini).....	31
3.2.4	Plasmidpräparation (Midi).....	32
3.2.5	Zelllysatherstellung aus HEK-Zellen und Fibroblasten .....	33
3.2.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	33
3.2.7	SDS-PAGE.....	33
3.2.8	Western-Blot .....	34
3.2.9	Detektion.....	34
3.3	<b>Aktivitätsassay</b> .....	<b>35</b>
3.3.1	Photometrische TPP1-Aktivitätsbestimmung .....	35
3.4	<b>Statistik</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
4.1	<b>Klonierung von Arg127*, Arg208*, Ile287Asn und WT-TPP1 in das Plasmid pcDNA3</b> .....	<b>37</b>

<b>4.2</b>	<b>Transfektion von HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Konstrukten (WT-TPP1, Arg127*, Arg208*, Ile287Asn).....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Behandlungen mit Readthrough-Substanzen (Amlexanox, PTC124 und Gentamicin) .....</b>	<b>40</b>
4.3.1	48 h Behandlung der transfizierten HEK293T-Zellen mit Amlexanox.....	40
4.3.2	48 h Behandlung der transfizierten HEK293T-Zellen mit PTC124 (Ataluren) und Gentamicin .....	42
4.3.3	48 h Behandlung der Patientenfibroblasten mit Amlexanox.....	44
<b>4.4</b>	<b>Behandlung für fünf bzw. sieben Tage .....</b>	<b>47</b>
4.4.1	Zeitreihe transient transfizierter HEKs mit Amlexanox .....	47
4.4.2	Zeitreihe transient transfizierter HEKs mit PTC124 .....	49
4.4.3	Zeitreihe transient transfizierter HEKs mit Gentamicin.....	51
4.4.4	Zeitreihe Fibroblasten mit Amlexanox.....	53
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
5.1	Die Rolle des Nonsense-vermittelten RNA-Abbaus.....	56
5.2	Amlexanox-Behandlung ohne Auswirkung auf TPP1-Expressionslevel..	57
5.3	Amlexanox im Vergleich zu Gentamicin und PTC124 .....	59
5.4	Gründe für das Versagen eines Amlexanox-induzierten Readthrough....	61
5.5	Ausblick .....	64
	Deutsche Zusammenfassung.....	66
	Englische Zusammenfassung .....	67
	Tabellenverzeichnis.....	68
	Abbildungsverzeichnis .....	69
	Abkürzungsverzeichnis .....	71
	Literaturverzeichnis.....	73
	Erklärung zur Dissertation .....	80
	Danksagung .....	82
	Lebenslauf.....	84

# 1 Einleitung

## 1.1 Lysosomen und lysosomale Hydrolasen

Lysosomen sind von einer Membran umgebene Zellorganellen, die in ihrer Form und Größe eine enorme Diversität aufweisen. Lysosomen spielen eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel und werden in ihrer Gesamtheit auch als „Zellmagen“ bezeichnet, da sie Verdauungsenzyme zum Abbau verschiedenster Substanzen enthalten (Kurz et al., 2008; Sadava et al., 2011).

Lysosomen enthalten eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, welche dem Abbau von Makromolekülen wie Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und Nukleinsäuren in ihre monomeren Bestandteile dienen (Sadava et al., 2011). Die somit frei gewordenen Aminosäuren, Monosaccharide und Fettsäuren können der Zelle anschließend als Nährstoffe oder Bausteine wieder zur Verfügung gestellt und somit recycelt werden (Campbell et al., 2009). Die Hydrolasen werden von einem sauren pH-Wert (zwischen 4,5 und 5) im Inneren der Lysosomen aktiviert, welcher mithilfe einer Typ-V-Protonen-ATPase ständig aufrechterhalten werden muss (Amin et al., 2016; Arai et al., 1993). Im Lysosom werden einerseits extrazelluläre Partikel bzw. Moleküle abgebaut, die endozytotisch aufgenommen werden. Andererseits werden auch durch Autophagozytose aufgenommene, intrazelluläre Komponente verstoffwechselt (Xu et al., 2016).

Lysosomen sind essentiell für die Erneuerung von Proteinen und Organellen innerhalb der Zelle. Ist eine der Hydrolasen mutiert und somit funktionsunfähig, reichert sich das korrespondierende Substrat in der Zelle an. Dieser Mechanismus liegt einer großen Anzahl lysosomaler Speichererkrankungen zugrunde (Kurz et al., 2008).

## 1.2 Grundlagen der Proteinbiosynthese

Die in der DNA (engl. desoxyribonucleic acid) gespeicherte Information wird zunächst in mRNA (engl. messenger ribonucleic acid) transkribiert, bevor die Translation in die Aminosäuresequenz des Proteins erfolgt. Dieser als das zentrale Dogma der Molekularmedizin beschriebene Vorgang wurde erstmals 1958 von Francis Crick beschrieben (Crick, 1958).

Die Translation kann in vier Abschnitte unterteilt werden: Initiation, Elongation, Termination und Translokation. Die Übersetzung der genetischen Information in die Aminosäuresequenz des Proteins erfolgt durch die Basenpaarung zwischen den Codons der mRNA und den komplementären Anticodons der Aminoacyl-tRNAs (engl. transfer ribonucleic acid), während sie nacheinander an der ribosomalen A-Seite eintreten (Keeling

et al., 2012). Zur Termination der Translation kommt es, sobald ein Stop-Codon an der A-Stelle des Ribosoms eintritt. Für die drei Stop-Codons UAA, UAG und UGA existiert keine komplementäre tRNA. Stattdessen werden alle Stop-Codons von eRF1 (engl. eukaryotic release factor 1) erkannt. eRF1 liegt in einem Komplex mit der GTPase, eRF3 und GTP (Guanosintriphosphat) vor. eRF3 hydrolysiert das GTP, wodurch eRF1 die Hydrolyse der Polypeptidyl-tRNA auslöst und die fertige Polypeptidkette freigesetzt wird (Jackson et al., 2012).

### **1.2.1 Nonsense-Mutationen**

Bei einer Nonsense-Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, die ein Codon für eine Aminosäure in solcher Weise verändert, dass ein verfrühtes Stop-Codon entsteht (engl. premature stop codon, PTC). Nonsense-Mutationen führen somit zur Synthese von verkürzten Aminosäureketten bzw. kleineren Proteinen, als die Wildtyp-Form desselben Gens (Hartwell et al., 2011).

### **1.2.2 Missense-Mutationen**

Mutationen, die ein Codon dahingehend verändern, dass sie für eine andere Aminosäure codieren, bezeichnet man als Missense-Mutationen. In welchem Ausmaß die Mutation sich auf die Funktionsfähigkeit des späteren Proteins auswirkt, hängt unter anderem davon ab, ob die fälschlicher Weise eingebaute Aminosäure ähnliche Eigenschaften hat, wie jene, für die das Codon ursprünglich codierte. Wird das für Aspartat stehende Codon GAC beispielsweise durch eine Punktmutation zu GAG und codiert somit nun für Glutamat – beides Aminosäuren mit sauren Seitenketten – so hat die Mutation häufig kaum einen Effekt auf die Funktionsfähigkeit des Proteins (Hartwell et al., 2011). Man spricht von einer konservativen Mutation.

### **1.2.3 Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau**

Nonsense-mediated decay (NMD) ist ein mRNA-Kontrollmechanismus, welcher der Erkennung und Vernichtung von Transkripten dient, die ein vorzeitiges Stop-Codon enthalten. Diese Transkripte werden zu Beginn der Translation erkannt und abgebaut, wodurch die Synthese und Anhäufung funktionsunfähiger, verkürzter Proteine vermieden wird (Khajavi et al., 2006). In Säugetieren läuft die NMD wie folgt ab: Das translatierende Ribosom erkennt zunächst das vorzeitige Stop-Codon und hält an diesem inne. Das PTC ist unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass ihm ein sogenannter Exon-Verbindungs-Komplex (engl. exon junction complex, EJC) folgt (Ahn et al., 2013). Der EJC ist eine

Markierung, die ein Intron während des Spleißvorgangs an der Exon-Exon-Verbindungsstelle hinterlässt. Der EJC ermöglicht auf diese Weise eine Unterscheidung von einem normalen Stop-Codon (Thermann et al., 1998). Am angehaltenen Ribosom binden UPF1 (engl. up-frameshift protein 1) und SMG 1 (engl. suppressor with morphological effect on genitalia 1), dies führt zur Rekrutierung der eRF. Gemeinsam bilden sie den SMG1–eRF1–eRF3–UPF1-Komplex (SURF-Komplex) (Ahn et al., 2013). UPF1 stellt die Verbindung zu UPF2 und UPF3 her, welche an den EJC gebunden vorliegen (Khajavi et al., 2006). Das Vorliegen des vollständigen Überwachungskomplexes führt schließlich zum Abbau der fehlerhaften RNA. Sieht man von einigen Ausnahmen ab, wird ein PTC nicht als ein Substrat für die NMD erkannt, wenn es sich weniger als 50 bp (engl. base pairs) von der letzten Exon-Exon Verbindungsstelle entfernt befindet (Mendell & Dietz, 2001).

Die NMD ist ein wichtiger Kontrollmechanismus, um die Ansammlung von verkürzten, funktionsunfähigen Proteinen in der Zelle zu vermeiden. Jedoch werden auch mRNAs abgebaut, deren Translation zu verkürzten Proteinen mit vorhandener Restaktivität führen würde. Daher wird auch die Hemmung der NMD als mögliche Therapieoption bestimmter Erkrankungen untersucht (Khajavi et al., 2006).

### **1.3 Die neuronalen Ceroidlipofuszinosen**

Neuronale Ceroidlipofuszinosen (NCL) sind eine Gruppe vorwiegend autosomal rezessiv vererbter, neurodegenerativer Erkrankungen. Mit einer Inzidenz von 1:12.500 Geburten (in den USA und Skandinavien) gelten sie als häufigstes neurodegeneratives Leiden mit Beginn im Kindesalter (Rider & Rider, 1999). Charakteristisch für einen Großteil aller Formen ist ein progredienter Verlust der Sehkraft bis hin zur Blindheit, der fortschreitende Verlust kognitiver und motorischer Fähigkeiten, das Auftreten epileptischer Anfälle sowie der frühzeitig eintretende Tod (Haltia & Goebel, 2012). Besonders bezüglich des Auftretens erster Symptome und der Geschwindigkeit des Fortschreitens der Erkrankung zeigen die NCL-Formen starke Abweichungen voneinander (Schulz et al., 2013). Je nach Gen und Schweregrad der Mutation variiert der Zeitpunkt des ersten Auftretens von Symptomen: es gibt kongenitale, infantile, spät-infantile, juvenile und adulte Formen. Eine Gemeinsamkeit aller NCL ist die intralysosomale Akkumulation von Ceroid- und Lipofuszingranula, welche eine unter dem Elektronenmikroskop sichtbare, typische Ultrastruktur aufweisen (Radke et al., 2015; Zeman & Donahue, 1963). Obwohl diese autofluoreszierenden Lipopigmente in fast allen Geweben nachzuweisen sind, führen sie vor allem zur Schädigung und zum Untergang von Neuronen, während viele andere Zellen verschont bleiben (Cooper, 2003; Gupta & Hofmann, 2002).

Die erste klinische Beschreibung an NCL erkrankter Patienten erfolgte durch den norwegischen Allgemeinmediziner Dr. Otto Christian Stengel im Jahre 1826. Er beobachtete, dass vier Kinder augenscheinlich gesunder Eltern ab einem Alter von sechs Jahren fortschreitenden Visusverlust erlitten. Bis zu diesem Zeitpunkt entwickelten die Kinder sich vollkommen ohne Krankheitserscheinungen. Im Laufe der Jahre führte die Erkrankung zu vollkommener Blindheit, progressivem Verlust kognitiver Fähigkeiten, dem Verlust des Sprachvermögens, epileptischen Anfällen und schließlich zum frühen Tod der beiden ältesten Geschwister in einem Alter von 21 bzw. 20 Jahren (Stengel, 1826). Obwohl zum damaligen Zeitpunkt keine Autopsie durchgeführt wurde, konnten die Symptome rückblickend der CLN3 (Ceroidlipofuszinose 3) zugeordnet werden (Haltia & Goebel, 2012).

Ursprünglich wurden die Ceroidlipofuszinosen unter dem Begriff amaurotische, familiäre Idiotie zusammengefasst. Die Klassifizierung der bisher entdeckten NCL beruhte zunächst sowohl auf dem Zeitpunkt der Manifestation erster Symptome, als auch auf der Ultrastruktur des Speichermaterials (Siintola et al., 2006). Diese Klassifizierung auf Grundlage des klinischen und neuropathologischen Phänotyps ist insofern problematisch, als dass verschiedene Mutationen eines Gens zu vollkommen unterschiedlichen Erkrankungsformen und auch zu einem differierenden Erkrankungsbeginn führen können. Dies ist abhängig davon, ob Art und Lokalisation der Mutation innerhalb des Gens zu einer schwerwiegenden funktionellen Beeinträchtigung des Genprodukts führen (Haltia & Goebel, 2012). Die Funktion eines Enzyms ist besonders dann mit hoher Wahrscheinlichkeit eingeschränkt, wenn das aktive Zentrum von der Mutation betroffen ist. In Folge dessen wurde eine Klassifizierung der NCL basierend auf ihren jeweiligen Genorten entwickelt (Haltia, 2003). Tabelle 1-1 zeigt die verschiedenen NCL-Formen, den klinischen Phänotyp und die jeweiligen Leitsymptome.

Obwohl die konkret zugrundeliegenden, exakten Krankheitsmechanismen nach wie vor ungeklärt sind, konnten 13 Gene ausgemacht werden, deren Mutationen eine NCL-Erkrankung verursachen: PPT1, TPP1, CLN3, DNAJC5, CLN5, CLN6, MFSD8, CLN8, CTSD, GRN, ATP13A2, CTSF und KCDT7 (Mole et al., 2019; Mole & Cotman, 2015). Seit 1998 existiert eine Datenbank, in der sämtliche veröffentlichte NCL-Patienten erfasst werden. Zudem wird aufgeführt, welche Mutation der Erkrankung an der jeweiligen NCL-Form zugrunde liegt. Insgesamt sind bisher 493 verschiedene Mutationen dieser 13 Genen identifiziert worden (<https://www.ucl.ac.uk/ncl-disease/mutation-and-patient-database/mutation-and-patient-datasheets-human-ncl-genes>, Stand: 24.03.2020).

Die mit NCL assoziierten Proteine unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion, als auch in ihrem Vorkommen innerhalb der Zelle. Die meisten NCL-Proteine sind in Lysosomen zu finden (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN7, CLN10, CLN12 und CLN13). Die

Genprodukte von CLN6 und 8 wurden im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, während CLN4 und 14 im Zytoplasma an Vesikelmembranen gebunden vorkommen (Cárcel-Trullols et al., 2015). Die lysosomalen CLN-Proteine können nochmals unterteilt werden in lösliche Proteine, wie CLN1 (Palmitoyl Protein Thioesterase, PPT1), CLN2 (Tripeptidyl-Peptidase 1, TPP1), CLN5 (Funktion bisher unbekannt), CLN10 (Cathepsin D) und CLN13 (Cathepsin F) und lysosomale Transmembranproteine, wie CLN3, CLN7 und CLN12 (Cárcel-Trullols et al., 2015). Tabelle 1-2 zeigt eine Übersicht der CLN-Gene, welches Protein mutiert ist und wo es sich in der Zelle befindet.

Tabelle 1-1 Übersicht der NCL-Formen modifiziert nach (Neverman et al., 2015)

<b>NCL-Form</b>	<b>Klinischer Phänotyp</b>	<b>Leitsymptome</b>
CLN1	klassisch infantil, spätinfantil, juvenil, adult	progressiver Verlust kognitiver und motorischer Fähigkeiten, Visusverlust, Krampfanfälle, Ataxie
CLN2	spätinfantil, juvenil	progressiver Verlust kognitiver und motorischer Fähigkeiten, Visusverlust, Krampfanfälle, Ataxie
CLN3	klassisch juvenil	Sehkraftverlust
CLN4	adult (autosomal dominant)	Myoklonische Epilepsie
CLN5	spätinfantil, juvenile, adult	motorische Ungeschicktheit
CLN6	spätinfantil, adult (Kufs Typ A)	motorische Probleme und Krampfanfälle
CLN7	spätinfantil, juvenil, adult	Verlust kognitiver und motorischer Fähigkeiten
CLN8	spätinfantil	progressive Epilepsie, mentale Retardierung
CLN10	klassisch congenital, spätinfantil, adult	Krampfanfälle
CLN11	adult	Sehkraftverlust, Krampfanfälle
CLN12	juvenile	Lernstörung
CLN13	adulter Kufs Typ	Demenz und motorische Störungen
CLN14	infantile, progressive myoklonale Epilepsie 3	Krampfanfälle

Tabelle 1-2 Übersicht der NCL-Gene, die betroffenen Proteine und deren Lokalisation in der Zelle, modifiziert nach (Johnson et al., 2019)

CLN Gen	Genort	Protein	Zelluläre Lokalisation
CLN1	1p34	Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1)	lysosomales Lumen, extralysosomale Vesikel, ER, präsynaptische Gebiete in Neuronen
CLN2	11p15	Tripeptidyl-Peptidase (TPP1)	lysosomales Lumen, ER
CLN3	16p11	CLN3	spät-endosomale/lysosomale Membran
CLN4	20q13	Cystein-string Protein alpha (CSP $\alpha$ /DNAJC5)	Zytosol, assoziiert mit Vesikelmembranen; synaptische Vesikel in Neuronen; sekretorische Granula in Endo-/Exo- und Neurokrinen Zellen
CLN5	13q22	CLN5	lysosomales Lumen
CLN6	15q23	CLN6	ER Membran
CLN7	4q28	Major Facilitator Superfamily Domain Containing Protein 8 (MFSD8)	lysosomale Membran
CLN8	8p23	CLN8	ER-Membran, ER-Golgi-Interkompartiment Membran
CLN10	11p15	Cathepsin D (CTSD)	lysosomales Lumen
CLN11	17q21	Progranulin	sekretorischer Stoffwechselweg
CLN12	1p36	ATPase 13A2	lysosomale Membran
CLN13	11q13	Cathepsin F (CTSF)	lysosomales Lumen
CLN14	7q11	Potassium channel tetramerization domain-containing protein 7 (KCTD7)	Zytoplasma

#### 1.4 Die klassische spätinfantile neuronale Ceroidlipofuszinose (CLN2)

Die CLN2 oder auch klassische spätinfantile neuronale Ceroidlipofuszinose (engl. classic late infantile NCL, cLINCL) wird meist in einem Alter von zwei bis vier Jahren mit dem Einsetzen von heftigen Krampfanfällen diagnostiziert. Die Erkrankung schreitet rasch voran, wobei die klinischen Symptome besagte Krämpfe, Erblindung, Ataxie, Verlust

motorischer und mentaler Fähigkeiten und fortschreitende Demenz beinhalten (Haltia, 2003). Als Erstbeschreiber der CLN2 gilt Max Bielschowsky, welcher 1913 die Erkrankung dreier Geschwister schilderte, die die oben genannten Symptome zum gleichen Zeitpunkt entwickelten (Bielschowsky, 1913).

Typische, frühe Merkmale der CLN2 sind Krampfanfälle, beginnend ab einem Alter von etwa zweieinhalb Jahren und der zunehmende Verlust koordinierter Muskelbewegung. Die Bewegungsabläufe der betroffenen Kinder wirken aus diesem Grund oft unbeholfen, und sie stürzen häufig. Auch das Sprachvermögen geht verloren, bis hin zum vollkommenen Verlust der Sprachfähigkeit innerhalb weniger Monate. Binnen zwei Jahren zeigen die Patienten eine Maculadegeneration, welche zu einem zunehmenden Visusverlust und dem gänzlichen Erblinden der meisten Patienten in einem Alter von sechs Jahren führt. Das Einsetzen eines exzessiven Speichelflusses ab einem Alter von circa fünf Jahren, gepaart mit Schwierigkeiten beim Schlucken, führt zu häufigen Pneumonien. Die Ernährung über eine Magensonde ist unumgänglich, um Lungeninfektionen und Dehydrierung zu vermeiden (Boustany, 1992). Die Erkrankung geht mit dem fortschreitenden Verlust von Neuronen und den Fotorezeptoren der Retina einher. Hirnatrophie und Erblindung sind die Folge. Betroffene Kinder werden kaum älter als 6 bis 15 Jahre (Mole, 1998).

#### **1.4.1 Pathogenese – Die Rolle der Tripeptidylpeptidase 1**

Das Gen, welches bei CLN2 mutiert ist, liegt auf dem Chromosom 11p15 und codiert für das Enzym Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) (Sleat et al., 1997; Vines & Warburton, 1999). Bis heute wurden 131 Mutationen identifiziert, die zu einer Erkrankung an CLN2 führen (<http://www.ucl.ac.uk/ncl/>, Stand: 24.03.2020). Tabelle 1-3 zeigt eine Auflistung aller Arten der bisher erfassten TPP1-Mutationen. Bei 17 dieser Mutationen handelt es sich um vorzeitige Stop-Codons. Eine besonders verbreitete Mutation ist R208X. Es handelt sich um eine Transition C → T, welche zu einem vorzeitigen Stop-Codon anstelle des Arginin-Codons an der Aminosäure 208 von 563 führt (Sleat et al., 1999).

TPP1 wird als inaktives Proenzym synthetisiert und erst dann durch autokatalytische Prozesse zu einer aktiven Serinprotease prozessiert, wenn es einem sauren pH-Wert ausgesetzt ist. Der Vorläufer hat eine Molekülmasse von 67 kDa. Das prozessierte Enzym hat eine molekulare Masse von 45 kDa (Lin et al., 2001). TPP1 erwies sich in Versuchen als Tripeptidase, das heißt, es spaltet Tripeptide am N-Terminus von Polypeptiden ab und trägt somit zu deren Abbau bei. Weiterhin konnte auch eine Endopeptidaseaktivität nachgewiesen werden. Beide Funktionen scheinen bei einer CLN2 Erkrankung gestört zu sein (Ezaki et al., 2000). Die *in vivo* Substrate von TPP1 sind aktuell noch unbekannt. Ist

das Enzym aufgrund einer Mutation defekt, reichern sich Substrate in den Lysosomen an, zu deren Abbau TPP1 für gewöhnlich beitragen würde. Auch der auf molekularer Ebene zugrunde liegende Pathomechanismus der TPP1-Unterfunktion ist bisher wenig verstanden und Gegenstand aktueller Forschungsarbeit (Fietz et al., 2016). Ein Hauptbestandteil des in den Lysosomen gespeicherten Materials in Zellen mit TPP1-Mangel ist die C-Untereinheit der mitochondrialen Adenosintriphosphat (ATP) - Synthase (Gupta & Hofmann, 2002). Obwohl in nahezu allen Geweben die intrazelluläre Speicherung der autofluoreszierenden Lipofuszingranula zu beobachten ist, sind Neuronen besonders stark von der schädlichen Wirkung betroffen. Eine mögliche Erklärung ist, dass außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) eine andere Peptidase dazu in der Lage ist, die fehlende Funktion von TPP1 zu kompensieren (Bernardini & Warburton, 2002).

Tabelle 1-3 Gesamtanzahl der seit 1998 erfassten TPP1-Mutationen, Mutationsformen, sowie die Anzahl der betroffenen Patienten und Familien

Gesamtanzahl Mutationen	131
Missense	63
Nonsense	17
Frameshift	21
Deletion	1
Insertion	1
Deletion insertion	2
Splicing variant	19
Other	7
Anzahl Patienten	389
Anzahl Familien	316

#### 1.4.2 Bisherige Therapieoptionen

Zur Therapie von CLN2 gibt es einige vielversprechende, in Tierversuchen entwickelte Therapieansätze, die weiterhin experimentell untersucht werden. Bisher konnte keine Behandlung den Krankheitsverlauf gänzlich aufhalten. Zu diesen aussichtsreichen Therapiemöglichkeiten zählen unter anderem die Adeno-assoziierte Viren (AAV)-vermittelte Gentherapie, die Enzyersatztherapie, die Stammzelltherapie und pharmakologischen Chaperone (Neverman et al., 2015).

### **Small molecule therapy – Chaperone**

Punktmutationen können zu fehlgefalteten Proteinen führen, welche nicht vollständig funktionsunfähig sind, sondern eine Restaktivität aufweisen. Die Kontrollmechanismen des endoplasmatischen Retikulums erkennen die Mutation und bauen das Protein ab, bevor es gefaltet werden kann. Pharmakologische Chaperone sind dazu in der Lage, selektiv an den mutierten Proteinen zu binden, sie zu stabilisieren und somit vor einem Abbau zu schützen (Valenzano et al., 2011). Pharmakologische Chaperone haben ein sehr geringes Molekulargewicht, was auch bei oraler Verabreichung zu einer großen Bioverfügbarkeit führt und ihnen ermöglicht, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

Bisher hat die Chaperon-Therapie zur Therapie von NCL-Erkrankungen noch nicht das Stadium klinischer Tests erreicht. Untersuchungen an CLN1-Patienten-Lymphoblasten zeigten vielversprechende Ergebnisse: Die Behandlung mit der als Chaperon wirksamen Substanz CS38 konnte die PPT1-Aktivität in den Zellen verdoppeln (Dawson et al., 2010). Pharmakologische Chaperone sind nur dann eine Therapieoption, wenn die Patienten eine Missense-Mutation tragen, welche nicht das aktive Zentrum des Enzyms betrifft (Neverman et al., 2015). Bei Patienten mit CLN2 stellen solche Missense-Mutationen eine Minderheit dar, weshalb die Chaperon-Therapie eine Nischenbehandlung für diese seltenen Formen bleiben wird (Wong et al., 2010).

### **ERT**

Die Enzymersatztherapie (engl. enzyme replacement therapy, ERT) beruht auf dem Prinzip der Kreuzkorrektur: Zellen sind dazu in der Lage mittels rezeptorvermittelter Endozytose funktionsfähige Enzyme oder deren Vorstufen aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen. Ermöglicht wird die Aufnahme und der Transport des extrazellulär bereitgestellten Enzyms durch den ubiquitär vorkommenden Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Wong et al., 2010), wie in Abbildung 1-1 dargestellt.

Cerliponase Alpha (rhTPP1, BMN 190, Brineura™) ist ein rekombinantes, humanes TPP1-Proenzym, welches von BioMarin Pharmaceutical Inc. (Novato, CA, USA) entwickelt wurde. Li Lin und Peter Lobel zeigten mittels *in vitro* Experimenten, dass CLN2-Patienten Fibroblasten, welche rekombinantem TPP1 ausgesetzt waren, TPP1 Aktivität aufwiesen und die Akkumulation der Untereinheit C der mitochondrialen ATP-Synthase in den Zellen nachweislich abnahm (Lin & Lobel, 2001). In einem Tierversuch in Form eines CLN2 Dachshund Modells wurde die Verteilung, Wirkung und die Verträglichkeit von intracerebroventrikulär (ICV) verabreichten, rekombinantem TPP1 untersucht (Katz et al., 2014; Vuilleminot et al., 2015). Es wurde eine Enzymaktivität des rhTPP1 im gesamten ZNS, sowie eine reduzierte Akkumulation von Speichermaterial beobachtet. In neurologischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Neurodegeneration bei

den behandelten Hunden verzögert oder sogar unterbunden werden konnte. Insgesamt erwies sich das ICV verabreichte rhTPP1 in der Studie als sicher und wirksam. Dieses positive Resultat führte zu einer Studie an humanen CLN2-Patienten (clinicaltrials.gov, NCT01907087). Ziel der Studie war die Bewertung der Sicherheit, Verträglichkeit, Pharmakokinetik und Effizienz der rhTPP1-Infusionen. Hierfür wurde initial 24 Patienten in einem Alter zwischen drei und 16 Jahren für einen Zeitraum von mindestens 96 Wochen alle 14 Tage 300 mg ICV rhTPP1 verabreicht. Die Administration erfolgte mittels chirurgisch unter die Kopfhaut implantiertem Rickham- oder Ommaya-Reservoir in den Ventriculus lateralis cerebri. Die Infusion erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 2,5 ml pro Stunde über vier Stunden (Schulz et al., 2018). Mobilität und Sprachvermögen wurden dabei anhand einer CLN2-spezifischen Bewertungsskala (s. Tabelle 1-4) beurteilt und mit einer historischen, unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

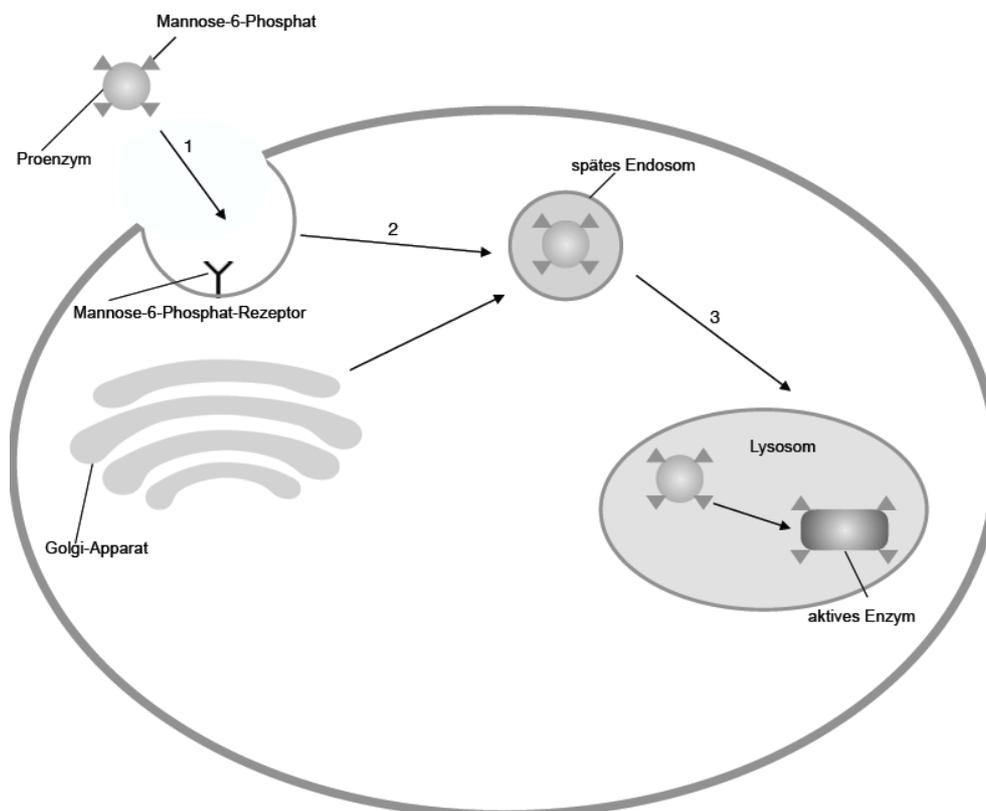


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Enzym-Ersatztherapie modifiziert nach (Johnson et al., 2019)

Tabelle 1-4 CLN2-spezifische Bewertungsskala modifiziert nach (Schulz et al., 2018)

Wert	Beschreibung	
	Motorik	Sprache
3	größtenteils normaler Gang, keine auffällige Ataxie, keine pathologischen Stürze	normale Sprache, größtenteils verständlich und dem Alter entsprechend, keine merklichen Rückschritte
2	unabhängiger Gang (mindestens 10 Schritte ohne fremde Hilfe), offensichtliche Instabilität und möglicherweise sporadische Stürze	Sprache mit erkennbaren Auffälligkeiten, welche jedoch einige verständliche Wörter beinhaltet; Fähigkeit, kurze Sätze zu formen, um Bedürfnisse und Ideen mitteilen zu können
1	fremde Hilfe beim Laufen notwendig oder nur Krabbeln möglich	undeutliche Sprache, mit wenigen verständlichen Wörtern
0	weder Laufen noch Krabbeln möglich	keine verständlichen Wörter

Die Therapie führte zu einem geringeren Rückgang der motorischen und sprachlichen Fähigkeiten, im Vergleich zum natürlichen, unbehandelten Krankheitsverlauf. Die durchschnittliche Zeit bis zu dem Verlust von zwei Punkten in der Bewertungsskala ist während des Untersuchungszeitraums in der Gruppe der behandelten Patienten nicht erreicht worden. Der Verlust von zwei Punkten in der historischen Kontrollgruppe trat nach durchschnittlich 345 Tagen ein. Nebenwirkungen, welche auf die Behandlung zurückgeführt werden konnten, waren generell mild (beispielsweise Fieber, Übelkeit, Hypersensibilitäten). Ernste Nebenwirkungen umfassten Infektionen der intraventrikulären Apparatur (drei Shunt-bezogene Infektionen bei zwei Patienten). Bei beiden Patienten konnte die Therapie nach Entfernen des Shunts, Antibiotikatherapie und Wiedereinsetzen der Apparatur fortgeführt werden (Schulz et al., 2018). Es gab keine Studienabbrüche aufgrund von Nebenwirkungen. Die positiven Ergebnisse führten zu einer Erweiterung der Studie, welche voraussichtlich im Januar 2021 endet (clinicaltrials.gov, NCT02485899). Es folgte zudem eine Phase II Studie ab Februar 2016, welche im Jahr 2023 beendet wird (clinicaltrials.gov, NCT02678689). In den USA wurde Cerliponase Alpha im April 2017 zugelassen. In Europa erfolgte die Zulassung zur Behandlung von CLN2 in allen Altersklassen im Mai 2017 (Markham, 2017).

ERT stellt eine praktikable Therapieoption dar. Dennoch bleiben die kontinuierlich notwendige, intracerebrale Darreichung, die damit verbundenen mehrstündigen Klinikaufenthalte und die Gefahr einer Infektion des intracerebralen Shunts ein Hindernis für eine lebenslange Behandlung.

## **Gentherapie**

Eine äußerst vielversprechende und womöglich langfristig wirksame Therapieoption für lysosomale Speichererkrankungen stellt die Gentherapie dar (Wong et al., 2010). Im Rahmen der Gentherapie wird die für die funktionsfähige Wildtyp-Form des Enzyms codierende cDNA (engl. copy desoxyribonucleic acid) mittels eines viralen Vektors in das ZNS des Patienten geschleust. Das Ziel der Therapie ist, dass die auf diese Weise transduzierten Zellen die korrekte Version des Proteins überexprimieren und via Sekretion Nachbarzellen zur Aufnahme bereitstellen (Neverman et al., 2015).

Im Rahmen vorklinischer Studien wurde Serotyp 2 Adeno-assoziiertes Virus (AAV2) als Vektor verwendet, um normale, menschliche CLN2-cDNA in das Gehirn von Versuchstieren zu schleusen. Hierbei wurden Sicherheit und Effizienz der Therapie ermittelt. Eine Studie an sowohl Ratten, als auch Primaten zeigte, dass mittels AAV2 intrakraniell eingeschleuste hTPP1-DNA zu einem hohen Level an aktivem TPP1 in den Lysosomen von Neuronen führte (Sondhi et al., 2005). Eine Expression des TPP1 konnte in den Gehirnen der Ratten für bis zu 18 Monate und in den Gehirnen der Primaten für bis zu drei Monate nachgewiesen werden. Schwere Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt. Marco A. Passini und seine Kollegen konnten in einer therapeutischen Studie mit CLN2<sup>-/-</sup>-Mäusen nach intrakraniellen Injektionen eines AAV2-TPP1 Vektors eine Verminderung des autofluoreszierenden Speichermaterials feststellen (Passini et al., 2006). Auf Grundlage jener Ergebnisse fand eine erste klinische Phase-I-Studie statt: Zehn CLN2-Patienten erhielten zwölf AAV-TPP1-Injektionen ins Gehirn-Parenchym. Ein Patient starb, nachdem er einen Status epilepticus erlitt, dessen Ätiologie nicht ermittelt werden konnte. Vier weitere Patienten entwickelten eine geringfügige Immunreaktion gegen den Vektor. MRT (Magnetresonanztomographie)-Untersuchungen wiesen auf ein verlangsamtes Voranschreiten der Erkrankung im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe hin, was zusätzlich durch eine spezifische Bewertungsskala neurologischer NCL-Symptome bestätigt werden konnte. Die Zahl der Probanden war zu klein, um statistisch signifikante Ergebnisse erzielen zu können. Zudem fehlte eine Placebo-Kontrollgruppe und die Studie war weder verblindet noch randomisiert. Dennoch wiesen die Ergebnisse auf einen verlangsamten Krankheitsverlauf hin (Worgall et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Martin L. Katz testete, ob die Gentransfektion von Ependymzellen in TPP1<sup>-/-</sup>-Hunden mittels rekombinantem AAV2, welches canines TPP1 (caTPP1) exprimiert, einen längerfristigen, therapeutischen Effekt erzielen kann (Katz et al., 2015). Hierfür wurde eine einmalige, intraventrikuläre Injektion des AAV2-TPP1 durchgeführt, was zu einer Expression des TPP1 in den Ependymzellen und einer Sekretion des Enzyms in den Liquor cerebrospinalis führte. Die mit rAVV.caTPP1 behandelten, erkrankten Hunde zeigten ein späteres Einsetzen erster Symptome, einen

verlangsamten Krankheitsverlauf und eine verlängerte Lebensspanne (Katz et al., 2015). Eine Phase I Studie mit dem Ziel, Sicherheit und therapeutische Effizienz der Gentherapie bei CLN2 zu bewerten, startete 2010 und endet voraussichtlich im Dezember 2020 (NCT01161576). Eine weitere Phase I/II Studie mit demselben Protokoll, allerdings anderen Kriterien zur Auswahl der Studienteilnehmer, wurde im Februar 2017 beendet (NCT01414985). Ergebnisse wurden bisher allerdings nicht veröffentlicht. Als Vektor wurde in beiden Studien AAV des Serotyps 10 verwendet. Obwohl insbesondere die bisherigen Erkenntnisse aus den Tierversuchen ermutigend sind, bedarf es weiterer Forschungsarbeit und Studien, um die Gentherapie für NCL-Erkrankungen zu optimieren.

### **Stammzelltherapie**

Die Stammzelltherapie beruht auf dem Grundprinzip, dass gesunde Spenderzellen ins ZNS migrieren können. Dort können sie entweder funktionsfähiges Enzym bereitstellen (Kreuzkorrektur), oder selbst in den jeweiligen Gewebetyp differenzieren und erkrankte Zellen ersetzen. Letztere Möglichkeit könnte, aufgrund einer späten Diagnose, die Regeneration von verloren gegangenem Nervengewebe ermöglichen (Neverman et al., 2015).

Versuche an PPT1-Knockout-Mäusen zeigten, dass Stammzelltransplantationen direkt ins Gehirn zu einer erfolgreichen Migration und einer kontinuierlichen Sekretion des funktionsfähigen Enzyms führten. Bei PPT1-Knockout-Mäusen handelt es sich um ein Tiermodell für CLN1. Es konnte eine vielversprechende Verminderung des autofluoreszierenden Speichermaterials in den Empfängerzellen und deren verlängerte Überlebenszeit nachgewiesen werden (Tamaki et al., 2009).

Im September 2009 endete eine Studie, die in erster Linie Sicherheit und Verträglichkeit, weniger die Wirksamkeit, einer Stammzelltransplantation direkt ins Gehirn bei sechs Patienten (mit CLN1 oder CLN2) untersuchte (ClinicalTrials.gov NCT00337636). Den Patienten wurden humane Stammzellen des zentralen Nervensystems (human central nervous system stem cells, huCNS-SCs) transplantiert, woraufhin eine Immunsuppression für einen Zeitraum von einem Jahr stattfand. Nach der Transplantation aufgetretene Komplikationen konnten ausschließlich auf den normalen Krankheitsverlauf zurückgeführt werden und waren nicht mit den Spenderzellen in Verbindung zu bringen. Die Untersuchung der Auswirkung auf den Krankheitsverlauf war von der Tatsache eingeschränkt, dass nur Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zur Studie zugelassen waren. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Verträglichkeit der Transplantation von huCNS-SCs erlauben weitere Erforschung der neuronalen Stammzelltherapie als potentielle Therapiemethode für bestimmte Subtypen der NCL (Selden et al., 2013).

## 1.5 Readthrough Substanzen

Bei etwa 11 % der Genschäden, die zu einer Erbkrankheit des Menschen führen, handelt es sich um Nonsense-Mutationen (Mort et al., 2008). Es kommt zu einem verfrühten Abbruch der Translation. Auf diese Weise entstehen verkürzte inaktive, instabile oder sich auf den Zellstoffwechsel negativ auswirkende Produkte (Sleat et al., 2001). Wird die Nonsense-Mutation unterdrückt, ist die Synthese von Proteinen voller Länge möglich. Aufgrund der hohen Inzidenz von Nonsense-Mutationen bei genetischen Erkrankungen wäre eine Therapie mit dem Ziel, die Nonsense-Mutation zu unterdrücken, für eine Vielzahl von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen von großem Nutzen (Wilschanski et al., 2003). Es gibt Substanzen, die in der Lage sind, zu einem Readthrough dieser vorzeitigen Stop-Codons zu führen. Hierzu zählen Gentamicin, PTC124 (Ataluren) und Amlexanox, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

### 1.5.1 Gentamicin

Gentamicin ist ein Aminoglykosidantibiotikum, welches zusätzlich zu seinen antibakteriellen Eigenschaften die Fähigkeit aufweist, zu einem Readthrough von Stop-Codons zu führen. Aminoglykoside binden an einem hoch-konservierten Aminoacyl-tRNA Bereich (A-Stelle, engl. A site) der ribosomalen, prokaryotischen 16 S-RNA an der 30 S-Untereinheit, verhindern hierdurch eine korrekte Translation und wirken auf diese Weise antimikrobiell. Wie in Abbildung 1-2 zu erkennen ist, unterscheidet sich der entsprechende eukaryotische 18S rRNA-Abschnitt an der 40S-Untereinheit in nur zwei Basen von der prokaryotischen Sequenz (Lynch & Puglisi, 2001). Gezeigt ist die Nummerierung von *E. coli* für Prokaryoten (hellgrau) und von *S. cerevisiae* für Eukaryoten (dunkelgrau). Rot markiert sind die Unterschiede zwischen eukaryotischem und prokaryotischem Decodierabschnitt, welche die Bindungsaffinität von Aminoglycosiden beeinflussen. Diese minimalen, aber entscheidenden Unterschiede minimieren die Affinität, mit der die Aminoglykoside am Decodierungsabschnitt der rRNA binden.

Auf diese Weise wird der Translationsvorgang in Eukaryoten durch die Einwirkung der Aminoglykoside nicht gänzlich behindert, sondern lediglich ungenauer (Recht et al., 1999). Eine dem Stop-Codon nah verwandte Aminoacyl-tRNA tritt in den ribosomalen A-Bereich ein, und die Translation wird fortgesetzt (Keeling et al., 2012). Tabelle 1-5 zeigt die den Stop-Codons eng verwandten Codons für Aminosäuren, welche im Falle eines Readthrough höchstwahrscheinlich in die Aminosäurekette eingefügt werden.

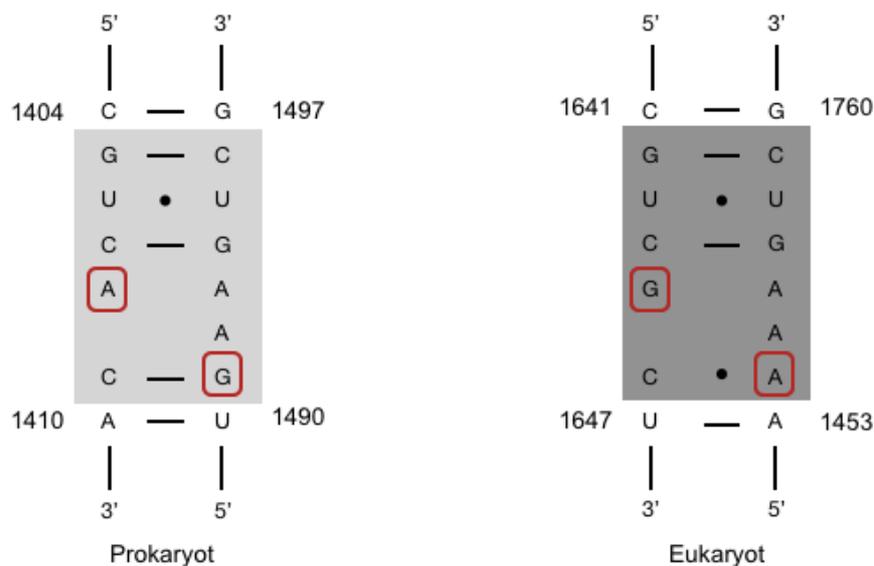


Abbildung 1-2 Vergleich der prokaryotischen und der eukaryotischen Aminoacyl-tRNA Bereich,e modifiziert nach (Recht et al., 1999)

Sowohl vorklinische, als auch klinische Studien mit Gentamicin lieferten Hinweise auf eine Wirksamkeit als mögliches Therapeutikum bei verschiedenen genetischen Erkrankungen (Brooks et al., 2006). 1999 wurde eine erste *in-vivo* Studie mit Gentamicin als Readthrough Therapeutikum durchgeführt. Bei den Untersuchungen an einem Mausmodell der Duchenne Muskeldystrophie wurde eine vermehrte Expression von Dystrophin voller Länge durch die subkutane Injektion von Gentamicin festgestellt. Bei dem Tiermodell handelt es sich um *mdx*-Mäuse, die eine Nonsense-Mutation des Dystrophin-Gens aufweisen (Barton-Davis et al., 1999). Diese ermutigenden Ergebnisse konnten in einer Studie mit Muskeldystrophie-Patienten, die 14 Tage intravenös mit 7,5 mg/kg/Tag Gentamicin behandelt wurden, nicht bestätigt werden. Als potentielle Gründe hierfür wurden eine möglicherweise zu geringe Serumkonzentration, sowie die unbekannte Halbwertszeit des menschlichen Muskeldystrophins und somit eine womöglich zu kurze Behandlungsdauer diskutiert (Wagner et al., 2001).

In einer 2003 durchgeführten klinischen Studie wurde das Nasenepithel von Patienten mit Mukoviszidose topisch mit Gentamicin behandelt. Die Mukoviszidose wird hervorgerufen durch eine Mutation im Gen, welches für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) codiert. Aufgrund der Mutation hat das Genprodukt, ein Transmembranprotein, welches in der apikalen Membran sekretorischer Zellen den Transport von Natrium und Chlorid reguliert, keine oder nur eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit (Kelley et al., 1997). Es wurde herausgefunden, dass durch die Behandlung der Nasenepithelzellen mit Gentamicin bei 90 % der Patienten mit einer

CFTR Nonsense-Mutation die Funktionsfähigkeit des CFTR wiederhergestellt werden konnte (Wilschanski et al., 2003).

Tabelle 1-5 Stop-Codons und jeweils nah verwandte Aminosäuren modifiziert nach (Keeling et al., 2012)

UAA		UAG		UGA	
nah- verwandtes Codon	codierte Aminosäure	nah- verwandtes Codon	codierte Aminosäure	nah- verwandtes Codon	codierte Aminosäure
CAA	Gln	CAG	Gln	CGA	Arg
AAA	Lys	AAG	Lys	AGA	Arg
GAA	Glu	GAG	Glu	GGA	Gly
UUA	Leu	UUG	Leu	UUA	Leu
UCA	Ser	UCG	Ser	UCA	Ser
UGA	STOP	UGG	Trp	UAA	STOP
UAU	Tyr	UAU	Tyr	UGU	Cys
UAC	Tyr	UAC	Tyr	UGC	Cys
UAG	STOP	UAA	STOP	UGG	Tip

Die Arbeitsgruppe um David E. Sleat führte im Jahr 2001 eine Studie an Fibroblasten von CLN2-Patienten durch. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob eine Behandlung mit Gentamicin zu einer Wiederherstellung der TPP1-Aktivität führt. Hierbei konnte für die Mutation R208X eine Wiederherstellung von 5 % und für die Mutation R127X 7 % des normalen TPP1 Aktivitätslevels festgestellt werden (Sleat et al., 2001). Die Effektivität eines durch Gentamicin herbeigeführten Readthrough unterliegt einer großen Variabilität. Aufgrund der großen Komplexität der Readthrough Regulationsmechanismen kann das Durchlesen eines Stop-Codons nicht anhand seiner Nukleotidabfolge oder seines Kontextes vorhergesagt werden (Bidou et al., 2004).

Die Verwendung von Gentamicin als (Langzeit-)Therapeutikum ist durch einige Faktoren limitiert. Zu den Nebenwirkungen von Gentamicin zählen Oto- und Nephrotoxizität (Hinshaw et al., 1947). Hinzu kommt eine schlechte Bioverfügbarkeit, weshalb die Verabreichung intravenös oder intramuskulär erfolgen muss (Brooks et al., 2006). Da Gentamicin schon seit Jahrzehnten zur Behandlung bakterieller Infektionen verwendet wird, sind seine Nebenwirkungen und pharmakokinetischen Eigenschaften gut untersucht und dokumentiert (Kahlmeter & Dahlager, 1984). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Langzeitbehandlung mit Gentamicin durch den generalisierten Readthrough von normalen Stop-Codons zu bisher unbekanntem Nebenwirkungen führt (Bidou et al., 2004).

### 1.5.2 PTC124

Um die Nebenwirkungen von Aminoglykosiden zu umgehen, wurde nach besser verträglichen Substanzen gesucht, die ebenfalls einen Readthrough hervorrufen können. Eines dieser Medikamente ist PTC124 (3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4]oxadiazol-3-yl]-benzoic acid;  $C_{15}H_9FN_2O_3$ ), welches von PTC Therapeutics Inc. bei einem High-Throughput Screening entdeckt wurde. PTC124, auch als Ataluren bezeichnet, zeigt eine Selektivität für vorzeitige Stop-Codons, wobei der genaue Mechanismus hierfür noch nicht bekannt ist (Hirawat et al., 2007). Zudem ist es oral bioverfügbar, nicht-toxisch und gut verträglich, wodurch PTC124 ein großes klinisches Potential aufweist (Du et al., 2008). PTC124 förderte sowohl in Zellen von Menschen, welche ein Dystrophin Nonsense-Allel exprimierten, als auch in Zellen von mdx-Mäusen, die Dystrophin-Produktion (Welch et al., 2007). Bei den Versuchen zeigte PTC124 bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  (17  $\mu\text{M}$ ) den effizientesten Readthrough. Eine klinische Studie mit 19 Mukoviszidose-Patienten, die für zwölf Wochen mit PTC124 behandelt wurden, ergab, dass es zu einer Verbesserung der CFTR-Aktivität und der klinischen Parameter kam (Wilschanski et al., 2011). Andere Studien kamen zu weniger vielversprechenden Ergebnissen: Van Ommen et al. untersuchten die Wirkung von PTC124 an humanen Organoiden mit zystischer Fibrose. Dabei konnte keine Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit von CFTR durch die PTC124 Behandlung festgestellt werden (Ommen et al., 2016). Eine Phase-III-Studie, bei der die Langzeiteffekte einer PTC124 Behandlung bei 160 Patienten mit Duchenne und Becker Muskeldystrophie untersucht werden, endet 2020 (clinicaltrials.gov, Identifikationsnummer NCT01247207).

### 1.5.3 Amlexanox

Amlexanox wurde bisher zur Behandlung von Ulzerationen im Mundbereich verwendet (Uma Maheswari & Shanmugasundaram, 2013). Zudem befindet es sich derzeit in einer Phase II Studie zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 (clinicaltrials.gov, Identifikationsnummer: NCT01842282). Die Fähigkeit von Amlexanox ein Readthrough zu induzieren, wurde erstmals von Gonzalez-Hilarion et al. 2012 beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Amlexanox in den behandelten Zellen neben einer Zunahme der von der Nonsense-Mutation betroffenen mRNA auch zur Synthese von funktionsfähigem Protein voller Länge führte (Gonzalez-Hilarion et al., 2012).

2017 veröffentlichten Atanasova et. al eine Studie, in der die Wirkung von Amlexanox auf Patientenzellen *in vitro* untersucht wurde, die im Gen für Typ-VII-Kollagen (COL7A1) ein frühzeitiges Stop-Codon exprimierten. Diese Mutation führt zur rezessiven Form von Epidermolysis bullosa. Es handelt sich um eine Hauterkrankung, bei der sich aufgrund des

Mangels an Typ-VII-Kollagen die Epidermis von der darunterliegenden Dermis löst. Die Studie wurde mit Patientenzellen von 14 verschiedenen Patienten mit zwölf unterschiedlichen Nonsense-Mutationen durchgeführt. Nach 48-stündiger Behandlung mit Amlexanox in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  konnte in Western Blot Analysen aus Zellysaten bei acht von zwölf getesteten Patienten eine erhöhte Menge an Kollagen VII mit voller Länge festgestellt werden. Vier der zwölf untersuchten Mutationen zeigten keine Anzeichen für das Stattfinden eines Readthrough, weder mit Amlexanox, noch mit dem ebenfalls getesteten Gentamicin (Atanasova et al., 2017). Vor Beginn der Studie wurden verschiedene Konzentrationen von Amlexanox auf ihr Readthrough-Potential getestet. Bei einer Behandlungsdauer von 48 Stunden mit einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  konnte die höchste Menge an Kollagen voller Länge nachgewiesen werden. Amlexanox zeigte somit bei dieser Konzentration die größte Readthrough-Effektivität (Atanasova et al., 2017).

### **Zielsetzung**

Die einzige derzeit zugelassene Therapieoption für CLN2 ist die Enzyersatztherapie. Aufgrund der Invasivität und der lebenslang notwendigen, mehrstündigen Klinikaufenthalte alle zwei Wochen ist die Enzyersatztherapie mit großen Einschränkungen für die Patientin und deren Familien verbunden. Aus diesem Grund wird nach weiteren Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von CLN2 gesucht. In dieser Arbeit soll das Potential einer Readthrough-Therapie bei Nonsense-Varianten des CLN2-Gens untersucht werden. Die orale Verabreichung von Readthrough-Substanzen wäre weitaus weniger invasiv und damit im Alltag praktikabler, als die Enzyersatztherapie.

Die Auswirkung einer Behandlung mit den Substanzen Gentamicin, PTC124 und Amlexanox auf Zellen, welche eine Nonsense-Mutation des TPP1-Gens exprimieren, hinsichtlich der Expression und Aktivität des TPP1-Enzyms sollte untersucht werden. Der Fokus lag hierbei vor allem auf der Substanz Amlexanox, welche durch ihre orale Bioverfügbarkeit, der Fähigkeit, ein Readthrough herbeizuführen, sowie den Nonsense-mediated-decay-hemmenden Eigenschaften ein besonders großes therapeutisches Potential hat.

Man ging davon aus, dass Zellen, welche eine TPP1-Nonsense Mutation exprimieren, durch eine Behandlung mit den Readthrough-Substanzen eine erhöhte Menge an funktionsfähigem TPP1 voller Länge synthetisieren.

Hierfür sollten cDNA mit den Varianten Arg127\*, Arg208\* und Ile287Asn in pcDNA3-Expressionsplasmide kloniert und die Expression von TPP1, sowie die Enzymaktivität in transfizierten HEK293T-Zellen mittels Western Blots und Aktivitätsassays untersucht

werden. Teilweise sollten die Untersuchung auch mit Patientenfibroblasten durchgeführt werden, welche ebenfalls die genannten Mutationen exprimierten.

## 2 Material

### 2.1 Materialien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte mit den dazugehörigen Herstellern und deren Sitz sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1 Materialien und Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Neolab, Heidelberg (DE)
BioRad CFX Connect TM Real –Time System	BioRad Laboratories GmbH, München (DE)
CryoPure Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht (DE) + Greiner-Bio-One, Kremsmünster (A)
Entwickler Maschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (DE)
Filter-Papier	Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire (UK)
Glas-Pasteurpipetten (230 mm)	VWR International, Darmstadt (DE)
Heizblock	Laborgeräte München, München (DE)
Inkubator	Sanyo, Osaka (J)
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (DE)
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire (UK)
OptiPlate™-96-F	PerkinElmer Life Sciences, Zaventem (Belgium)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Brampton (Kanada)
Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl , 5, 10 ml)	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf (DE)
Polystyrolküvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Reaktionsgefäße (0,5 ,1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Röntgenfilm (Super RX Fuji medical X-ray films)	FUJIFILM, Düsseldorf (DE)
Schüttler (KS-15)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (DE)
SDS-Gel-Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)

Spannungsquelle (Elektrophoresis power supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (DE)
Spektralphotometer (BioPhotometer plus)	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf (DE)
Sterilbank (Herasafe KS)	Thermo Scientific, St.Leon-Rot (DE)
Tecan infinite M 200	Tecan,Männedorf (CH)
Tischzentrifuge	Labnet, Langenfeld
T-Personal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (DE)
Vortex Bio Vortex V1	PEQLAB, Erlangen (DE)
Waage Toledo PB602- S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (DE)
Western-Blotsystem Criterion Blotter	Bio Lab Laboratories GmbH, München (DE)
Zellkultur 6/12-Well Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellkultur-Flaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (DE)
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich, Kirchlengern (DE)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner-Bio-One, Kremsmünster (A)

## 2.2 Chemikalien und Puffer

Die verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen, sowie deren Zusammensetzung und Hersteller sind in Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-2 Verwendete Chemikalien und Lösungen sowie deren Hersteller

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe (DE)
Agarose	Roth, Karlsruhe (DE)
Amlexanox	Cayman, Biomol GmbH, Hamburg (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)
APS (Ammoniumpersulfat)	Applichem, Darmstadt (DE)
Bradford Reagenz	BioRad, München (DE)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (DE)
BSA (Bovine Serum Albumine)	PAA, Cölbe (DE)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Gibco, Thermo Fisher Scientific (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe (DE)
DNA-Ladepuffer	eigene Herstellung
DNA-Marker	eigene Herstellung
DTT (Dithiothreitol)	Applichem, Darmstadt (DE)
ECL Western blotting detection reagent	Thermo Scientific, Rockford (USA)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe (DE)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt (DE)
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (DE)
Gentamicin	Serva, Heidelberg (DE)
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Lysozym	Roth, Karlsruhe (DE)
MACSfectin	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach (DE)
Methanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt (DE)
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe (DE)
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
PBS ( engl. phosphate-buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Ponceau S	Applichem, Darmstadt (DE)
Precision Plus Protein Standard	BioRad, München (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
PTC124 (Ataluren)	Cayman, Biomol GmbH, Hamburg (DE)
Salzsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe (DE)

TEMED (N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan)	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris	Applichem, Darmstadt (DE)
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt (DE)

Tabelle 2-3 Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockpuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% MeOH
DMEM++	4,5 g/l Glucose (high glucose) 10% Fötale Kälberserum 1% Penicillin /Streptomycin
ECL-Lösung (verstärkte Chemilumineszenz Lösung)	100 mM Tris HCl (pH 8,5) 1,25 mM Luminol 0,2 mM Cumarinsäure
Glycerol-Stock-Puffer	65% Glycerol 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris-HCl (pH 8)
Lämmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB (engl. lysogeny broth)-Agar	15 g Agar-Pulver 1 l LB-Medium
LB-Medium	20 g LB broth 1 l dd H <sub>2</sub> O
Lysepuffer (nach Stürmer)	50 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
Natriumacetatpuffer für TPP1-Aktivitätsassay	50 mM NaAc (Essigsäure → pH 4,7) 100 mM NaCl
PBS (1x) (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)	150 mM NaCl 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Ponceau Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure

## Material

SOC-Medium	LB-Medium 0,8% Glucose
Stop-Lösung für TPP1-Aktivitätsassay	0,5 M EDTA (NaOH → pH 12)
Substrat für TPP1-Aktivitätsassay	20 mM AAF-AMC (Ala-Ala-Phe-7-amido-4-methylcoumarin, Sigma A3401) in DMSO
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	40 mM Tris (pH 8,0) 1 mM EDTA
TBST (Tris buffered saline + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0.05% Tween

## 2.3 Kits und Säulen

Die Kits und Säulen in Tabelle 2-4 wurden bei der Versuchsdurchführung verwendet.

Tabelle 2-4 Kits und Säulen

NucleoSpin Plasmid (NoLid) (Mini-Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co, Düren (DE)
NucleoBond Xtra DNA purification (Midi-Prep.)	Macherey Nagel GmbH & Co, Düren (DE)

## 2.4 Antikörper

In Tabelle 2-5 sind die beim Western-Blot eingesetzten Primärantikörper dargestellt.

Tabelle 2-5 Verwendete Primärantikörper, der jeweiligen Verdünnung und deren Hersteller

Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
TPP1	Maus	1:1000	Santa Cruz (Dallas, USA)
GAPDH	Maus	1:10000	Abcam via Biozol, (Eching, DE)

Als Sekundärantikörper diente ein HRP-gekoppelter (engl. *horseradish peroxidase*), Ziege anti-Maus Antikörper, mit einer Verdünnung von 1:10000 der Firma Dako (Hamburg, DE).

## 2.5 Plasmid

Bei der transienten Transfektion wurde das Grundplasmid pcDNA3 der Firma Invitrogen (Karlsruhe, DE) mit einem TPP1-ORF (engl. open reading frame) verwendet. Es enthält Resistenzen gegen Ampicillin und Neomycin, sowie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI.

## 2.6 Primer

Die bei der Klonierung und Mutagenese eingesetzten Primer, ihre Sequenzen und Schnittstellen sind in Tabelle 2-6 aufgelistet. Die Schnittstelle der Klonierungsprimer ist hervorgehoben. In der Sequenz der Mutagenese-Primer ist das veränderte Nukleotid farblich markiert.

Tabelle 2-6 Klonierungs- und Mutagenese-Primer, ihre Sequenzen und darin enthaltenen Schnittstellen

Primer	Sequenz 5' nach 3'
hTPP1-start-EcoRI	CTATA <b>GAATTC</b> ATGGGACTC CAAGCCTG
hTPP1-nonstop-XhoI	CTATA <b>CTCGAG</b> GGGGTTGAGT AGAGTCTTCAGC
hTPP1-stop-XhoI	CTATA <b>CTCGAG</b> TCA GGGGTTGAGT AGAGTCTTC
TPP1 Arg127* fwd	CTGACTTGCTGGCTGAGCATCTGACAAGCAGA GCTGCTGCTC
TPP1 Arg127* rev	GAGCAGCAGCTCTGCTTGTGTCAGATGCTCAGCC AGCAAGTCAG
TPP1 Arg208* fwd	CCCCCTCTGTGATCCGTAAGTGATACTCACTTG ACCTCACAAG
TPP1 Arg208* rev	CTTGTGAGGTCAAGTTGTATCACTTACGGAT CACAGAGGGG
TPP1 Ile287Asn fwd	GATGAGTGCTGGTGCCAACAACCTCCACCTGGG TCTACAGTAG
TPP1 Ile287Asn rev	CTACTGTAGACCCAGGTGGAGTTGTTGGCACC AGCACTCATC

Die bei der qRT-PCR Amplifikation eingesetzten Primer, ihre Sequenzen und ihre NCBI (National Center of Biological Information) Referenzsequenzen sind in Tabelle 2-7 aufgelistet.

Tabelle 2-7 q-RT-PCR Primer, ihre Sequenzen und die NCBI Referenzsequenzen der entsprechenden Zielgene

Primer	Sequenz 5' nach 3'	NCBI Ref Seq.
hTPP1 (CLN2) fwd	GCCCTGCCACATGTGCATACTG	NM_000391.3
hTPP1 (CLN2) rev	CACTGTACCTGAGGCCGAAGAG	NM_000391.3
hYwhaz fwd	AGGTTGCCGCTGGTGATGAC	NM_145690.2
hYwhaz rev	GGCCAGACCCAGTCTGATAGGA	NM_145690.2
hB2M fwd	AGATGAGTATGCCTGCCGTGTG	NM_004048
hB2M rev	TGCGGCATCTTCAAACCTCCA	NM_004048
hRPL13a fwd	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	NM_012423.2
hRPL13a rev	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	NM_012423.2

## 2.7 Humane Zelllinien, Bakterienstämme und Mutanten

In Tabelle 2-8 sind die verwendeten Zelllinien, sowie der eingesetzte Bakterienstamm aufgelistet.

Die Auswirkung einer Behandlung mit Amlexanox auf die TPP1-Synthese ist an Zellen untersucht worden, welche TPP1-Mutationen exprimierten, wie sie in Patientenzellen vorkommen. Die TPP1-Mutationen wurden hierfür als DNA-Konstrukte generiert, indem zunächst der Einbau der entsprechenden Punktmutationen in Plasmid-DNA erfolgte. Mit diesen Konstrukten wurden HEK293-Zellen transfiziert, sodass sie die in Tabelle 2-9 aufgelisteten TPP1-Mutationen exprimierten.

Tabelle 2-8 Humane Zelllinien und der Bakterienstamm sowie deren Referenz und eine kurze Beschreibung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
HEK293-Zellen	Humane, embryonale Nierenzellen	ATTC, Teddington, (U.K.)
TPP1-KO-Zellen	TPP1-Knockout Zellen, kein endogenes TPP1	Ritva Tikkanen (Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, DE)
Fibroblasten, Wildtyp	Humane Hautfibroblasten	Steven Gray
Fibroblasten, Patient	Zellen mit zwei compound heterozygoten TPP1-Nonsense-Mutationen (Arg127* und Arg 208X, 2xSTOP)	Coriell Institute (USA) GM16485
Fibroblasten, Patient	Zellen mit TPP1-Missense Mutation (Ile287Asn)	Coriell Institute (USA) GM09404
E.Coli XL-1 Blue	Zur Vermehrung der Plasmidkonstrukte	Stratagene, La Jolla (CA)

Tabelle 2-9 Bezeichnung der Mutanten, exprimierte Mutation und Art der Mutation

<b>Bezeichnung</b>	<b>Mutation</b>	<b>Art der Mutation</b>
Arg127*	TGA statt CGA, Stop-Codon anstelle der 127. Aminosäure	Nonsense-Mutation
Arg208*	TGA statt CGA, Stop-Codon anstelle der 208. Aminosäure	Nonsense-Mutation
Ile287Asn	AAC statt ATC, Codon codiert für Asparagin statt für Isoleucin	Missense-Mutation

### **3 Methoden**

#### **3.1 Zellbiologische Standardmethoden**

##### **3.1.1 Kultivierung von HEK-Zellen und Fibroblasten**

Die Zellen wurden bei 37 °C, 8 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Zellkultur-Flaschen mit 5 ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/l Glukose), welches mit 10 % FCS (Fötale Kälberserum) und, zur Vermeidung von Kontaminationen, mit 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die optische Beurteilung der Zellen erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Motic, Wetzlar (DE)).

##### **3.1.2 Passagieren von HEK-Zellen und Fibroblasten**

Waren die Zellen zu etwa 100 % konfluent, wurden sie gesplittet. Hierzu wurde das verbrauchte Medium verworfen und es erfolgte ein Waschschrift mit ca. 2 ml 1xPBS. Nun wurden 500 µl 1xTrypsinlösung auf die Zellen gegeben und diese für maximal drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Peptidasen in der Trypsinlösung verdauen extrazelluläre Proteine und lösen auf diese Weise enzymatisch die Zell-Zell- und Zell-Matrix Verbindungen, wodurch die Zellen in Suspension gebracht werden. Um die Adhäsion von Fibroblasten zu lösen, wurde vor der Trypsinierung zunächst eine ca. zweiminütige Behandlung mit 0,05 % EDTA in PBS durchgeführt.

Nach der Inkubationszeit wurden ca. 2 ml DMEM++ zugefügt und die Lösung durch auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Zugabe von DMEM++ inhibiert die Aktivität der Peptidasen, welche nur unter alkalischen Bedingungen optimal wirken können.

Anschließend konnten die trypsinisierten Zellen auf andere Zellkulturflaschen ausgesät als Erhaltungskultur und/oder für Versuchsreihen verwendet werden.

##### **3.1.3 Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit Plasmid-DNA**

Um eine erhöhte Expression von TPP1 in den zu untersuchenden Zellen (Wildtyp) bzw. die Expression von funktionsunfähigem TPP1 (Missense-/Nonsense-Mutanten) zu untersuchen, wurde Plasmid-DNA mit dem für das Enzym codierenden Bereich in die Zellen transfiziert.

Dies geschah unter Verwendung von Macsfectin, welches Komplexe mit den DNA-Molekülen bildet und aufgrund seiner Lipophilie dazu in der Lage ist, die

Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu durchdringen. Auf diese Weise wird der Inhalt der Vesikel ins Zellinnere geschleust, wo die Plasmid-DNA schließlich exprimiert werden kann.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf 12-Well-Platten ausgesät, sodass sie am darauffolgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten. Für die transiente Transfektion war die Vorbereitung von jeweils zwei Ansätzen nötig: zum einen 100 µl Optimem, welchem 1,6 µl Macsfectin zugefügt wurden, zum anderen 100 µl Optimem, in welches 400 ng DNA gegeben wurde.

Anschließend wurde der Macsfectin-Ansatz zu dem Ansatz mit der DNA pipettiert, durch kräftiges Auf- und Abpipettieren durchmischt und bei Raumtemperatur ca. 20 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Zellen gewechselt.

Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix tropfenweise gleichmäßig auf das jeweilige Well verteilt und die Zellen zurück in den Zellinkubator gestellt. Am nächsten Tag konnten die transient transfizierten Zellen auf 6-well-Platten ausgesät werden.

### **3.1.4 Behandlung mit Amlexanox, Gentamicin und Ataluren**

Mit der Aussaat der Zellen auf die 6-well-Platten fand zeitgleich die Behandlung mit den jeweiligen Substanzen (Amlexanox, Gentamicin oder Ataluren) statt. Zunächst wurden die Zellen jeweils für 48 h behandelt. Hierfür wurde das Nährmedium mit der jeweiligen Substanz versetzt. Amlexanox wurde in einer Endkonzentration von 25 µM verwendet. Die Behandlung mit Gentamicin erfolgte in einer Endkonzentration von 250 µg/ml und mit PTC124 in einer Konzentration von 17 µM. In späteren Versuchsreihen wurde die Behandlungsdauer auf fünf bzw. sieben Tage gesteigert. Dabei wurden die Zellen so gesplittet, dass sie am Tag der Ernte konfluent waren. Sowohl beim Splitten der Zellen, als auch beim Wechsel des Mediums, wurde das frische Nährmedium mit der jeweiligen Substanz in der oben genannten Endkonzentration versetzt.

## **3.2 Molekularbiologische Standardmethoden**

### **3.2.1 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die PCR musste zunächst die RNA aus den Lysaten der Fibroblasten isoliert werden. Die geernteten Fibroblasten wurden mit 1 ml Trifast versetzt und bei -20 °C eingefroren. Für die RNA-Isolation wurden die Proben aufgetaut und mit 200 µl Chloroform versetzt, 15 sec kräftig geschüttelt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie für 15 min mit 12.000 g bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert,

woraufhin die oberste Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt wurde. Zur Fällung der RNA wurden nun 400 µl Isopropanol zugegeben und durch Schwenken vermischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min mit 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet war daraufhin gut am Boden des Eppendorf-Gefäßes zu erkennen und der Überstand konnte vorsichtig abpipettiert werden. Von nun an wurde auf Eis weitergearbeitet. Es folgte die Zugabe von 800 µl Ethanol (75 %) und eine Durchmischung durch Vortexen. Anschließend wurde für 5 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und erneut 800 µl Ethanol hinzugegeben und erneut abzentrifugiert und der Überstand wiederum abpipettiert. Die RNA-Pellets wurden nun für 15 min luftgetrocknet und abschließend in 25 µl DEPC-Wasser gelöst.

Die aus den Fibroblasten isolierte RNA wurde nun zunächst in cDNA umgeschrieben. Diese ist erheblich stabiler als RNA. Zudem kann nur die doppelsträngige cDNA als Matrize für die PCR dienen. Der Vorgang des Umschreibens wird als reverse Transkription bezeichnet.

Der Ansatz (1 µg RNA, die entsprechende Menge DEPC-Wasser, um 19,5 ml Ansatz zu erhalten und 1,5 µl Oligo dTPimer) wurde zunächst für vier Minuten bei 72 °C vorinkubiert, was zur Denaturierung der RNA führte. Anschließend wurde der Reaktionsmix bestehend aus 3 µl dNTP, 4,5 µl Puffer (10x) für die reverse Transkriptase, 0,5 µl RNAsin, 0,5 µl Reverse Transkriptase (M-MuLV, Invitrogen, Karlsruhe, DE) und 15,5 µl DEPC-Wasser zugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch Erhitzen des Ansatzes auf 94 °C für 10 Minuten.

Zur DNA-Amplifikation für die qRT-PCR (engl. quantitative real-time PCR) wurde der SYBR Green Mix (BioRad Laboratories GmbH, München, DE)) verwendet. Jeder der folgenden Pipettierschritte erfolgte auf Eis. Zunächst wurde der Mastermix, bestehend aus 5 µl 2x SYBR Green Mix, 0,2 µl 25 mM Primer fwd und 0,2 µl 25 mM Primer rev hergestellt und jeweils 5,3 µl/well vorgelegt. Anschließend wurden 4,6 µl cDNA (1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt) hinzugegeben. Der Blank, welcher als Negativkontrolle diente, enthielt 4,6 µl reines DEPC-Wasser.

Zunächst wurden die Ansätze einmalig für 2 min auf 95 °C erhitzt, was zur Denaturierung der Template-DNA führte. Nun folgten weitere 10 s bei 95 °C, ein Annealing-Schritt bei 60 °C für 20 s und die Synthese bei 72 °C für 20 s. Der Zyklus wurde 39 Mal wiederholt. Die relative Quantifizierung der qPCR erfolgte mithilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Hierzu wurde der Normalisierungsfaktor als geometrisches Mittel aus den drei Referenzgenen RPL13a, B2M und YWAHZ berechnet. Diese drei Referenzgene werden in der AG Tikkanen standardmäßig verwendet.

### 3.2.2 Mutagenese

Um die Wirkung von Amlexanox auf CLN2-Nonsense Mutationen exprimierende Zellen untersuchen zu können, mussten zunächst die entsprechenden Varianten des Enzyms als DNA-Konstrukte generiert werden. Diese konnten anschließend per transienter Transfektion in die Zellen eingefügt werden.

Der erste Schritt war die Punktmutationen in die Plasmid-DNA einzufügen. Die hierfür benötigten PCR-Ansätze enthielten 40,8 µl Wasser, 0,2 µl Plasmid-DNA (=400 ng DNA), 5 µl 10xPCR-Puffer, 1 µl Primer fwd (10 µM), 1 µl Primer rev (10 µM), 1 µl dNTPs und 1 µl Phu-Turbo-Polymerase. Die Ansätze wurden im Thermo-Cycler für 6 min auf 95 °C erhitzt, um die DNA zu denaturieren. Nun folgte für 1 min ein Annealing-Schritt bei 65 °C. Die Synthese fand bei 68 °C für 12 min statt.

Der Zyklus wurde 19 Mal wiederholt und anschließend wurde eine Ethanol-fällung bei -20 °C über Nacht durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Ansätze zunächst bei 15.000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, wiederum 200 µl 70 %iger Ethanol dazugegeben und erneut abzentrifugiert. Nachdem das Pellet luftgetrocknet worden war, konnte es in 22,5 µl DEPC-Wasser gelöst werden und der DpnI-Verdau stattfinden. Der DpnI-Verdau dient dazu, die Wildtyp DNA zu eliminieren. Dies ist möglich, da die verwendete Nuklease ausschließlich methylierte DNA spaltet. Die bei der PCR neu entstandene DNA ist allerdings nicht methyliert und bleibt so von einem Abbau verschont. Der Probe wurden hierfür 2,5 µl CutSmart-Puffer und 1 µl DpnI hinzugefügt und der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 80 °C hitzeinaktiviert.

Nun konnten E.-coli-Bakterien mit der gewonnenen DNA transformiert werden: zu 100 µl Bakteriensuspension wurden 10 µl Plasmid-DNA gegeben und für 15 – 30 min auf Eis inkubiert. Nun folgten ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C und weitere 1-2 min auf Eis. Anschließend wurde 1 ml SOC-Medium ohne Antibiotikazusatz zugefügt und den Bakterien 45 min Zeit gelassen, bei 37 °C und 220 rpm im Bakterienrüttler ohne Selektionsdruck zu wachsen. Hiernach folgte das Ausplattieren auf LB-Platten mit Ampicillin und eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### 3.2.3 Plasmidpräparation (Mini)

Zunächst wurden Einzelkolonien von den LB-Platten gepickt und diese in ein 15-ml-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium (+ Ampicillin) gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator. Am nächsten Tag konnte die Isolierung der

Plasmid-DNA gemäß des Protokolls „NucleoSpin Plasmid (NoLid)“ der Firma Macherey-Nagel stattfinden.

Jeweils 2 ml der Bakteriensuspension wurden in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das überstehende Medium konnte nun abpipettiert und verworfen werden. Auf das übrig gebliebene Pellet wurden erneut 2 ml der jeweiligen Bakteriensuspension gegeben und der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Das somit aus 4 ml Bakteriensuspension entstandene Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer (= Buffer A1) durch gründliches Vortexen wieder gelöst. Nun wurden 250 µl Lysepuffer (= Buffer A2) hinzugefügt und durch Schwenken des Eppendorfgefäßes gemischt. Es erfolgte eine fünfminütige Inkubationszeit. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (= Buffer A3). Wiederum wurde durch Schwenken sorgfältig gemischt. Die so entstandenen Lysate wurden bei Raumtemperatur für 5 min mit 11.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in eine NucleoSpin Plasmid / Plasmid (NoLid) Säule gegeben, welche zuvor in ein Sammelröhrchen platziert wurde. Nach dem Zentrifugieren (1 min bei 11.000 rpm) konnte der Durchfluss verworfen und die Silikatmembran gewaschen werden. Hierfür wurden zunächst 500 µl AW-Puffer auf die Säule gegeben, wiederum für 1 min mit 11.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Hiernach folgte ein weiterer Waschschrift mit 600 µl Waschpuffer (= Buffer A4, mit Ethanol versetzt). Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 rpm wurde die Membran getrocknet. Das Sammelröhrchen konnte nun verworfen werden und die Säule wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß platziert. Das Lösen der DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer (= AE Buffer), einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und ebenfalls einminütiger Zentrifugation bei 11.000 rpm. Die DNA-Proben wurden zu Eurofins Scientific SE (Luxemburg) zum Sequenzieren geschickt, um festzustellen, welche der Klone die Mutation enthielten.

### **3.2.4 Plasmidpräparation (Midi)**

Wurde bei der Sequenzierung festgestellt, dass die Klone die jeweilige Mutation enthielten, dann konnte eine Bakterienkultur für eine Midi-Plasmidpräparation angesetzt werden. Hierfür wurden 1 ml Bakterienkultur in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Plasmid-Präparation gemäß der Anleitung „NucleoBond Xtra DNA purification (Midi-Prep.)“ der Firma Macherey-Nagel erfolgen.

### 3.2.5 Zelllysatherstellung aus HEK-Zellen und Fibroblasten

Um das zu untersuchende Protein zu extrahieren und zu untersuchen, mussten die Zellen lysiert werden. Zunächst wurden das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit kaltem 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS mithilfe eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes abgeschabt, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 4 °C für 5 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Es wurden 150 µl (bei Ernte von HEKs) bzw. 80 µl (bei Ernte von Fibroblasten) Stürmer-Lysepuffer auf das entstandene Zellpellet gegeben und 30 min auf Eis lysiert. Zwischenzeitlich wurde mehrmals gevortext. Nach der Lyse erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4° C. Der Überstand (das Lysat) war nun frei von unlöslichen Zellbestandteilen und konnte in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden.

### 3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Zelllysate enthalten unterschiedlich hohe Konzentrationen an Proteinen. Um für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) gleichmäßig konzentrierte, direkt vergleichbare Gelproben herstellen zu können, musste zunächst die Proteinkonzentration der Lysate gemessen werden, um diese bei der Herstellung der Gelproben ausgleichen zu können.

Die Messung erfolgte mittels Bradford-Proteinbestimmung. Neben den Triplikaten der BSA-Standard-Reihe (10 µl Probe + 200 µl 1:5 verdünnter Bradfordlösung), welche als Referenz dienten, wurden jeweils Triplikate der Lysate (10 µl 1:25 verdünntes Lysat + 200 µl 1:5 verdünnter Bradfordlösung) auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die photometrische Konzentrationsmessung erfolgte bei einer Absorption von 595 nm in einem iTecan-Reader.

### 3.2.7 SDS-PAGE

Bei einer SDS-PAGE werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Proben hierfür wurden folgendermaßen hergestellt: 100 µl Gelprobe sollten, wenn möglich, 100 µg Protein enthalten. War die Proteinkonzentration des am geringsten konzentrierten Lysates zu gering, so musste die Proteinmenge an eben dieses Lysat angepasst werden. Der entsprechenden Menge Lysat wurde destilliertes Wasser hinzugefügt, um ein Volumen von 75 µl zu erreichen. Den Proben wurden schließlich noch 25 µl 4xLadepuffer,

welcher zuvor in mit Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration 50 mM) versetzt wurde, zugegeben und für 4 min bei 94 °C abgekocht.

Anschließend konnte das 10 %ige SDS-Gel mit den Proben beladen werden, welche nun zunächst ein Sammel- und danach ein Trenngel nach Laemmli durchliefen. Das Sammelgel dient dazu, dass die Proteine sich zunächst auf einer Höhe ansammeln und somit der Übergang ins Trenngel etwa gleichzeitig stattfindet.

Die Anlagerung des Natriumdodecylsulfates (SDS) an die Proteine gibt ihnen eine negative Ladung, weshalb sie während der Gelelektrophorese in Richtung der positiv geladenen Anode wandern. Durch das Erhitzen liegen die Proteine im denaturierten Zustand und somit in linearer Struktur vor, was ihre Auftrennung der Größe nach ermöglicht. Diese Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe erfolgte in 1 x Laemmli-Laufpuffer bei 25 mA pro Gel für ca. 1 h 15 min, bzw. bis das Ende des Gels nahezu erreicht war.

### **3.2.8 Western-Blot**

Nachdem die Proteine bei der SDS-PAGE innerhalb des Gels entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden, erfolgte nun der Transfer der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran per Western-Blot. Ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld führt dabei wiederum zur Wanderung der mit SDS-beladenen Proteine zur Anode und somit zur Übertragung der Proteine auf die anodenseitig platzierte Trägermembran. An der Membranoberfläche bleiben die Proteine schließlich aufgrund ionischer Wechselwirkungen haften. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Gesamtheit der membrangebundenen Proteine mittels des Farbstoffes Ponceau S sichtbar gemacht.

### **3.2.9 Detektion**

Die freien, unspezifischen Bindungsstellen auf der Trägermembran wurden für 30 min mit einer Blockierungslösung (1xTBST mit 5 % Magermilchpulver) blockiert, um die unspezifische Haftung zu vermeiden. Nun erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden fünf Waschschriffe à 5 min mit 1xTBST durchgeführt und anschließend 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit der Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt, welche die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte, lumineszierende Form katalysiert. Diese Lumineszenz kann detektiert werden. Nach der

Inkubationszeit folgten erneut fünf Waschschr tte mit 1xTBST zu je 5 min. Nun wurde die Membran abgetrocknet und mit 1 ml Thermo-ECL (Mischung aus SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate und SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate im Verhältnis 1:1, Thermo Fisher Scientific (USA)) für 4 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut sorgfältig abgetrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt und in einer Röntgenkassette befestigt. Nun konnte ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und durch die Lumineszenz, abhängig von der Signalstärke, zwischen 1 s und 15 min belichtet werden.

### 3.3 Aktivitätsassay

#### 3.3.1 Photometrische TPP1-Aktivitätsbestimmung

Die TPP1-Aktivitätsbestimmung erfolgte für jedes der Lysate in Triplets. Hierfür wurde das jeweilige Zelllysate zunächst in einem Verhältnis von 1:10 mit einem Natriumacetatpuffer (50 mM NaAc pH 4,7, 100 mM NaCl) verdünnt. Pro Triplikate-Ansatz wurden 10 µl des verd nnnten Lysates und 20 µl der AAF-AMC-Substratlösung) zugefügt, sodass eine finale Konzentration von 0,25 mM AAF-AMC enthalten war. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht für ca. 18 h.

Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200 µl 0,5 M EDTA (pH 12) abgestoppt. Anschließend wurden je 180 µl entnommen und in eine schwarze 96-well Platte (OptiPlate™-96-F) pipettiert, in welcher die Messung mittels iTECAN-Reader mit folgenden Einstellungen erfolgte:

Mode	Fluorescence Top Reading
Multiple Reads per Well (Square (filled))	4 x 4
Multiple Reads per Well (Border)	500 µm
Excitation Wavelength	355 nm
Emission Wavelength	460 nm
Excitation Bandwidth	9 nm
Emission Bandwidth	20 nm
Gain	optimal
Number of Flashes	50
Integration Time	20 µs

Die Werte aus den Triplikaten wurden bei der Auswertung gemittelt.

### **3.4 Statistik**

Sofern nicht anders erwähnt, wurde die Versuche mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Statistische Analysen zwischen untersuchten Gruppen wurden mittels zweiseitigem ANOVA und Bonferroni Posttest unter Verwendung der GraphPad Prism Software (Version 5, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Werte von  $p < 0.05$  werden als signifikant (\*) bezeichnet. Werte von  $p < 0.01$  (\*\*) als sehr signifikant und werden von  $p < 0.001$  als extrem signifikant (\*\*\*) bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klonierung von Arg127\*, Arg208\*, Ile287Asn und WT-TPP1 in das Plasmid pcDNA3

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Behandlung mit verschiedenen Readthrough-Substanzen auf transfizierten Zellen untersucht, die das humane TPP1-Enzym mit Punktmutationen exprimierten, welche auch bei an CLN2 erkrankten Patienten vorkommen.

Zunächst mussten die entsprechenden Mutationen von TPP1 als DNA-Konstrukte generiert werden. Der Einbau der Punktmutationen erfolgte durch PCR mit Phu-Turbo-Polymerase und anschließendem DpnI-Verdau. Mit der auf diese Weise gewonnenen Plasmid-DNA wurden *E. coli* (Xl1-blue) transformiert und die erfolgreiche Mutagenese anhand von Sequenzierungsergebnissen bestätigt (Abbildung 4-1 - Abbildung 4-3).

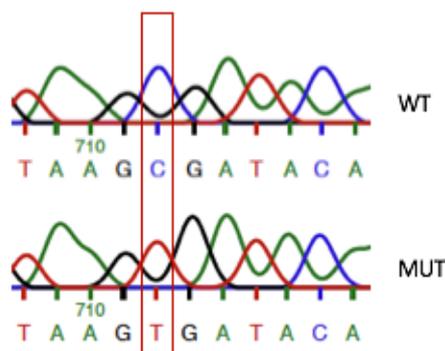


Abbildung 4-1 DNA-Sequenzen von TPP1-WT im Vergleich zu TPP1-Arg127\*

In den Sequenzen ist die Punktmutation von TPP1-Arg127\* (TGA statt CGA) im Vergleich zum Wildtyp (WT) zu sehen. Die Sequenz zeigt den kodierenden Strang.

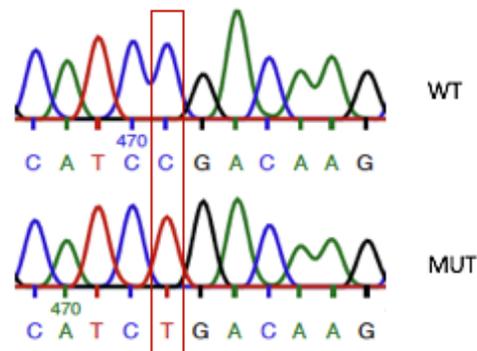


Abbildung 4-2 DNA-Sequenzen von TPP1-WT im Vergleich zu TPP1-Arg208\*

In den Sequenzen ist die Punktmutation von TPP1-Arg208\* (TGA statt CGA) im Vergleich zum Wildtyp zu sehen. Die Sequenz zeigt den kodierenden Strang.

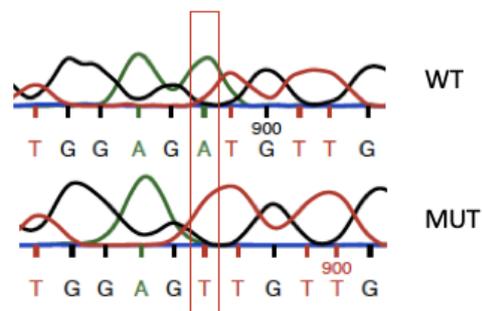


Abbildung 4-3 DNA-Sequenzen von TPP1-WT im Vergleich zu TPP1-Ile287Asn

In den Sequenzen ist die Punktmutation von TPP1-Ile287Asn (Codon AAC statt ATC) im Vergleich zum Wildtyp zu sehen. Die Sequenz zeigt den kodogenen Strang.

#### 4.2 Transfektion von HEK293T-Zellen mit den jeweiligen Konstrukten (WT-TPP1, Arg127\*, Arg208\*, Ile287Asn)

Mit den entsprechenden Konstrukten wurden HEK293T-Zellen transfiziert, sodass sie anschließend eine Nonsense-Mutation (Arg127\* und Arg208\*) oder eine Missense-Mutation (Ile287Asn) von TPP1 exprimierten. Die Behandlung mit den Readthrough Substanzen fand zeitgleich mit der Aussaat der transfizierten Zellen auf 6-Well-Platten statt, wobei das Nährmedium mit der jeweiligen Readthrough-Substanz versetzt wurde. Amlexanox wurde in einer Endkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Behandlung mit Gentamicin erfolgte in einer Endkonzentration von 250  $\mu\text{g/ml}$  und mit PTC124 in einer Konzentration von 17  $\mu\text{M}$ . Zunächst wurden die Zellen jeweils für 48 h

behandelt. In späteren Versuchsreihen wurde die Behandlungsdauer auf fünf bzw. sieben Tage gesteigert. Dabei wurden die Zellen so gesplittet, dass sie am Tag der Ernte konfluent waren. Sowohl beim Splitten der Zellen, als auch beim Wechsel des Mediums, wurde das frische Nährmedium mit der jeweiligen Substanz in der oben genannten Endkonzentration versetzt. Nach der Behandlung mit der jeweiligen Readthrough-Substanz folgten die Herstellung von Lysaten und die Auftrennung der enthaltenen Proteine mittels SDS-Page. Das Expressionlevel von TPP1 mit und ohne Behandlung wurde mithilfe eines Western Blots nachgewiesen. Neben TPP1 wurde auch das Haushaltsgen GAPDH detektiert, welches als Ladekontrolle diente. Das unprozessierte TPP1, der Vorläufer, war bei einem Molekulargewicht von 67 kDa und das prozessierte TPP1 bei 46 kDa zu erwarten. Die Banden des zur Ladekontrolle verwendeten GAPDH waren bei 37 kDa zu finden.

In Abbildung 4-4 ist zunächst zu sehen, wie sich die einzelnen Mutationen im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen (n.t.) und zum WT im Western Blot darstellen. Das endogene TPP1 zeigt sich in den nicht-transfizierten Zellen als schwaches Signal bei 45 kDa. Durch die in den Mutanten Arg127\* und Arg208\* exprimierte TPP1-Stop-Mutation entsteht weder in Höhe des Vorläufers, noch in Höhe des prozessierten TPP1 ein stärkeres Signal, als in den nicht transfizierten Zellen. Wie zu erwarten, wird in den Zellen, welche eine Nonsense-Mutation exprimieren, kaum TPP1 exprimiert. Bei dem Missense-Mutanten Ile287Asn hingegen entsteht eine Bande kurz unterhalb von 67 kDa. Es handelt sich um TPP1, welches aufgrund der Missense-Mutation fehlstrukturiert ist und nicht prozessiert, sondern vermutlich wieder abgebaut wird. Der WT zeigt im Vergleich ein sehr starkes Signal in Höhe des prozessierten TPP1 und eine etwas schwächere Bande bei 67 kDa, welche dem Vorläufer entspricht.

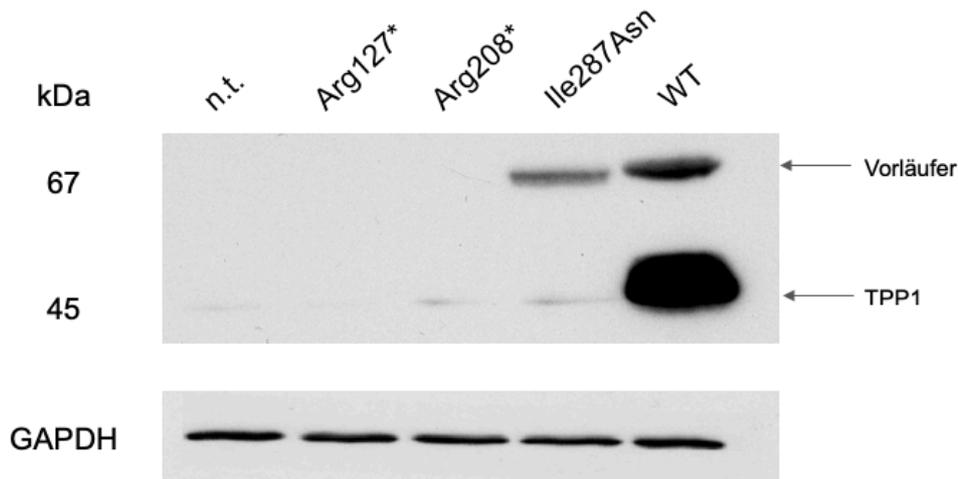


Abbildung 4-4 Western-Blot von n.t., den Mutanten Arg127\*, Arg208\* und Ile287Asn, sowie des WT nach 72 h ohne Behandlung

Die Zelllysate wurden 72 h nach der Transfektion hergestellt. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 100 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

### 4.3 Behandlungen mit Readthrough-Substanzen (Amlexanox, PTC124 und Gentamicin)

#### 4.3.1 48 h Behandlung der transfizierten HEK293T-Zellen mit Amlexanox

Zunächst wurden die HEK-Zellen für 48 h mit Amlexanox in einer Konzentration von 25 µM behandelt und untersucht, ob dies einen Effekt auf die TPP1-Synthese in den Zellen mit TPP1-Nonsense-Mutationen hat. Die Abbildung 4-5 und die Abbildung 4-6 zeigen jeweils den Western Blot einer unbehandelten HEK-Probe und den der 48 h mit Amlexanox behandelten Vergleichsprobe. Die TPP1-Banden der mit Amlexanox behandelten Zellen sind nicht wesentlich stärker, als die der entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppen. Insbesondere bei Arg127\* und Arg208\* ist kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festzustellen.

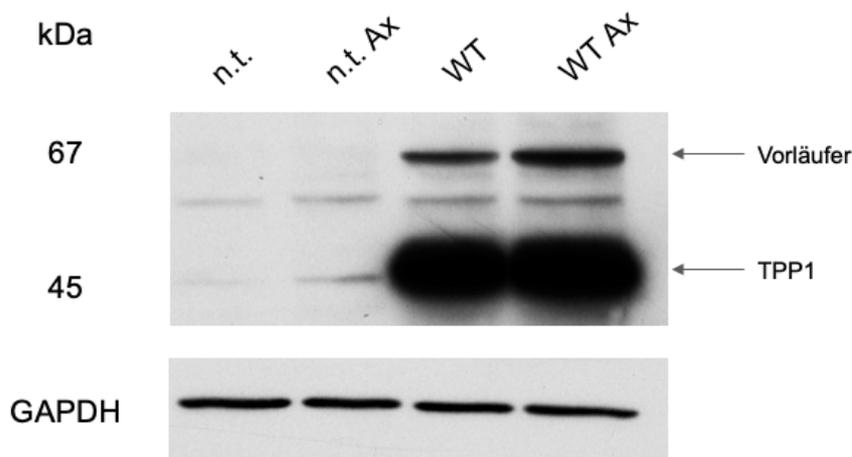


Abbildung 4-5 Western Blot von n.t. und WT jeweils ohne Behandlung und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax)

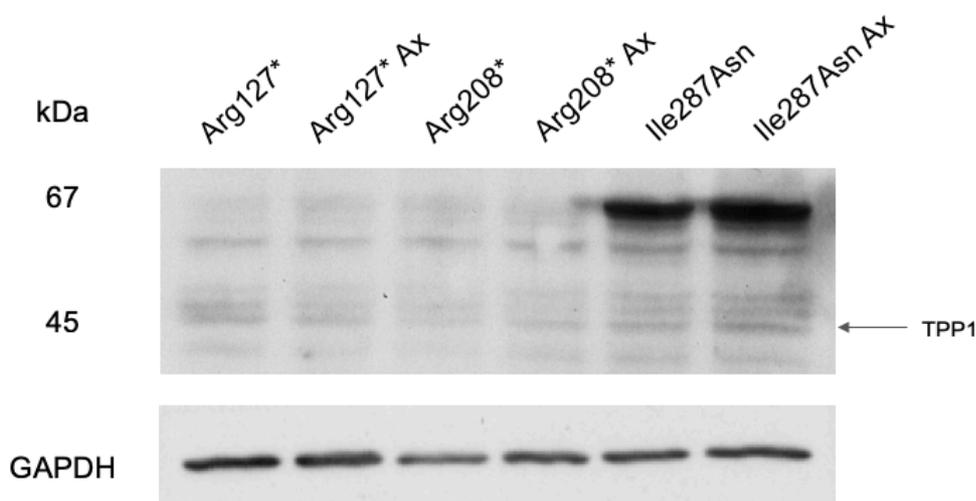


Abbildung 4-6 Western Blot von den Mutanten Arg127\*, Arg208\* und Ile287Asn jeweils ohne Behandlung und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax)

Die Zellysate wurden 72 h nach der Transfektion hergestellt, wovon 48 h mit Amlexanox behandelt wurde. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 100  $\mu$ g Gesamtprotein verwendet. TPP1 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Bei den Ile287Asn-Gruppen befinden sich Banden kurz unterhalb von 67 kDa. Es handelt es sich um fehlstrukturiertes TPP1.

Des Weiteren wurden fluorometrische Enzymaktivitätsmessungen vorgenommen. Aufgrund der höheren Sensitivität des Aktivitätsassays im Vergleich zum Western Blot bestand die Möglichkeit, dass, obwohl keine größere Menge an TPP1 im Western Blot nachzuweisen war, eine erhöhte Aktivität zu messen sein könnte.

In Abbildung 4-7 ist zu sehen, dass ein geringfügiger Anstieg der TPP1-Aktivität bei den behandelten Gruppen der Stop-Mutanten Arg127\* und Arg208\* zu verzeichnen ist. Der Anstieg von nur ca. 1 % der TPP1-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp ist jedoch geringer,

als die zugehörigen Fehlerbalken und daher nicht signifikant. Die TPP1-Aktivität der Wildtypen hat nach einer 48-stündigen Behandlung mit 25  $\mu$ M Amlexanox signifikant um ca. 30 % abgenommen.

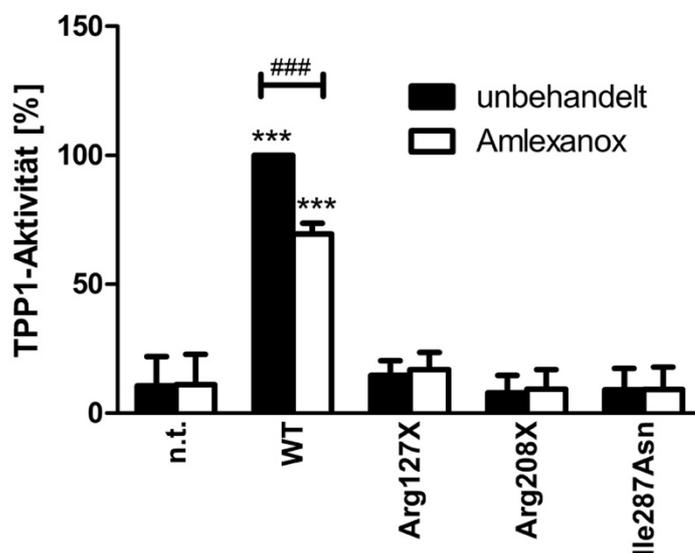


Abbildung 4-7 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEK293T-Zellen (Amlexanox, 48 h)

Mit den Lysaten wurde ein fluorimetrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es wurde eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C verwendet. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h.

#### 4.3.2 48 h Behandlung der transfizierten HEK293T-Zellen mit PTC124 (Ataluren) und Gentamicin

Zusätzlich zur Untersuchung der Auswirkung von Amlexanox auf die Expression von TPP1 in den transfizierten Zellen wurde auch die Wirkung von PTC124 und Gentamicin untersucht. Beide Wirkstoffe sind, ebenso wie Amlexanox, Substanzen, die zu einem Durchlesen von vorzeitigen Stop-Codons führen. Die HEK-Zellen wurden wiederum mit den jeweiligen Plasmid-Konstrukten transfiziert und anschließend für 48 h mit Gentamicin oder PTC124 behandelt. Bei sämtlichen Behandlungen wurde in einer Konzentration von 250  $\mu$ g/ml Gentamicin und 17  $\mu$ M PTC124 verwendet. Die in den Lysaten enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Page aufgetrennt. Daraufhin wurden TPP1 und GAPDH (als Ladekontrolle) detektiert.

In Abbildung 4-8 und in Abbildung 4-9 ist zu erkennen, dass weder bei der zweitägigen Behandlung mit PTC124, noch mit Gentamicin ein Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe ausgemacht werden konnte. Bei der schwachen Bande im Bereich von 45 kDa handelt es sich um endogenes TPP1.

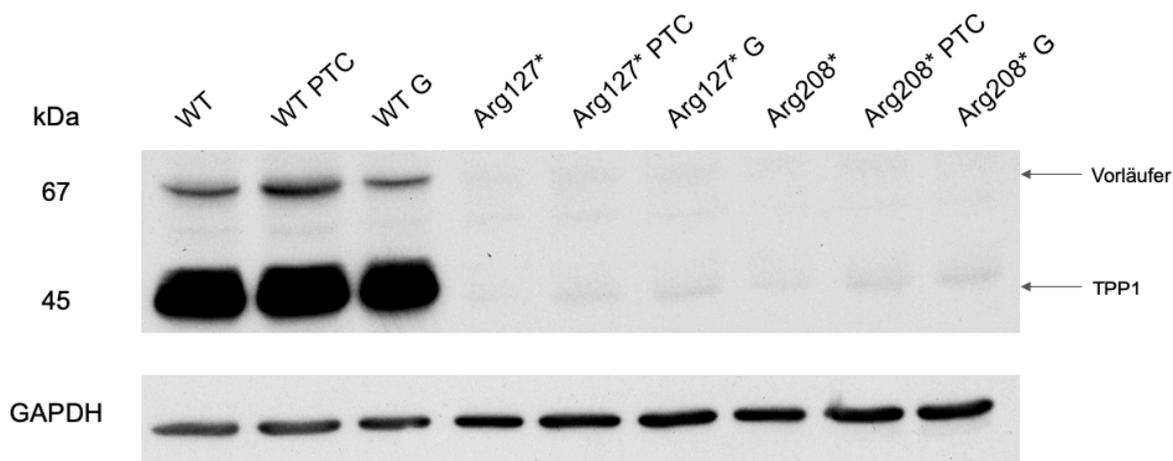


Abbildung 4-8 Western Blot von WT, den Mutanten Arg127\* und Arg208\*

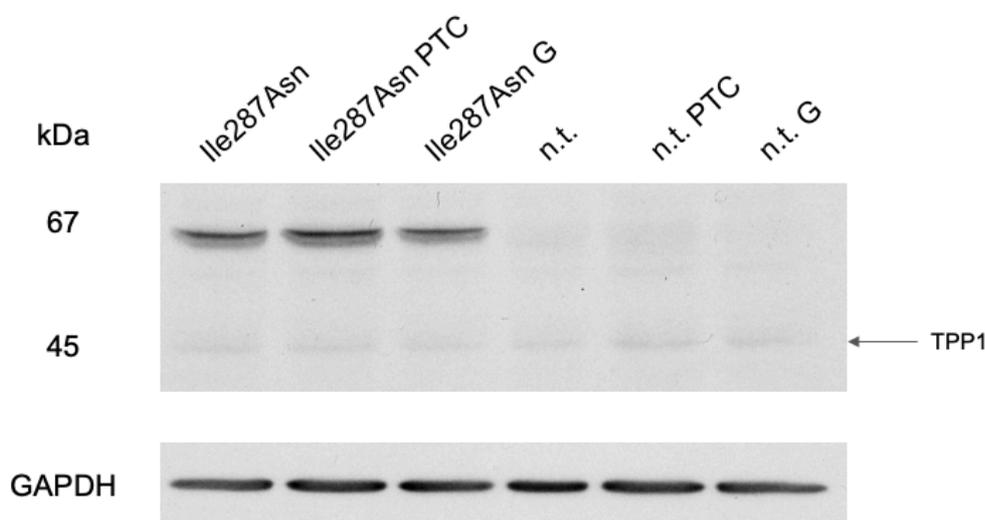


Abbildung 4-9 Western Blot des Mutanten Ile287Asn und der nicht-transfizierten Kontrollgruppe

Die Zelllysate wurden 72 h nach der Transfektion hergestellt, wovon 48 h mit PTC124 bzw. mit Gentamicin behandelt wurde. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 100 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Bei den Ile287Asn-Gruppen befinden sich Banden kurz unterhalb von 67 kDa, welche dem Vorläufer entspricht.

Neben dem Proteinnachweis mittels Western Blot erfolgte ebenfalls eine Enzymaktivitätsmessung mittels fluorometrischem Aktivitätsassay. Allerdings konnte weder mit PTC124 noch mit Gentamicin ein deutlicher Anstieg der TPP1-Aktivität in den transfizierten Zellen mit TPP1-Mutationen erzielt werden, wie Abbildung 4-10 zeigt. Zwar zeigen die mit PTC124 behandelten Zellen mit der Arg127\* Mutation eine erhöhte TPP1-Aktivität, welche über den Fehlerbalken hinausgeht. Dieser Anstieg ist vergleichbar mit der erhöhten Aktivität, welche auch bei den behandelten nicht-transfizierten Zellen und

den Wildtypen zu verzeichnen ist. Hieraus lässt sich schließen, dass die vermehrte TPP1-Aktivität nicht auf einen erhöhten Readthrough zurückzuführen ist.

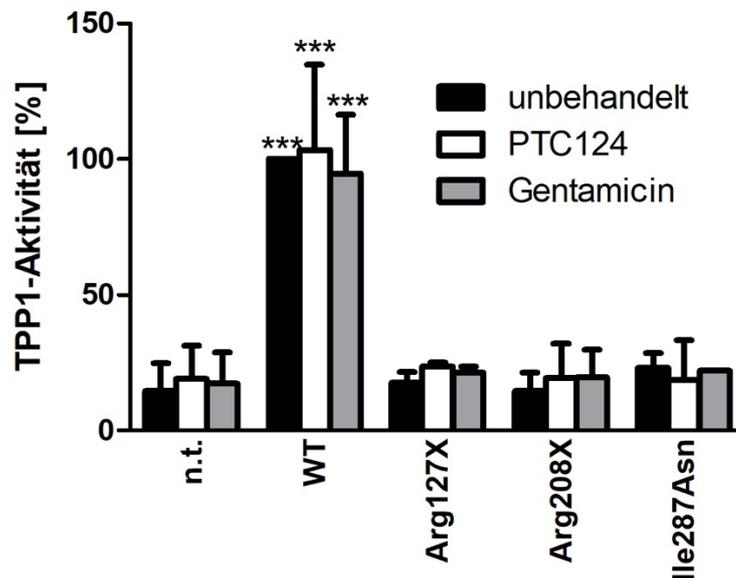


Abbildung 4-10 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (PTC124 bzw. Gentamicin, 48 h)

Mit den Lysaten wurde ein fluorometrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es herrschte eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h.

#### 4.3.3 48 h Behandlung der Patientenfibroblasten mit Amlexanox

Neben den Versuchsreihen mit den HEK293T wurde auch die Wirkung von Amlexanox auf Patientenfibroblasten untersucht. Es wurden sowohl Patientenfibroblasten verwendet, deren TPP1-Gen homozygot die Missense-Mutation Ile287Asn enthielt, als auch Fibroblasten eines Patienten, die heterozygot die beiden Stop-Mutationen Arg127\* und Arg208\* exprimierten. Als Kontrollgruppe wurden TPP1-Wildtyp-Fibroblasten verwendet. Zunächst wurde auch hierbei der Einfluss einer 48-stündigen Behandlung der Zellen mit Amlexanox in einer Konzentration von 25 µM ermittelt. In Abbildung 4-11 ist der Western Blot der behandelten Zellen und der unbehandelten Kontrollgruppen zu sehen. Es konnte kein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden.

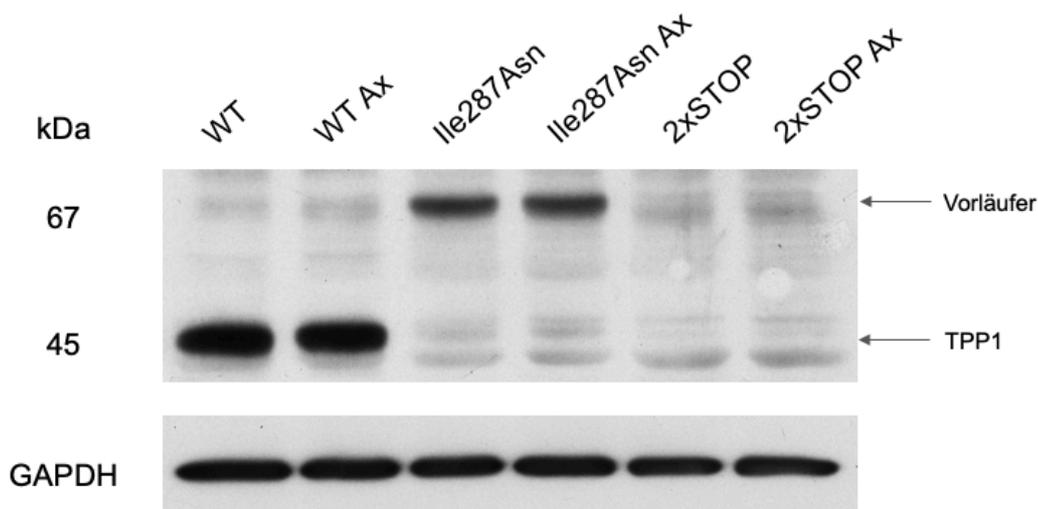


Abbildung 4-11: Western-Blot von WT, Ile287Asn und Fibroblasten mit doppelter Stop-Mutation (Arg127\* und Arg208\*) unbehandelt und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax)

Die Zellysate wurden 72 h nach der Transfektion hergestellt. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 55 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Bei den Ile287Asn-Gruppen befinden sich Banden kurz unterhalb von 67 kDa.

Das TPP1-Aktivitätsassay der Fibroblasten bestätigte das Ergebnis des Western Blots. Weder die Fibroblasten mit der Missense-Mutation (Ile287Asn), noch diejenigen mit den zwei Nonsense-Mutationen (Arg127\* und Arg208\*, 2xSTOP) zeigten einen Anstieg der TPP1-Aktivität durch die 48-stündige Behandlung mit Amlexanox, wie in Abbildung 4-12 zu erkennen ist.

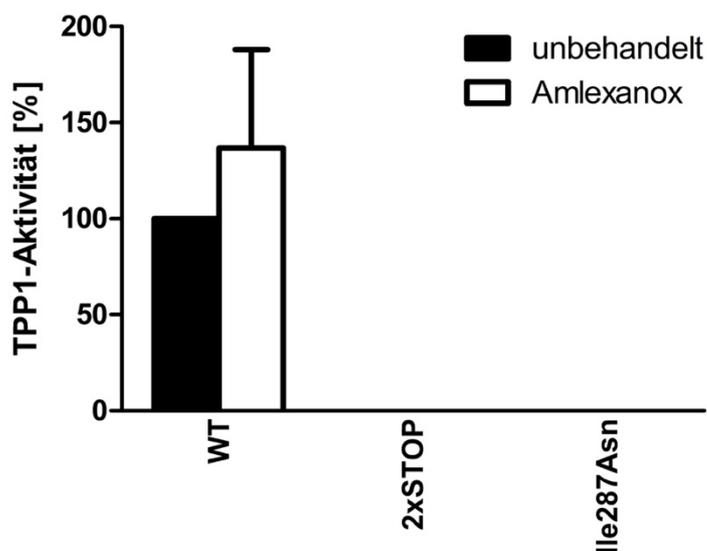


Abbildung 4-12 TPP1-Aktivitätsassay von WT, Ile287Asn und Fibroblasten mit doppelter Stop-Mutation (Arg127\* und Arg208\*) behandelt und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax)

Mit den Lysaten wurde ein fluorimetrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es herrschte eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h.

Neben den Western Blots und den Aktivitätsassays wurde aus den Fibroblasten mRNA isoliert und qPCRs durchgeführt. Somit konnte die Wirkung der Substanzen nicht nur auf Proteinebene, sondern auch auf der Transkriptionsebene untersucht werden. Die mRNA-Isolation und die reverse Transkription gestalteten sich aufgrund des geringen Wachstums der Fibroblasten als sehr schwierig. Daher war die Durchführung dieses Versuchsteils nur zwei Mal unabhängig voneinander möglich. Die nachfolgenden Erkenntnisse sind aus diesem Grund unter Vorbehalt zu betrachten.

Wie in Abbildung 4-13 zu erkennen ist, enthalten die Fibroblasten, welche heterozygot zwei Nonsense-Mutationen exprimieren, kaum TPP1-mRNA. Die Behandlung mit Amlexanox führte in diesen Zellen zu keiner vermehrten mRNA Produktion. Das TPP1-mRNA-Level in den Fibroblasten, welche die Missense-Mutation Ile287Asn exprimieren, entspricht in etwa dem mRNA-Level der Wildtypen. Der Anstieg der mRNA in den behandelten Zellen mit der Missense-Mutation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ist eher auf die hohe Standardabweichung (s. Fehlerbalken), als auf eine tatsächliche Einflussnahme durch die Amlexanox-Behandlung zurückzuführen.

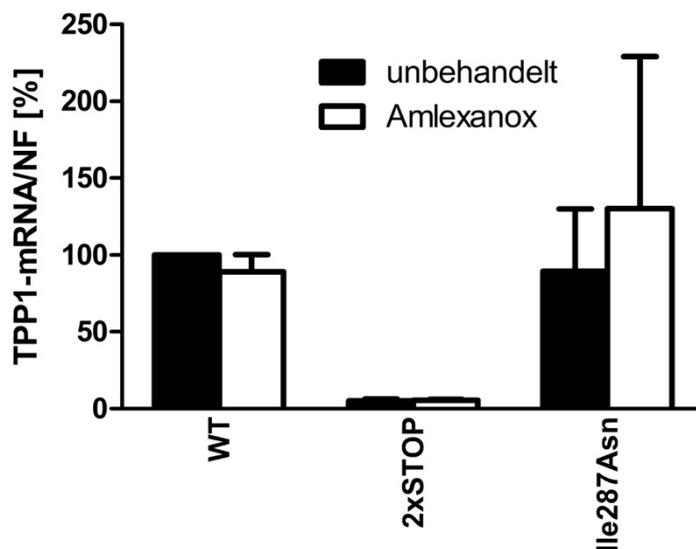


Abbildung 4-13 TPP1-mRNA/NF von WT, 2xSTOP und Ile287Asn

Die 48 h mit Amlexanox behandelten Zellen wurden in 1 ml Trizol geerntet. Es fanden eine mRNA-Isolation, ein DNase-Verdau und eine reverse Transkription statt, woraufhin die qPCR durchgeführt wurde. Es wurde auf die Haushaltsgene rpl-13, B2M und Ywhaz normalisiert.

#### 4.4 Behandlung für fünf bzw. sieben Tage

Nachdem bei einer Behandlungsdauer von 48 h mit keiner der drei Substanzen ein Effekt nachzuweisen war, wurde der Behandlungszeitraum auf fünf bzw. sieben Tage bei identischer Wirkstoffkonzentration ausgeweitet. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob eine längere Wirkdauer notwendig ist, um einen Effekt zu erzielen. Die bisherigen Experimente wurden mit HEK-Zellen durchgeführt, die das endogene TPP1-Protein exprimierten. Für die weiteren Versuche standen jedoch TPP1-Knockout HEKs zu Verfügung, welche eine in-frame Deletion des TPP1-Gens exprimierten. Aufgrund dieser Mutation zeigt sich in den Western Blots zwar eine schwache Bande bei 45 kDa, aber nur eine geringe Enzymaktivität von unter 4 % der Aktivität des WT.

##### 4.4.1 Zeitreihe transient transfizierter HEKs mit Amlexanox

Wie in Abbildung 4-14 und Abbildung 4-15 zu erkennen ist, konnte nach fünf- bzw. siebentägiger Behandlung mit Amlexanox kein Unterschied zwischen den behandelten Zellen und den unbehandelten Kontrollgruppen im Western Blot verzeichnet werden.

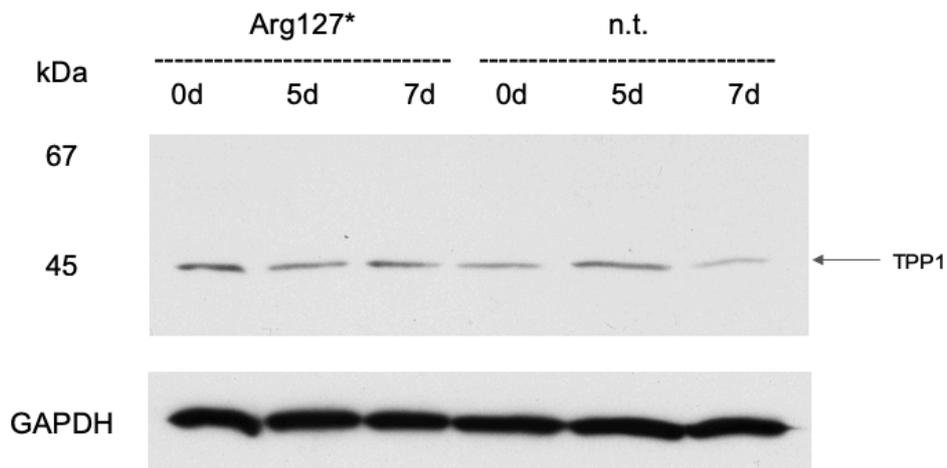


Abbildung 4-14 Western Blot von Arg127\* und n.t. jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Amlexanox

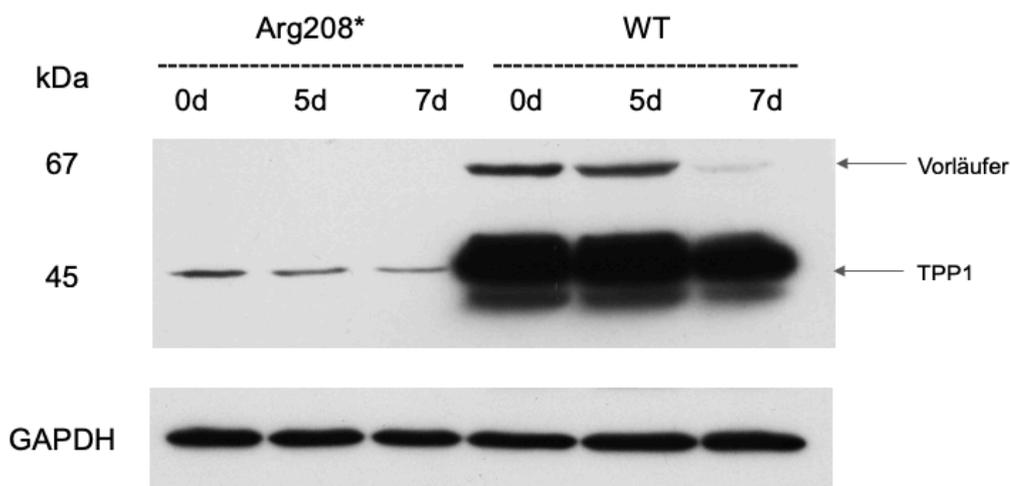


Abbildung 4-15 Western Blot von Arg208\* und WT jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Amlexanox

Die Zellen wurden nach fünf Tagen (0 d und 5 d) bzw. sieben Tagen (7 d) geerntet. Zwischenzeitlich fand ein Splitten der Zellen statt, sodass sie zum Zeitpunkt der Ernte annähernd konfluent waren. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 100 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Aktivitätsassays konnten auch bei dieser Versuchsreihe die Ergebnisse aus den Western Blots bestätigen: Wie in Abbildung 4-16 zu sehen ist, war kein Anstieg der Enzymaktivität von TPP1 bei einer Behandlung von fünf bzw. sieben Tagen mit Amlexanox zu verzeichnen. Im Gegenteil, die behandelten Zellen zeigten sogar eine Tendenz zur niedrigeren Enzymaktivität.

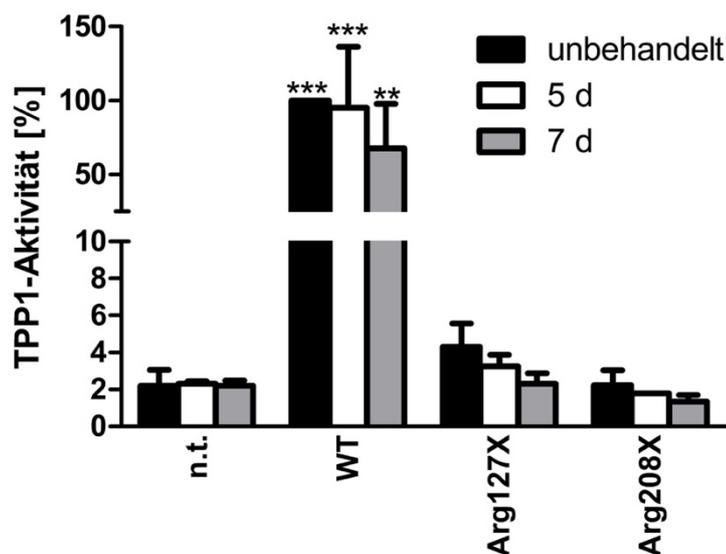


Abbildung 4-16 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (Zeitreihe Amlexanox)

Mit den Lysaten wurde ein fluorimetrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es herrschte eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h.

#### 4.4.2 Zeitreihe transient transfizierter HEKs mit PTC124

Mit PTC124 wurde ebenfalls eine Zeitreihe (0 d, 5 d und 7 d) durchgeführt, um die Auswirkung der Behandlungsdauer auf das Ergebnis zu untersuchen. Auch hierbei wurden die TPP1-KO-HEKs mit der TPP1 in-frame Deletion verwendet. Wie in Abbildung 4-17 und in Abbildung 4-18 zu sehen ist, konnte auch hierbei anhand der Western Blots kein Anstieg des TPP1-Expressionslevels festgestellt werden. Stattdessen ist eine mäßige Abnahme des TPP1 in den sieben Tage behandelten Zellen im Vergleich zu den fünf Tage behandelten Zellen bei dem Wildtyp-TPP1 zu erkennen.

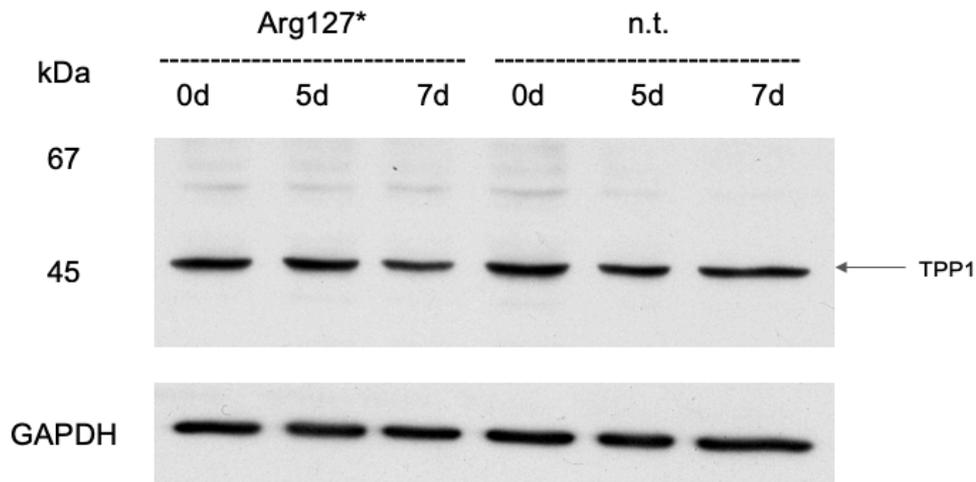


Abbildung 4-17 Western Blot von Arg127\* und n.t. jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit PTC124

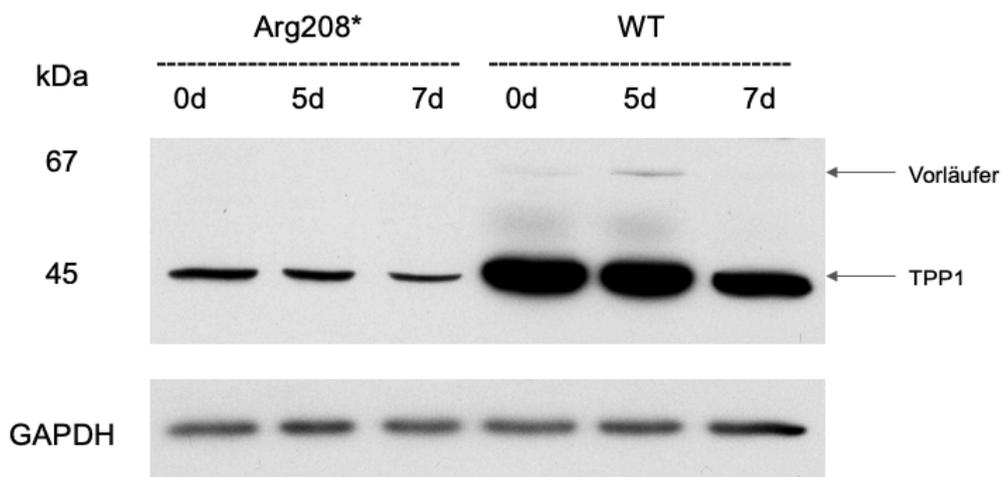


Abbildung 4-18: Western Blot von Arg208\* und WT jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit PTC124

Die Zellen wurden nach fünf Tagen (0 d und 5 d) bzw. sieben Tagen (7 d) geerntet. Zwischenzeitlich fand ein Splitten der Zellen statt, sodass sie zum Zeitpunkt der Ernte annähernd konfluent waren. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 100 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Wiederum konnte das Aktivitätsassay, wie in Abbildung 4-19 zu sehen ist, die Erkenntnisse aus dem Western Blot für die nicht-transfizierten Zellen, die Wildtypen und die Zellen mit der Mutation Arg127\* bestätigen: Die Behandlung mit PTC124 für fünf (5 d) bzw. sieben Tage (7 d) führte zu einer mäßigen Abnahme der TPP1 Aktivität in den transfizierten HEKs. Da es sich bei der Zeitreihe mit PTC124 um einen Kontrollversuch handelt, ist dieser nur ein Mal durchgeführt worden.

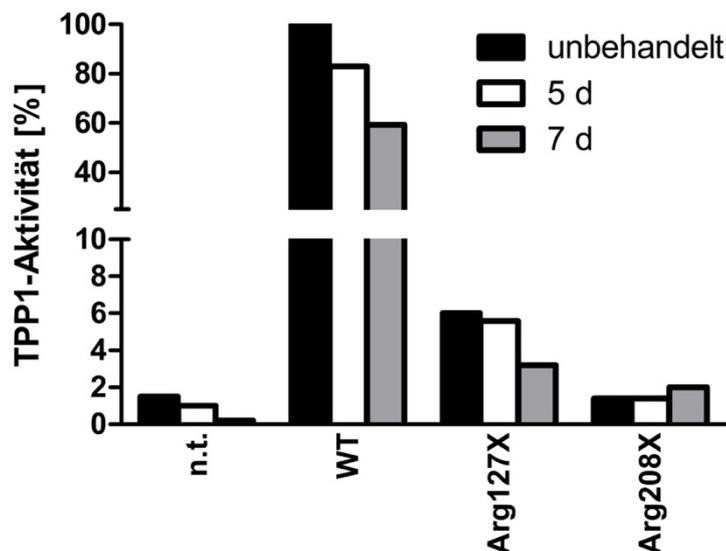


Abbildung 4-19 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (Zeitreihe PTC124)

Mit den Lysaten wurde ein fluorometrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es herrschte eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h. Diese Zeitreihe wurde nur ein Mal durchgeführt.

#### 4.4.3 Zeitreihe transient transfizierter HEKs mit Gentamicin

Auch mit Gentamicin wurde eine Zeitreihe durchgeführt, um das Resultat bei einem Behandlungszeitraum von fünf bzw. sieben Tagen zu untersuchen und mit den Ergebnissen einer ebenso langen Behandlung mit Amlexanox vergleichen zu können. Wie der Abbildung 4-20 zu entnehmen ist, konnte bei den STOP-Mutanten kein Unterschied zwischen fünf- bzw. siebentägig behandelten Kolonien und der unbehandelten Kontrollgruppe in den Western Blots festgestellt werden. In Abbildung 4-20 ist zu sehen, dass bei den nicht-transfizierten Zellen und bei den Wildtypen die Bande bei der für fünf Tage behandelten Zellen etwas stärker ist, als die der nicht behandelten und der sieben Tage behandelten Zellen.

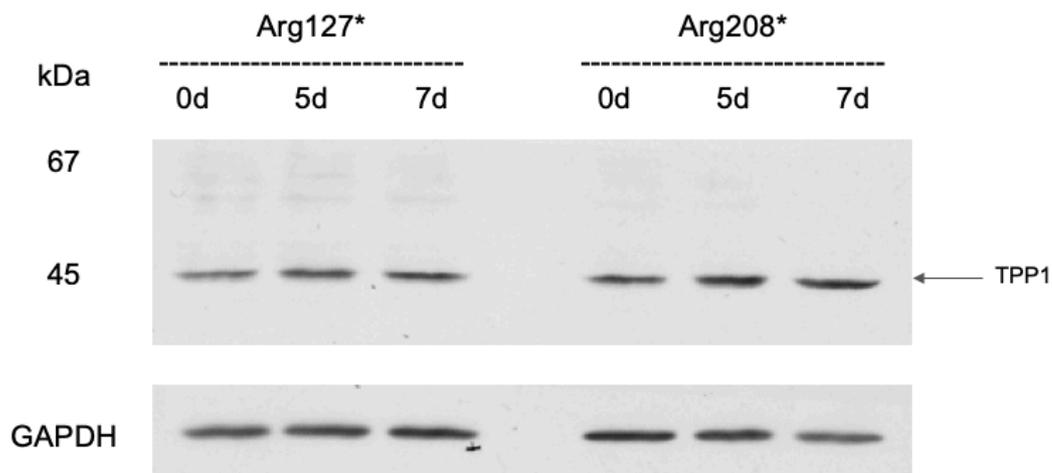


Abbildung 4-20 Western Blot von Arg127\* und Arg208\* jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Gentamicin

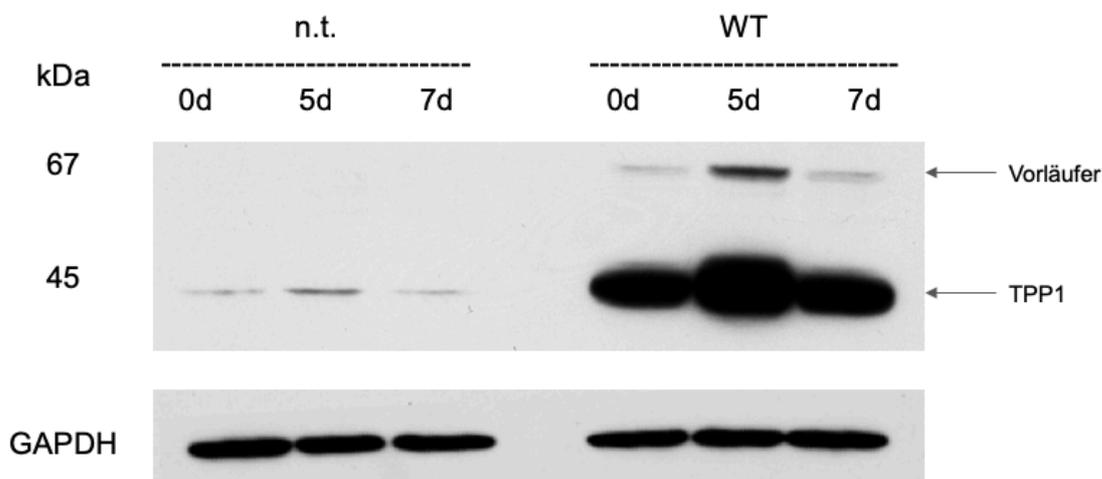


Abbildung 4-21: Western Blot von n.t. und WT jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Gentamicin

Die Zellen wurden nach fünf Tagen (0 d und 5 d) bzw. sieben Tagen (7 d) geerntet. Zwischenzeitlich fand ein Splitten der Zellen statt, sodass sie zum Zeitpunkt der Ernte annähernd konfluent waren. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 100 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Ergebnisse des TPP1-Aktivitätsassays zeigten wie in Abbildung 4-22 zu sehen ein anderes Bild, als die Western Blots. Bei den Wildtypen konnte analog zum Anstieg der TPP1-Proteinmenge auch ein Anstieg der TPP1-Aktivität um ca. 15 % in den fünf Tage mit Gentamicin behandelten Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz zu der unveränderten TPP1-Proteinmenge in den Western-Blots zeigen die fünf Tage behandelten Gruppen der beiden Stop-Mutanten Arg127\* und Arg208\* einen geringen Anstieg der TPP1 Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch die Zeitreihe

mit Gentamicin ist nur ein Mal durchgeführt worden, weshalb die Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten sind.

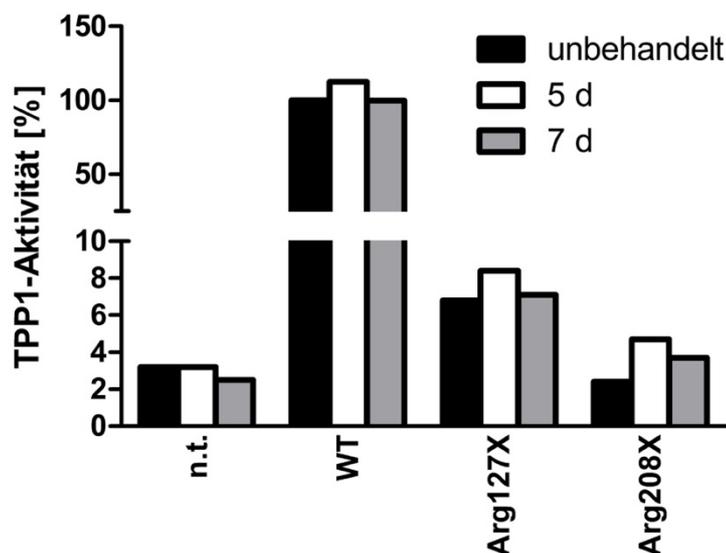


Abbildung 4-22 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (Zeitreihe Gentamicin)

Mit den Lysaten wurde ein fluorometrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es herrschte eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h. Diese Zeitreihe wurde nur ein Mal durchgeführt.

#### 4.4.4 Zeitreihe Fibroblasten mit Amlexanox

Auch bei den Versuchen mit den Patientenfibroblasten wurde der Behandlungszeitraum mit Amlexanox auf fünf bzw. sieben Tage ausgeweitet. Die Abbildung 4-23 zeigt, dass die fünf- bzw. siebentägige Behandlung der Fibroblasten mit Amlexanox zu keinem Anstieg der Menge an TPP1 in den Zellen mit doppelter Stop-Mutation führte. Die TPP1-Banden der Wildtyp-Fibroblasten nehmen jedoch scheinbar zu, je länger mit Amlexanox behandelt wurde.

In Abbildung 4-24 ist zu sehen, dass die fünf- bzw. siebentägige Behandlung mit Amlexanox ebenfalls keinen steigernden Einfluss auf die TPP1-Enzymaktivität in den Stop-Mutanten hat. Bei den Wildtyp-Gruppen steigt, analog zu den Western Blots, die TPP1-Aktivität mit der Dauer der Behandlung an.

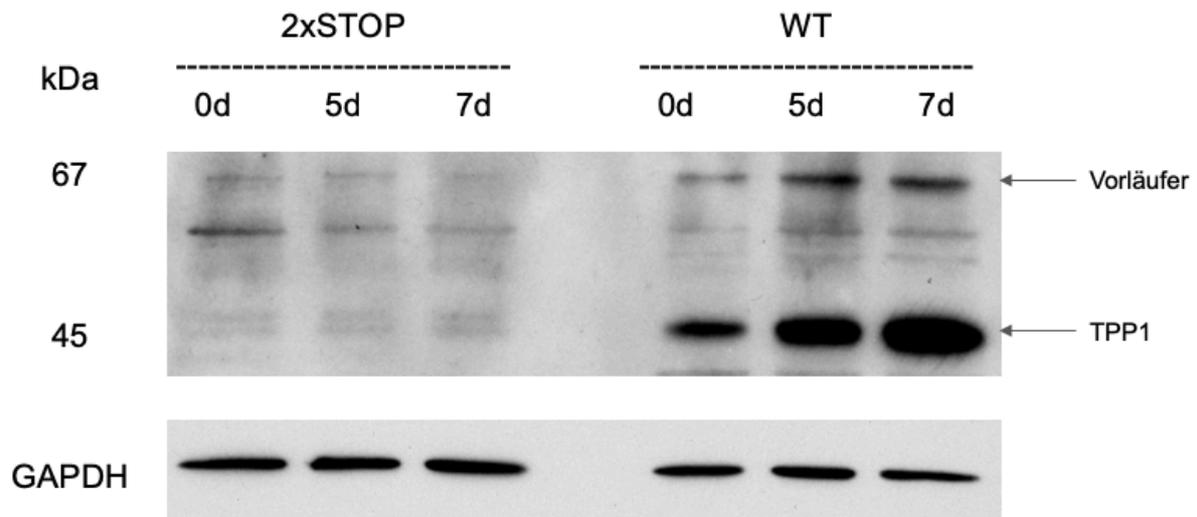


Abbildung 4-23 Western Blot von Fibroblasten mit doppelter TPP1-Stopmutation (Arg127\* und Arg208\*) und WT unbehandelt (0), fünf Tage (5 d) und sieben Tage (7 d) mit Amlexanox behandelt

Die Zelllysate wurden nach fünftägiger (5 d) bzw. nach siebentägiger (7 d) Behandlung geerntet. Die Ernte der unbehandelten Zellen (0) erfolgte zeitgleich mit den fünftägig behandelten Zellen. Zwischenzeitlich fand ein Splitten der Zellen statt, sodass sie zum Zeitpunkt der Ernte annähernd konfluent waren. Für die SDS-Page und die anschließende Immundetektion wurden 55 µg Gesamtprotein verwendet. Der unprozessierte TPP1-Vorläufer und das prozessierte TPP1 sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

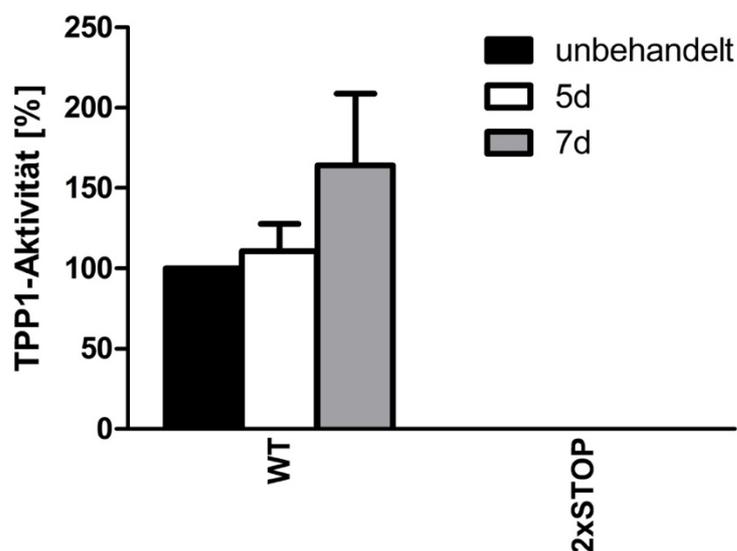


Abbildung 4-24: TPP1-Aktivitätsassay von WT und Fibroblasten mit doppelter Stop-Mutation (Arg127\* und Arg208\*) unbehandelt (0), fünf Tage (5 d) und sieben Tage (7 d) mit Amlexanox behandelt

Mit den Lysaten wurde ein fluorimetrisches Aktivitätsassay durchgeführt. Es herrschte eine Substratkonzentration von 0,25 mM AAF-AMC und eine Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeit betrug ca. 18 h.

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Behandlung mit Amlexanox in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  führte weder bei einer Behandlungsdauer von 48 h, noch bei einer Behandlungsdauer von fünf oder sieben Tagen zu einem signifikanten Effekt. Dies ließ sich sowohl bei den Versuchen mit transfizierten HEKs als auch mit Patienten-Fibroblasten, welche TPP1-Nonsense Mutationen exprimierten, feststellen. Weder auf Proteinebene, noch auf mRNA-Ebene konnte eine Steigerung des TPP1-Levels festgestellt werden. Dasselbe gilt für die Behandlung mit 250  $\mu\text{g/ml}$  Gentamicin und 17  $\mu\text{M}$  PTC124. Keine der Behandlungen mit den drei Readthrough-Substanzen Amlexanox, Gentamicin und PTC124 führte zu signifikanten Effekten.

## 5 Diskussion

Eine Mutation des TPP1-Gens führt zur Funktionsunfähigkeit der Tripeptidylpeptidase 1. Die Substrate, an deren Abbau das Enzym normalerweise beteiligt ist, reichern sich in den Lysosomen an und schädigen die Zelle. Das hieraus entstehende Krankheitsbild wird als neuronale Ceroidlipofuszinose 2 (CLN2, engl. classic late infantile ceroid lipofuscinosis, cLINCL) bezeichnet. Die Ceroidlipofuszinosen sind eine Gruppe lysosomaler Speichererkrankungen, deren gemeinsames Merkmal die intrazelluläre Ansammlung von autofluoreszierendem Speichermaterial ist. Klinische Symptome sind Krampfanfälle, zunehmender Verlust geistiger und motorischer Fähigkeiten sowie progressiver Visusverlust. Bei etwa einem Drittel der Genmutationen, welche der CLN2 zugrunde liegen, handelt es sich um Nonsense-Mutationen. Mit einem Anteil von ca. 28 % der mutierten Allele tritt die Nonsense-Mutation Arg208\* besonders häufig auf (Sleat, 1999). Aufgrund ihrer Häufigkeit ist diese Mutation von besonderer Bedeutung bei der Suche nach einer effizienten Behandlungsmethode für CLN2. Im Rahmen dieser Arbeit wurde primär die Wirkung einer Behandlung mit der Substanz Amlexanox auf Zellen untersucht, welche die TPP1-Nonsense-Mutationen Arg127\* bzw. Arg208\* exprimieren. Dabei wurden sowohl Zellen verwendet, welche zuvor mit einem TPP1-Konstrukt mit der entsprechenden Mutation transfiziert wurden, als auch Patientenzellen. Amlexanox ist von besonderem Interesse, da es nicht nur dazu in der Lage ist, den Readthrough vorzeitiger Stop-Codons zu induzieren, sondern zudem den Nonsense-vermittelten RNA-Abbau zu inhibieren. Amlexanox ist aufgrund seiner guten Bioverfügbarkeit zur oralen Einnahme geeignet und könnte eine kostengünstige sowie praktikable Therapieoption darstellen.

### 5.1 Die Rolle des Nonsense-vermittelten RNA-Abbaus

Der Nonsense-vermittelte RNA-Abbau (engl. nonsense-mediated decay, NMD) ist ein Kontrollmechanismus, welcher dem Erkennen von Nonsense-Mutationen enthaltender mRNA dient und diese einem schnellen Abbau zuführt (Silva & Romão, 2009). Auf diese Weise wird die Ansammlung von verkürzten, nicht funktionsfähigen Proteinen in der Zelle verhindert.

Ob ein Abbau der PTC-enthaltenden mRNA stattfindet oder nicht, kann einen starken Einfluss auf den klinischen Schweregrad einer Erkrankung haben. Im Falle der  $\beta$ -Thalassämie verändert das Stattfinden der NMD das Vererbungsmuster. PTCs im Bereich des 5'-Endes des  $\beta$ -Globin-Gens führen zur rezessiven Form der Erkrankung: PTCs in diesem Bereich werden durch die NMD erkannt und somit als NMD-kompetent bezeichnet. Die fehlerhafte mRNA wird abgebaut. Der heterozygote Träger des mutierten

Gens kann somit von der normalen Funktion seines Wildtyp-Allels profitieren und ist klinisch gesund (Miller & Pearce, 2014). Ein PTC im Bereich des 3'-Endes des kodierenden Bereichs hingegen ist nicht NMD-kompetent. Es wird nicht durch die NMD erkannt, wodurch die Translation des mutierten Gens erfolgt. Das verkürzte, toxische Protein reichert sich an und schädigt die Zelle, was zur autosomal-dominanten Form der  $\beta$ -Thalassämie führt (Khajavi et al., 2006). Bei der  $\beta$ -Thalassämie hat die NMD einen protektiven Effekt. Gegenteiliges trifft auf die Rolle der NMD bei der Duchenne Muskeldystrophie zu. Hierbei verändert das Stattfinden der NMD den klinischen Phänotyp: nicht-NMD-kompetente PTCs im Bereich des 3'-Endes des Dystrophin-Gens führen zu einer milden Form der Erkrankung. Demgegenüber führen PTCs im NMD-kompetenten Bereich des Gens zu einer schweren Erkrankungsform. Dies liegt darin begründet, dass das verkürzte Protein über eine Restfunktion verfügt. Kommt es aufgrund der NMD nicht zu einer Expression des verkürzten Proteins, kann der Patient nicht von dieser Restfunktion profitieren (Miller & Pearce, 2014).

Für Erkrankungen, bei denen das mutierte Protein über eine Restfunktion verfügt, stellen NMD-hemmende Medikamente eine mögliche Therapieoption dar. Der im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Substanz Amlexanox wurden sowohl NMD-hemmende Eigenschaften nachgewiesen, als auch die Fähigkeit, zu einem Readthrough vorzeitiger Stop-Codons zu führen (Gonzalez-Hilarion et al., 2012). Die Kombination beider Eigenschaften ist von besonderem Interesse für die Suche nach einer Therapiemethode, welche bei der Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden kann, denen eine Nonsense-Mutation zugrunde liegt. Der Einsatz eines Readthrough-Medikaments allein reicht häufig nicht für das Erreichen des therapeutischen Schwellenwerts aus. Es wird nicht genug funktionsfähiges Protein erzeugt, um eine positive Auswirkung auf den klinischen Phänotyp zu erreichen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die PTC-enhaltende mRNA durch NMD abgebaut wird, noch bevor sie Substrat für einen Readthrough werden kann. Durch das Verhindern der NMD bleibt mehr PTC-enhaltende mRNA für einen Readthrough, sodass die Menge an funktionsfähigem Protein voller Länge gesteigert werden kann (Miller & Pearce, 2014).

## **5.2 Amlexanox-Behandlung ohne Auswirkung auf TPP1-Expressionslevel**

Um die Auswirkung verschieden langer Behandlungszeiträume zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst für 48 Stunden, später für fünf oder sieben Tage mit 25  $\mu$ M Amlexanox behandelt. Weder die 48-stündige Behandlung mit Amlexanox, noch die Behandlung für fünf oder sieben Tage führte zu einem Anstieg des TPP1-Expressionslevels oder der

TPP1-Enzymaktivität in den Zellen mit den Nonsense-Mutationen Arg127\* und Arg208\*. In Abbildung 4-5 und in Abbildung 4-6 ist zu sehen, dass die TPP1-Banden der mit Amlexanox behandelten Zellen nicht stärker sind, als die der entsprechenden unbehandelten Kontrollgruppen. Ebenso wenig konnte ein Anstieg der TPP1-Enzymaktivität in den mit Amlexanox behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4-7).

Um in den Western Blots störende Banden von endogenem TPP1 zu vermeiden, sowie aussagekräftigere TPP1-Aktivitätsassays ohne Aktivität von endogenem TPP1 zu erhalten, wurden TPP1-Knockout-HEKs in der AG Tikkanen erstellt. In diesen Zellen ist das TPP1-Gen mit Genomeditierung deaktiviert, um ein zugängliches Zellkultur-Modellsystem für CLN2 zu generieren. Der bei den Versuchen verwendete TPP1-Knockout-Klon zeigte zwar keine TPP1-Aktivität, jedoch in den Western-Blots eine Bande bei 45 kDa, genau dort, wo die Bande von TPP1 zu erwarten ist. Der Grund hierfür ist, dass der Klon eine TPP1-in-frame Deletion von 3 bp aufweist, sodass das mutierte TPP1 nur um eine einzelne Aminosäure kürzer ist, als das nicht-mutierte TPP1. Für die Durchführung weiterer Untersuchungen ist es sinnvoll, einen TPP1-Knockout-Klon zu verwenden, der keine in-frame Deletion exprimiert, um irritierende Banden in den Western Blots zu vermeiden.

Obwohl die TPP1-Knockout-HEKs keine TPP1-Enzymaktivität aufweisen, zeigen die mit der Arg127\*-Mutante transfizierten Zellen, wie in Abbildung 4-16, in Abbildung 4-19 und in Abbildung 4-22 zu sehen ist, eine Aktivität von bis zu 7 % des Wildtyps. Dies ist wahrscheinlich auf das endogene (natürliche) Vorkommen eines Readthrough zurückzuführen. Der Vorgang der Termination ist generell hochgradig effizient (Manuvakhova et al., 2000). Die Nonsense-Mutation des Mutanten Arg127\* führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon der Sequenz UGA. Dieses Stop-Codon ist generell weniger effizient und somit anfälliger für einen endogenen Readthrough (Manuvakhova et al., 2000). Die stärkere TPP1-Aktivität in den Zellen mit der Mutation Arg127\* deutet darauf hin, dass das durch die Mutation entstandene Stop-Codon häufiger durchlesen wird, als jenes, welches durch die Mutation Arg208\* entsteht. Es handelt sich bei beiden Mutationen um ein vorzeitiges Stop-Codon der Sequenz UGA. Die beiden Stop-Codons unterscheiden sich in dem direkt auf die Stop-Sequenz folgenden Nukleotid. Bei Arg208\* handelt es sich um Cytosin, bei Arg127\* um Uracil. Den Erkenntnissen von Manuvakhova et al. nach, ist die Readthrough-Rate von UGAC 3- bis 6-Mal höher, als die Readthrough-Rate von UGA in Kombination mit einer der drei anderen Basen Uracil, Adenin oder Guanin (Manuvakhova et al., 2000). Da Arg127\* allerdings in den hier untersuchten Zellen einen höheren natürlichen Readthrough als Arg208\* aufweist, scheinen weitere Faktoren Einfluss zu nehmen. Der Einfluss der Sequenz des Stop-Codons und seiner Umgebung

auf die Effizienz der Termination der Translation wird in Abschnitt 5.3 noch ausführlicher diskutiert. Dass es bei der Mutation Arg127\* zu einer verhältnismäßig starken Aktivität (TPP1-Aktivität bei Arg127\* 7 % des Wildtyps, vs. Häufigkeit eines endogenen Readthrough bei UGA nur rund 1 %) kommt, ist zudem auf die Überexpression des rekombinanten TPP1 zurückzuführen und ist nicht auf die Verhältnisse in Patientenzellen übertragbar.

Bei den Versuchen mit Fibroblasten war ebenfalls die Tendenz eines Anstiegs der TPP1-Enzymaktivität sowohl bei den für 48 h mit Amlexanox behandelten, als auch bei den für fünf bzw. sieben Tage mit Amlexanox behandelten TPP1-Wildtypen im Vergleich zu den nicht-behandelten Zellen zu verzeichnen (vgl. Abbildung 4-12 und Abbildung 4-24). Für die 48-stündig behandelten Fibroblasten liegt zudem eine qPCR vor. Bei dieser konnte kein Anstieg der TPP1-mRNA-Menge in den Fibroblasten mit Wildtyp-TPP1 nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Stabilisierung des TPP1 durch Amlexanox auf Proteinebene, nicht jedoch auf mRNA-Ebene hin. Da die Ausbeute an Fibroblasten aufgrund des schlechten Wachstums sehr gering war, sind die Ergebnisse aus diesen Versuchsreihen unter Vorbehalt zu betrachten.

### 5.3 Amlexanox im Vergleich zu Gentamicin und PTC124

Die Behandlung der Zellen für 48 Stunden bzw. fünf und sieben Tage mit 250 µg/ml Gentamicin und 17 µM PTC124 führte ebenso wenig zu einem Anstieg des TPP1-Levels, wie die Behandlung mit Amlexanox. Auch mittels TPP1-Aktivitätsassay konnte weder in den transfizierten HEKs, noch in den Patienten-Fibroblasten eine vermehrte TPP1-Enzymaktivität durch eine Behandlung mit Gentamicin oder PTC124 nachgewiesen werden.

Die Wirkung des Aminoglykosids Gentamicin als Readthrough-Therapeutikum wird schon seit vielen Jahren erforscht. Bei einer ersten *in vivo* Studie mit Gentamicin als Readthrough-Therapeutikum im Jahr 1999 an einem Mausmodell der Duchenne Muskeldystrophie konnte eine vermehrte Expression von Dystrophin voller Länge durch die subkutane Injektion von Gentamicin festgestellt werden. Bei dem Tiermodell handelte es sich um *mdx*-Mäuse, die eine Nonsense-Mutation des Dystrophin-Gens exprimieren (Barton-Davis et al., 1999). Diese Ergebnisse konnten in einer Studie mit Muskeldystrophie-Patienten, die 14 Tage intravenös mit 7,5 mg/kg/Tag Gentamicin behandelt wurden, nicht bestätigt werden. Als mögliche Gründe wurden eine zu geringe Serumkonzentration, sowie die unbekannte Halbwertszeit des menschlichen Muskeldystrophins und somit eine womöglich zu kurze Behandlungsdauer diskutiert

(Wagner et al., 2001). Auch die Halbwertszeit von TPP1 in menschlichen Körperzellen ist bisher nicht bekannt. Die Kenntnis der Zeit, in welcher das Enzym in der Zelle umgesetzt wird, würde helfen, für zukünftige Versuche und Studien die notwendige Behandlungsdauer bzw. die Dosierung und die Behandlungsintervalle optimal festzulegen.

Im Jahr 2001 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um David E. Sleat eine Studie, in deren Rahmen Fibroblasten von CLN2-Patienten mit Gentamicin behandelt wurden. Ermittelt wurde, ob Gentamicin zu einer Wiederherstellung der TPP1-Aktivität führt. Ein Teil der untersuchten Patientenzellen exprimierten heterozygot die CLN2-Nonsense-Mutationen Arg127\* und Arg208\*. Durch die Gentamicin-Behandlung konnte in diesen Zellen bis zu ca. 5 % des TPP1-Aktivitätslevels der normalen, unbehandelten Kontrollgruppen erlangt werden. Die größte Steigerung der TPP1-Aktivität wurde bei einer Behandlung mit Gentamicin in einer Konzentration von 60-100 µg/ml erreicht (Sleat et al., 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten CLN2-Patienten-Fibroblasten exprimierten ebenfalls heterozygot die Nonsense-Mutationen Arg127\* und Arg208\*, was ähnliche Ergebnisse erwarten ließe. Sleat et al. stellten fest, dass es bei der Mutation Gln66X zu keinem Effekt durch die Behandlung mit Gentamicin kam. Aufgeführte Gründe hierfür sind beispielsweise der variierende Einfluss der NMD auf unterschiedliche Mutationen und das Einfügen einer inkorrekten Aminosäure anstelle des Stop-Codons, wodurch inaktives oder instabiles Enzym entstehen kann (Sleat et al., 2001). Diese Begründungen können allerdings nicht als Erklärung für den ausbleibenden Effekt in den Untersuchungen dieser Arbeit dienen, da es sich um Zellen desselben Genotyps handelt. Gegebenenfalls wurde von den recht sensibel reagierenden Fibroblasten, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, höhere Gentamicin-Konzentration von 250 µg/ml nicht toleriert. Diese Konzentration wurde in Vorversuchen der Arbeitsgruppe Tikkanen etabliert. Sleat et al. beobachteten, dass in den normalen Kontrollzellen die TPP1-Aktivität mit steigender Dosis und Behandlungsdauer sank und verwendeten maximal eine Gentamicin-Konzentration von 200 µg/ml. Die sinkende TPP1-Aktivität wurde auf die zelltoxische Wirkung von Gentamicin zurückgeführt (Sleat et al., 2001).

Gentamicin-Präparate setzen sich aus verschiedenen Aminoglykosid-Komponenten zusammen (Stypulkowska et al., 2010). Kommerziell erhältliches Gentamicin besteht zu 92 - 99 % aus den Hauptbestandteilen Gentamicin C1, C1a, C2 und C2a. Nebenbestandteile sind Gentamicin B, B1, C2b, A, X2 sowie Sisomicin (Friesen et al., 2018). Die einzelnen Komponenten verfügen über ein unterschiedlich großes Readthrough-Potential, und die exakte Zusammensetzung variiert von Präparat zu Präparat. Es ist zu vermuten, dass das Readthrough-Potential des Gentamicin-Präparats vom Anteil der wirksamsten

Komponenten abhängt. Da dieser Anteil variiert, unterscheidet sich auch die Readthrough-Aktivität der Gentamicin-Präparate (Friesen et al., 2018).

Die Verwendung von Gentamicin als Therapeutikum ist durch einige Faktoren limitiert: Zu den Nebenwirkungen von Gentamicin, insbesondere bei Langzeitanwendungen und bei der Verwendung in hohen Konzentrationen, zählen Oto- und Nephrotoxizität (Hinshaw et al., 1947). Hinzu kommt eine relativ schlechte Bioverfügbarkeit durch mangelnde Zellmembranpermeabilität, sowie das mangelnde Durchdringungsvermögen der Blut-Hirn-Schranke (Brooks et al., 2006). Um diese negativen Effekte zu umgehen, wird nach besser verträglichen Substanzen gesucht, die ebenfalls einen Readthrough hervorrufen können. Sowohl PTC124 als auch Amlexanox zeigten in Studien weniger unerwünschte Nebenwirkungen als Gentamicin (Loudon, 2013). Ein weiterer Vorteil, sowohl von PTC124, als auch von Amlexanox, ist die gastrointestinale Bioverfügbarkeit und damit die orale Verabreichungsform (Loudon, 2013).

Die Arbeitsgruppe um Sarkar untersuchte *in vitro* die Wirkung einer Behandlung mit PTC124 an Zellen von Patienten, welche aufgrund einer Nonsense-Mutation an infantiler Ceroidlipofuszinose (CLN1) erkrankt waren. CLN1 wird durch Mutationen des Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 Gens verursacht. Dies führt zur Funktionsunfähigkeit des entsprechenden Enzyms, der Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1 (PPT1). Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung der Patientenzellen mit PTC124 zeit- und dosisabhängig die Aktivität von PPT1 in den erkrankten Zellen steigern konnte. Der Anstieg der PPT1-Aktivität war zwar im Vergleich zur Aktivität in normalen Zellen sehr gering, führte aber zu einer Minimierung des Thioester-Speichermaterials (Ceroid) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Sarkar et al., 2011). Nachteilig für die Behandlung von Erkrankungen, welche das zentrale Nervensystem betreffen, ist, dass PTC124 die Blut-Hirn-Schranke nur zu überwinden scheint, wenn es in einer sehr hohen Dosis verabreicht wird (Miller et al., 2015). Amlexanox scheint hierzu in der Lage zu sein und könnte somit auch in Zellen des zentralen Nervensystems seine Wirkung entfalten (Torii et al., 1985).

#### **5.4 Gründe für das Versagen eines Amlexanox-induzierten Readthrough**

Amlexanox wurde im Laufe der vergangenen Jahre als Readthrough-Therapeutikum für verschiedene genetische Erkrankungen, welchen eine Nonsense-Mutation zugrunde liegt, getestet. Unter anderem veröffentlichten Atanasova et al. 2017 eine Studie, in der die Wirkung von Amlexanox auf Zellen von Epidermolysis bullosa Patienten *in vitro* untersucht wurde. Die Erkrankung wird durch eine Nonsense-Mutation im Gen für Typ-VII-Kollagen (COL7A1) hervorgerufen. Die Zellen stammten von 14 verschiedenen Patienten mit zwölf unterschiedlichen Nonsense-Mutationen. Behandelt wurden die Zellen über einen

Zeitraum von 48 Stunden mit Amlexanox in einer Konzentration von 250  $\mu$ M. Bei acht Western Blot-Analysen wurde eine erhöhte Menge Kollagen VII im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe nachgewiesen. Vier der zwölf untersuchten Mutationen zeigten keine Anzeichen für das Stattfinden eines Readthrough, weder mit Amlexanox, noch mit dem ebenfalls getesteten Gentamicin (Atanasova et al., 2017).

Die Wirkung einer Behandlung mit Amlexanox ist in der Arbeitsgruppe Tikkanen schon an einer weiteren lysosomalen Speichererkrankung untersucht worden, der Aspartylglucosaminurie (AGU). Der Erkrankung liegt eine Mutation des Aspartylglucosaminidase-Gens zugrunde. Das Enzym trägt zum Abbau von Glykoproteinen in den Lysosomen bei. Eine Funktionsstörung der Aspartylglucosaminidase (AGA) führt zum fortschreitenden Verlust kognitiver Fähigkeiten. Es konnte festgestellt werden, dass Amlexanox die Synthese von funktionsfähigem AGA voller Länge aus dem Nonsense-Allel Trp168X ermöglicht. Diese Mutation führt normalerweise infolge des mRNA-Abbaus durch NMD zu einem vollständigen Fehlen von AGA (Banning et al., 2018). Während die Behandlung mit Amlexanox erfolgreich sowohl das mRNA-Level, als auch die Enzymaktivität von AGA in heterozygoten Patientenzellen (Ser72Pro/Trp168X) signifikant steigern konnte, war dies bei einer Behandlung mit Gentamicin nicht der Fall. Eine Behandlung mit PTC124 nur zu einem geringen Anstieg der AGA-Enzymaktivität. Da die Mutation Trp168X nur 5 bp von einer Intron-Exon-Grenze entfernt liegt, ist der Abbau der RNA durch NMD besonders wahrscheinlich (Banning et al., 2018). Die Kombination aus den NMD-hemmenden und Readthrough-fördernden Eigenschaften von Amlexanox ist hierbei besonders vorteilhaft. Substanzen ohne NMD-Hemmung hingegen scheitern, da das Substrat für einen Readthrough vorzeitig abgebaut wurde.

Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass auch bei CLN2-Nonsense-Mutationen durch eine Behandlung mit Amlexanox ein Readthrough hervorgerufen werden könnte. Die möglichen Gründe, weshalb die Behandlung mit Amlexanox bei den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Zellen kein Readthrough bewirken konnte, sind vielfältig. Die Termination der Translation ist im Allgemeinen ein äußerst effizienter Vorgang. Die Fehlerrate in Form der Insertion einer Aminosäure anstelle eines natürlich vorkommenden Stop-Codons liegt unter 0,1 % (Keeling et al., 2014). Die Unterdrückung eines vorzeitigen Stop-Codons hingegen kommt mit einer Häufigkeit von etwa 1 % häufiger vor (Keeling et al., 2014). Es zeigte sich, dass das Auftreten eines Readthrough nicht nur vom Codon selbst, sondern auch vom Kontext abhängig ist (Manuvakhova et al., 2000). Die Bedeutsamkeit der Nukleotide in der direkten Nachbarschaft des Stop-Codons für die Effizienz der Termination ist für Prokaryoten bewiesen. Insbesondere das Nukleotid, welches direkt auf das Stop-Codon folgt, beeinflusst den Terminationsprozess. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Terminationssignal aus einer Tetranukleotid-

sequenz besteht (Poole et al., 1995). Demnach gibt es Stop-Codons in Kombination mit dem in 3'-Richtung folgendem Nukleotid, die natürlicher Weise häufiger nicht als Stop-Signal erkannt, also „durchlesen“ werden, als andere. Atanasova et. al. stellten in ihrer bereits erwähnten Studie fest, dass jene Zellen unter Einwirken von Amlexanox und Gentamicin ein Readthrough zeigten, welche generell schon ein eher „undichtes“ Stop-Codon exprimierten. Folglich handelte es sich um Zellen, bei denen die unbehandelte Kontrollgruppe bereits eine geringe Menge endogenes Kollagen VII enthielt. Aus diesen Erkenntnissen heraus entstand die Vermutung, dass Amlexanox und Gentamicin eher das Readthrough der vorzeitigen Stop-Codons verstärken, als es zu initiieren (Atanasova et al., 2017). In den unbehandelten CLN2-Patientenfibroblasten mit heterozygoter TPP1-Nonsense-Mutation war in den Untersuchungen dieser Arbeit mithilfe des Aktivitätsassays keine Restenzymaktivität nachzuweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten frühzeitigen Stop-Codons generell nicht zu jenen Stop-Codons gehören, die unter Normalbedingungen verhältnismäßig häufig überlesen werden.

Atanasova et al. inkubierten die Zellen zunächst mit verschiedenen Amlexanox-Konzentrationen. In den Zellen, welche 48 Stunden mit einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  inkubiert wurden, war die größte Menge an Kollagen VII nachweisbar, sodass alle weiteren Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt wurden (Atanasova et al., 2017). Gonzalez-Hilarion et al. stellten hingegen fest, dass eine Verwendung von Amlexanox in Konzentrationen höher als 25  $\mu\text{M}$  zu morphologischen Veränderungen der Zellen führte. Dies deutet darauf hin, dass höhere Konzentrationen den zellulären Metabolismus beeinflussen. Bis zu einer Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  war die Lebensfähigkeit der untersuchten Zellen vergleichbar mit der Lebensfähigkeit jener Zellen, die mit reinem DMSO inkubiert wurden. Um irreführende Ergebnisse zu vermeiden, wurde eine Konzentration von maximal 25  $\mu\text{M}$  verwendet (Gonzalez-Hilarion et al., 2012). Mit dieser vergleichsweise niedrigen Amlexanox-Konzentration wurden die Zellen auch in der vorliegenden Dissertation behandelt, um morphologische Veränderungen der Zellen, wie von Gonzales-Hilarion beschrieben, zu vermeiden. Möglicherweise war die Konzentration nicht ausreichend hoch und Behandlungen mit stärkeren Konzentrationen im Bereich von 250  $\mu\text{M}$  würde den gewünschten Effekt erzielen. Allerdings zeigen Ergebnisse der AG Tikkanen, dass zu hohe Amlexanox-Konzentrationen toxisch auf die Fibroblasten wirken, sodass auf die Erprobung höherer Amlexanox-Konzentrationen verzichtet wurde.

Howard et al. unterzogen die Effizienz des Aminoglykosid-induzierten Readthrough der einzelnen Stop-Codons einer systematischen Untersuchung. Hierbei zeigte sich, dass UGA unter Aminoglykosideinfluss signifikant häufiger überlesen wurde, als die beiden

anderen Stop-Codons UAG und UAA. Zudem hatte auch das Nukleotid, welches dem Stop-Codon unmittelbar folgte, einen erkennbaren Einfluss auf die Effizienz des Readthrough in folgender Reihenfolge:  $C > U > A \geq G$ . Die Arbeitsgruppe zog die Schlussfolgerung, dass die Effizienz eines Readthrough durch die Behandlung mit Aminoglykosiden umgekehrt proportional zur Effizienz der Termination unter Normalbedingungen ist (Howard et al., 2000).

Von den drei eukaryotischen Terminationssignalen ist UAA das effizienteste, gefolgt von UAG mit mittlerer Effizienz. UGA weist die niedrigste Terminationseffizienz und damit das größte Readthrough-Potential auf (Brooks et al., 2006). Dementsprechend ist zu vermuten, dass die Behandlungen mit Amlexanox, Gentamicin und PTC124 bei den untersuchten Zellen zu einem erfolgreichen Durchlesen der vorzeitigen Stop-Codons führen. Beide in dieser Arbeit untersuchten Nonsense-Mutationen führen zu einem Stop-Codon UGA. Bei den Zellen mit der Mutation Arg208\* handelt es sich bei dem auf das Stop-Codon folgende Nukleotid um Cytosin. Diese Tetranukleotid-Sequenz erwies sich in den Experimenten von Howard et al. als am anfälligsten für Aminoglykosid-induzierten Readthrough. Der Einfluss des Kontextes des Stop-Codons auf den Terminationprozess ist allerdings bei höheren Eukaryoten bisher nicht gänzlich verstanden. Zudem ist der Vorgang eines Readthrough hochkomplex, sodass allein durch den Kontext des Stop-Codons die Effizienz eines Durchlesens nicht vorhergesagt werden kann (Bidou et al., 2004).

## 5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Auswirkung einer Behandlung mit der Readthrough Substanz Amlexanox auf Zellen untersucht, welche eine TPP1-Nonsense-Mutation exprimieren. Zudem wurden Kontrollgruppen mit Gentamicin und PTC124 behandelt. Bei den untersuchten TPP1-Nonsense-Mutationen Arg127\* und Arg208\* konnte kein Anstieg der TPP1-Enzymaktivität durch eine Behandlung mit Amlexanox nachgewiesen werden.

Zukünftig könnten Versuchsreihen mit höheren Amlexanox-Konzentrationen durchgeführt werden. In der Literatur sind Versuche mit Konzentrationen von bis zu 250  $\mu\text{M}$  beschrieben. Diese Konzentrationen sind von den Zellen gut vertragen worden (Atanasova et al., 2017). Falls bei der Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Amlexanox ein Readthrough der Mutationen Arg127\* und Arg208\* nachzuweisen wäre, ist die Erstellung einer Dosisabhängigkeitskurve sinnvoll. Somit könnte die geringste und dennoch

wirksame Konzentration gefunden werden, um Auswirkungen auf den Zellmetabolismus möglichst gering zu halten.

Die Patienten-Fibroblasten erwiesen sich generell als wenig tolerant gegenüber den zu untersuchenden Substanzen. Die Zellausbeute war aus diesem Grund häufig zu gering, um aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen. Um diese Problematik zu umgehen wäre es sinnvoll, induzierte pluripotente Stammzellen (engl. induced pluripotent stem cells, iPSC) für weitere Untersuchungen zu verwenden. Diese könnten zu Neuronen differenziert werden, um die Auswirkung von Amlexanox und anderen Readthrough-Substanzen insbesondere auf jene Zellen untersuchen zu können, die für den Krankheitsverlauf der CLN2 besonders kritisch sind. Idealerweise könnte für weitere Experimente das Mausmodell  $Cln2^{R207X/R207X}$  herangezogen werden. Die von den Mäusen dieses Krankheitsmodells exprimierte Mutation R207X ist äquivalent zur menschlichen CLN2-Nonsense-Mutation R208X (Geraets et al., 2017). Dies macht die  $Cln2^{R207X/R207X}$ -Mäuse zu einem brauchbaren Modell für vorklinische Untersuchungen der Readthrough-Therapeutika.

Eine weitere Möglichkeit für zukünftige Studien besteht in der Untersuchung der Wirkung einer Kombination mehrerer Präparate. Zellen könnten beispielsweise zeitgleich mit Amlexanox und PTC124 behandelt werden. Die Effizienz eines Readthrough ist hochgradig abhängig von der Menge an verfügbarer mRNA (Bidou et al., 2004). Die NMD-hemmende Wirkung von Amlexanox und die Readthrough Eigenschaften von PTC124 könnten einander gegebenenfalls verstärken. Ein solcher Effekt wurde schon für die Kombination von Ataluren mit Koffein nachgewiesen: Lentini et al. untersuchten die Auswirkung einer kombinierten Behandlung von Koffein und Ataluren an Zellen mit Zystischer Fibrose. Es konnte festgestellt werden, dass die Vorbehandlung mit Koffein das Level an funktionsfähigem CFTR im Vergleich zu einer Behandlung mit Ataluren allein signifikant steigert (Lentini et al., 2019). Koffein inhibiert die SMG1-Kinase, jenes Protein, welches für die Phosphorylierung von UPF1 zuständig ist (Keeling et al., 2013). Die Kombination von Koffein und Amlexanox bei der Behandlung von CLN2 sollte zukünftig ebenfalls untersucht werden.

## Deutsche Zusammenfassung

Die Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) ist eine lysosomale Serinprotease, die Tripeptide am N-Terminus von Polypeptiden abspaltet und somit an deren Abbau beteiligt ist. TPP1 wird als inaktives Proenzym synthetisiert und hat als solches eine Molekülmasse von 67 kDa. Durch autokatalytische Prozessierung entsteht unter saurem pH-Wert aus dem Vorläufer das aktive Enzym mit einer molekularen Masse von 45 kDa.

Das *TPP1*-Gen liegt am Genort 11p15. Eine Mutation des *TPP1*-Gens führt zu Neuronaler Ceroidlipofuszinose 2 (CLN2), einer lysosomalen Speichererkrankung. Die eingeschränkte Funktion von TPP1 hat die Anreicherung jener Substrate in den Lysosomen zur Folge, zu deren Abbau TPP1 unter normalen Umständen beitragen würde. Die genauen Substrate von TPP1 *in vivo* sind bisher unbekannt. Die zunehmende Ansammlung von Substraten führt zu einer Schädigung der Zellen, was sich phänotypisch in einem fortschreitenden Verlust geistiger Fähigkeiten, einem progressiven Visusverlust und Krampfanfällen äußert. Erste Symptome treten im Alter von ca. zweieinhalb Jahren auf. Betroffene Kinder werden kaum älter als 15 Jahre. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Zwei der bei CLN2-Patienten am häufigsten vorkommenden Mutationen sind die Nonsense-Mutationen Arg127\* und Arg208\*. Die Substanz Amlexanox zeigte in vorangegangenen Studien die Fähigkeit, zu einem Durchlesen („Readthrough“) solcher Nonsense-Mutationen zu führen. Anstelle des vorzeitigen Stop-Codons kommt es zum Einbau einer Aminosäure.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung einer Behandlung mit Amlexanox auf Patientenfibroblasten bzw. transfizierten Zellen untersucht, welche eine Nonsense-Mutation des *TPP1*-Gens exprimierten. Der Fokus lag auf der Untersuchung von Zellen, welche die Nonsense-Mutationen Arg127\* und Arg208\* exprimierten. Zur Kontrolle wurden die Experimente ebenfalls mit Zellen durchgeführt, deren *TPP1*-Gen die Missense-Mutation Ile287Asn enthielt. Zum Vergleich wurden die Zellen ebenfalls mit Gentamicin und PTC124 (Ataluren) behandelt, welche beide als Readthrough-Substanzen bekannt sind. Ziel war es festzustellen, ob die Behandlung mit Amlexanox zu einer erhöhten Produktion von funktionsfähigem TPP1 führt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Amlexanox keine erhöhte Synthese von TPP1-Protein in den Mutanten bewirkt. Auch die Aktivität des Enzyms in den mit Amlexanox behandelten Zellen war nicht höher, als in den unbehandelten Zellen. Die Daten deuten darauf hin, dass eine Behandlung mit den hier untersuchten, gängigen Readthrough-Substanzen für Patienten, welche die beiden häufigsten CLN2-Nonsense-Mutationen exprimieren, ungeeignet ist.

## Englische Zusammenfassung

Tripeptidyl peptidase 1 (TPP1) is a lysosomal serine protease that participates in the degradation of polypeptides by cleaving N-terminal tripeptides. TPP1 is synthesized as an inactive precursor that exhibits a molecular mass of 67 kDa. When the proenzyme is exposed to an acid pH, it is autocatalytically processed into the active enzyme that has a molecular mass of 45 kDa.

The human *TPP1* gene is located on chromosome 11p15. Mutations of the *TPP1* gene lead to Neuronal Ceroid Lipofuscinosis 2 (CLN2), which is an autosomal recessive lysosomal storage disease. The dysfunction of TPP1 results in the intracellular accumulation of the substrates that are usually broken down by the functional enzyme. The exact substrates of TPP1 *in vivo* are not known yet. The increasing accumulation of substrates leads to cell damage, which is displayed phenotypically in progressive loss of mental abilities, loss of vision and epileptic seizures. First symptoms occur at the age of about two and a half years. Affected children barely reach an age of 15 years. The nonsense mutations Arg127\* and Arg208\* are highly common in CLN2.

In this project, the effect of treatment with Amlexanox on patient fibroblasts or transfected cells that express a *TPP1*-gene nonsense mutation has been investigated. Previous studies have shown that the drug amlexanox is able to overcome premature stop codons by inducing "read-through" and incorporation of an amino acid. This work has especially focused on the nonsense mutations Arg127\* and Arg208\*. As a control, cells expressing the missense mutation Ile287Asn were analyzed. To compare the results, the cells were also treated with Gentamicin and PTC124 (Ataluren). Both drugs are capable of inducing read-through in former studies. The project aimed to determine if treatment with Amlexanox leads to an increased production of functional TPP1.

The treatment with Amlexanox did not cause an increased protein level of TPP1 in the cells with the nonsense mutations. The TPP1 enzyme activity in the cells treated with Amlexanox was not enhanced, as compared to the untreated ones. These data suggest that a read-through therapy with Amlexanox is not suitable for the treatment of patients exhibiting the two major CLN2 nonsense mutations.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Übersicht der NCL-Formen modifiziert nach (Neverman et al., 2015).....	5
Tabelle 1-2 Übersicht der NCL-Gene, die betroffenen Proteine und deren Lokalisation in der Zelle, modifiziert nach (Johnson et al., 2019).....	6
Tabelle 1-3 Gesamtanzahl der seit 1998 erfassten TPP1-Mutationen, Mutationsformen, sowie die Anzahl der betroffenen Patienten und Familien.....	8
Tabelle 1-4 CLN2-spezifische Bewertungsskala modifiziert nach (Schulz et al., 2018)..	11
Tabelle 1-5 Stop-Codons und jeweils nah verwandte Aminosäuren modifiziert nach (Keeling et al., 2012).....	16
Tabelle 2-1 Materialien und Geräte .....	20
Tabelle 2-2 Verwendete Chemikalien und Lösungen sowie deren Hersteller .....	22
Tabelle 2-3 Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung .....	23
Tabelle 2-4 Kits und Säulen.....	24
Tabelle 2-5 Verwendete Primärantikörper, der jeweiligen Verdünnung und deren Hersteller.....	24
Tabelle 2-6 Klonierungs- und Mutagenese-Primer, ihre Sequenzen und darin enthaltenen Schnittstellen.....	25
Tabelle 2-7 q-RT-PCR Primer, ihre Sequenzen und die NCBI Referenzsequenzen der entsprechenden Zielgene .....	26
Tabelle 2-8 Humane Zelllinien und der Bakterienstamm sowie deren Referenz und eine kurze Beschreibung .....	27
Tabelle 2-9 Bezeichnung der Mutanten, exprimierte Mutation und Art der Mutation.....	27

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung der Enzym-Ersatztherapie modifiziert nach (Johnson et al., 2019) .....	10
Abbildung 1-2 Vergleich der prokaryotischen und der eukaryotischen Aminoacyl-tRNA Bereich,e modifiziert nach (Recht et al., 1999) .....	15
Abbildung 4-1 DNA-Sequenzen von TPP1-WT im Vergleich zu TPP1-Arg127* .....	37
Abbildung 4-2 DNA-Sequenzen von TPP1-WT im Vergleich zu TPP1-Arg208* .....	38
Abbildung 4-3 DNA-Sequenzen von TPP1-WT im Vergleich zu TPP1-Ile287Asn .....	38
Abbildung 4-4 Western-Blot von n.t., den Mutanten Arg127*, Arg208* und Ile287Asn, sowie des WT nach 72 h ohne Behandlung .....	40
Abbildung 4-5 Western Blot von n.t. und WT jeweils ohne Behandlung und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax).....	41
Abbildung 4-6 Western Blot von den Mutanten Arg127*, Arg208* und Ile287Asn jeweils ohne Behandlung und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax).....	41
Abbildung 4-7 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEK293T-Zellen (Amlexanox, 48 h).....	42
Abbildung 4-8 Western Blot von WT, den Mutanten Arg127* und Arg208* .....	43
Abbildung 4-9 Western Blot des Mutanten Ile287Asn und der nicht-transfizierten Kontrollgruppe.....	43
Abbildung 4-10 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (PTC124 bzw. Gentamicin, 48 h).....	44
Abbildung 4-11: Western-Blot von WT, Ile287Asn und Fibroblasten mit doppelter Stop-Mutation (Arg127* und Arg208*) unbehandelt und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax).....	45
Abbildung 4-12 TPP1-Aktivitätsassay von WT, Ile287Asn und Fibroblasten mit doppelter Stop-Mutation (Arg127* und Arg208*) behandelt und 48 h mit Amlexanox behandelt (Ax) .....	46
Abbildung 4-13 TPP1-mRNA/NF von WT, 2xSTOP und Ile287Asn .....	47
Abbildung 4-14 Western Blot von Arg127* und n.t. jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Amlexanox .....	48
Abbildung 4-15 Western Blot von Arg208* und WT jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Amlexanox .....	48
Abbildung 4-16 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (Zeitreihe Amlexanox) .....	49
Abbildung 4-17 Western Blot von Arg127* und n.t. jeweils ohne Behandlung (0 d), nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit PTC124.....	50

Abbildung 4-18: Western Blot von Arg208\* und WT jeweils ohne Behandlung (0 d), nach  
fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit PTC124.....50

Abbildung 4-19 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (Zeitreihe PTC124) 51

Abbildung 4-20 Western Blot von Arg127\* und Arg208\* jeweils ohne Behandlung (0 d),  
nach fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Gentamicin...52

Abbildung 4-21: Western Blot von n.t. und WT jeweils ohne Behandlung (0 d), nach  
fünftägiger (5 d) und nach siebentägiger (7 d) Behandlung mit Gentamicin.....52

Abbildung 4-22 TPP1-Aktivitätsassay transient transfizierter HEKs (Zeitreihe Gentamicin)  
.....53

Abbildung 4-23 Western Blot von Fibroblasten mit doppelter TPP1-Stopmutation  
(Arg127\* und Arg208\*) und WT unbehandelt (0), fünf Tage (5 d) und sieben Tage  
(7 d) mit Amlexanox behandelt .....54

Abbildung 4-24: TPP1-Aktivitätsassay von WT und Fibroblasten mit doppelter Stop-  
Mutation (Arg127\* und Arg208\*) unbehandelt (0), fünf Tage (5 d) und sieben Tage  
(7 d) mit Amlexanox behandelt .....54

**Abkürzungsverzeichnis**

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	Amlexanox
B2M	Beta-2 Mikroglobulin
cDNA	engl. copy desoxyribonucleic acid
CFTR	engl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cLINCL	engl classic late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis
CLN	Ceroidlipofuszinose
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethyldicarbonat behandeltes Wasser
DNA	engl. desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's medium
EJC	engl. exon junction complex
eRF	engl. eukaryotic release factor
ERT	engl. enzyme replacement therapie
FCS	engl. fetal calf serum
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	engl. human embryonic kidney
HRP	engl. horseradish peroxidase
huCNS-SC	human central nervous system stem cell
ICV	intracerebroventrikulär
LB	engl. lysogeny broth
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
NCBI	National Center of Biological Information
NCL	Neuronale Ceroidlipofuszinosen
NMD	engl. nonsense-mediated decay
n.t.	nicht transfiziert
PBS	engl. phosphate-buffered saline
PPT1	Palmitoyl-Protein-Thioesterase 1
PTC	engl. premature stop codon
rhTPP1	humanes, rekombinantes Tripeptidyl-Peptidase 1 Proenzym
RNA	engl. ribonucleic acid
Rpl-13a	ribosomal protein L 13a
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMG	engl. suppressor with morphological effect on genitalia

TBST	engl. Tris buffered saline & Tween 20
tRNA	engl. transfer ribonucleic acid
TTP1	Tripeptidyl-Peptidase 1
qRT-PCR	engl. quantitative real-time polymerase chain reaction
UPF	engl. up-frameshift protein
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
Ywhaz	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta

## Literaturverzeichnis

- Ahn, S., Kim, J., & Hwang, J. (2013). CK2-mediated TEL2 phosphorylation augments nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by increase of SMG1 stability. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(10), 1047–1055. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.06.002>
- Amin, A., Weston, M., & Mindell, J. A. (2016). Role of Counterions in Acidification in Mouse Liver Lysosomes. *Biophysical Journal*, 110(3), 138a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.789>
- Arai, K., Shimayasu, A., Hiratanill, N., & Ohkumaji, S. (1993). Purification and Characterization of Lysosomal H<sup>+</sup>-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5649–5660.
- Atanasova, V. S., Jiang, Q., Prisco, M., Gruber, C., Piñón Hofbauer, J., Chen, M., Has, C., Bruckner-Tuderman, L., McGrath, J. A., Uitto, J., & South, A. P. (2017). Amlexanox Enhances Premature Termination Codon Read-Through in COL7A1 and Expression of Full Length Type VII Collagen: Potential Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(9), 1842–1849. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.011>
- Banning, A., Schi, M., & Tikkanen, R. (2018). Molecular Basis of Disease Amlexanox provides a potential therapy for nonsense mutations in the lysosomal storage disorder Aspartylglucosaminuria. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1864(October 2017), 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.12.014>
- Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E., & Sweeney, H. L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *Journal of Clinical Investigation*, 104(4), 375–381. <https://doi.org/10.1172/JCI7866>
- Bernardini, F., & Warburton, M. J. (2002). Storage of Peptides in Classical Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Biochemical Journal*, 366, 521–529.
- Bidou, L., Hatin, I., Perez, N., Allamand, V., Panthier, J. J., & Rousset, J. P. (2004). Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Therapy*, 11(7), 619–627. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302211>
- Bielschowsky, M. (1913). Über spät-infantile familiäre amaurotische Idiotie mit Kleinhirnsymptomen. *Deutsche Zeitschrift Für Nervenheilkunde*, 50, 7–29.
- Boustany, R. M. (1992). Neurology of the neuronal ceroid-lipofuscinoses: Late infantile and juvenile types. *American Journal of Medical Genetics*, 42(4), 533–535. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320420421>
- Brooks, D. A., Muller, V. J., & Hopwood, J. J. (2006). Stop-codon read-through for patients affected by a lysosomal storage disorder. *Trends in Molecular Medicine*, 12(8), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.06.001>
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. (2009). Biologie. In *Biologie*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Cárcel-Trullols, J., Kovács, A. D., & Pearce, D. A. (2015). Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(10), 2242–2255. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.04.027>
- Cooper, J. D. (2003). Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis. *Current Opinion in Neurology*, 16(2), 121–128. <https://doi.org/10.1097/01.wco.0000063762.15877.9b>
- Crick, F. (1958). On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*. <https://doi.org/10.1038/227561a0>

- Dawson, G., Schroeder, C., & Dawson, P. E. (2010). Palmitoyl: Protein thioesterase (PPT1) inhibitors can act as pharmacological chaperones in infantile Batten disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(1), 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.137>
- Du, M., Liu, X., Welch, E. M., Hirawat, S., Peltz, S. W., & Bedwell, D. M. (2008). *PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model*. 10–15.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3), 904–908. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2207>
- Fietz, M., AlSayed, M., Burke, D., Cohen-Pfeffer, J., Cooper, J. D., Dvořáková, L., Giugliani, R., Izzo, E., Jahnová, H., Lukacs, Z., Mole, S. E., Noher de Halac, I., Pearce, D. A., Poupetova, H., Schulz, A., Specchio, N., Xin, W., & Miller, N. (2016). Diagnosis of neuronal ceroid lipofuscinosis type 2 (CLN2 disease): Expert recommendations for early detection and laboratory diagnosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 119(1–2), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.07.011>
- Friesen, W. J., Johnson, B., Sierra, J., Zhuo, J., Vazirani, P., Xue, X., Tomizawa, Y., Baiazitov, R., Morrill, C., Ren, H., Babu, S., Moon, Y. C., Branstrom, A., Mollin, A., Hedrick, J., Sheedy, J., Elfring, G., Weetall, M., Colacino, J. M., ... Peltz, S. W. (2018). The minor gentamicin complex component, X2, is a potent premature stop codon readthrough molecule with therapeutic potential. *PLoS ONE*, 13(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206158>
- Geraets, R. D., Langin, L. M., Cain, J. T., Parker, C. M., Beraldi, R., Kovacs, A. D., Weimer, J. M., & Pearce, D. A. (2017). A tailored mouse model of CLN2 disease: A nonsense mutant for testing personalized therapies. *PLOS ONE*, 12(5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176526>
- Gonzalez-Hilarion, S., Beghyn, T., Jia, J., Debreuck, N., Berte, G., Mamchaoui, K., Mouly, V., Gruenert, D. C., Déprez, B., & Lejeune, F. (2012). Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-58>
- Gupta, P., & Hofmann, S. L. (2002). Neuronal ceroid lipofuscinosis/Batten disease: The lysosomal proteinoses. *Molecular Psychiatry*, 7(5), 434–436. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001127>
- Haltia, M. (2003). The Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.1.1>
- Haltia, M., & Goebel, H. H. (2012). Biochimica et Biophysica Acta The neuronal ceroid-lipofuscinoses : A historical introduction ☆. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1832, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.012>
- Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., & Silver, L. M. (2011). *Genetics - From Genes to Genomes* (4th editio). McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hinshaw, H. C., Pyle, M. M., & Feldman, W. H. (1947). Streptomycin in Tuberculosis. *The American Journal of Medicine*, 2(5), 429–435.
- Hirawat, S., Welch, E. M., Elfring, G. L., Northcutt, V. J., Paushkin, S., Hwang, S., Leonard, E. M., Almstead, N. G., Ju, W., Peltz, S. W., & Miller, L. L. (2007). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47(4), 430–444. <https://doi.org/10.1177/0091270006297140>
- Howard, M. T., Shirts, B. H., Petros, L. M., Flanigan, K. M., Gesteland, R. F., & Atkins, J. F. (2000). Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: Potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 48(2), 164–169. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200008\)48:2<164::AID-ANA5>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200008)48:2<164::AID-ANA5>3.0.CO;2-B)

- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 86, pp. 45–93). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386497-0.00002-5>
- Johnson, T. B., Cain, J. T., White, K. A., Ramirez-Montealegre, D., Pearce, D. A., & Weimer, J. M. (2019). Therapeutic landscape for Batten disease: current treatments and future prospects. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 161–178). Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0138-8>
- Kahlmeter, G., & Dahlager, J. I. (1984). Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 13 Suppl A, 9–22. [https://doi.org/10.1093/jac/13.suppl\\_a.9](https://doi.org/10.1093/jac/13.suppl_a.9)
- Katz, M. L., Coates, J. R., Sibigroth, C. M., Taylor, J. D., Carpentier, M., Young, W. M., Wininger, F. A., Kennedy, D., Vuillemenot, B. R., & O'Neill, C. A. (2014). Enzyme replacement therapy attenuates disease progression in a canine model of late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN2 disease). *Journal of Neuroscience Research*, 92(11), 1591–1598. <https://doi.org/10.1002/jnr.23423>
- Katz, M. L., Tecedor, L., Chen, Y., Williamson, B. G., Lysenko, E., Wininger, F. A., Young, W. M., Johnson, G. C., Whiting, R. E. H., Coates, J. R., & Davidson, B. L. (2015). AAV gene transfer delays disease onset in a TPP1-deficient canine model of the late infantile form of Batten disease. *Science Translational Medicine*, 7(313), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac6191>
- Keeling, K. M., Wang, D., Conard, S. E., & Bedwell, D. M. (2012). Suppression of Premature Termination Codons as a Therapeutic Approach. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 47(5), 444–463. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.694846>
- Keeling, K. M., Wang, D., Dai, Y., Murugesan, S., Chenna, B., Clark, J., Belakhov, V., Kandasamy, J., Velu, S. E., Baasov, T., & Bedwell, D. M. (2013). Attenuation of Nonsense-Mediated mRNA Decay Enhances In Vivo Nonsense Suppression. *Plos One*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060478>
- Keeling, K. M., Xue, X., Gunn, G., & Bedwell, D. M. (2014). Therapeutics Based on Stop Codon Readthrough. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15(1), 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153527>
- Kelley, T. J., Thomas, K., Milgram, L. J. H., & Drumm, M. L. (1997). In vivo activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant  $\Delta F508$  in murine nasal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2604–2608. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2604>
- Khajavi, M., Inoue, K., & Lupski, J. R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics*, 14(10), 1074–1081. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201649>
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2008). Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4), 389–406. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0394-y>
- Lentini, L., Mel, R., Cancemi, P., Pibiri, I., & Di, A. (2019). Caffeine boosts Ataluren's readthrough activity. *Heliyon*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01963>
- Lin, L., & Lobel, P. (2001). Enzyme-replacement therapy in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *The Biochemical Journal*, 55(Pt.1), 49–55.
- Lin, L., Sohar, I., Lackland, H., & Lobel, P. (2001). The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 2249–2255. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008562200>
- Loudon, J. A. (2013). Repurposing amlexanox as a “run the red light cure-all” with readthrough-a “no-nonsense” approach to personalised medicine. *Journal of Bioanalysis and Biomedicine*, 5(4), 79–96. <https://doi.org/10.4172/1948-593X.1000086>
- Lynch, S. R., & Puglisi, J. D. (2001). Structure of a Eukaryotic Decoding Region A-site RNA. *J. Mol. Biol.*, 1023–1035. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4419>

- Manuvakhova, M., Keeling, K., & Bedwell, D. M. (2000). Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*, 6(7), 1044–1055. <https://doi.org/10.1017/S1355838200000716>
- Markham, A. (2017). Cerliponase Alfa : First Global Approval. *Drugs*, 77(11), 1247–1249. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0771-8>
- Mendell, J. T., & Dietz, H. C. (2001). When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell*, 107(4), 411–414. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00583-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00583-9)
- Miller, J. N., Kovács, A. D., & Pearce, D. A. (2015). The novel Cln1R151X mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL) for testing nonsense suppression therapy. *Human Molecular Genetics*, 24(1), 185–196. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu428>
- Miller, J. N., & Pearce, D. A. (2014). Nonsense-mediated decay in genetic disease: Friend or foe? *Mutation Research*, 762, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.05.001>
- Mole, S. E. (1998). Batten disease: Four genes and still counting. *Neurobiology of Disease*, 5(5), 287–303. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0209>
- Mole, S. E., Anderson, G., Band, H. A., Berkovic, S. F., Cooper, J. D., Kleine Holthaus, S. M., McKay, T. R., Medina, D. L., Rahim, A. A., Schulz, A., & Smith, A. J. (2019). Clinical challenges and future therapeutic approaches for neuronal ceroid lipofuscinosis. *The Lancet Neurology*, 18(1), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30368-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30368-5)
- Mole, S. E., & Cotman, S. L. (2015). Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses (Batten disease). *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(10), 2237–2241. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.011>
- Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D. N., & Å, N. A. C. (2008). RESEARCH ARTICLE A Meta-Analysis of Nonsense Mutations Causing Human Genetic Disease. 29(May), 1037–1047. <https://doi.org/10.1002/humu.20763>
- Neverman, N. J., Best, H. L., Hofmann, S. L., & Hughes, S. M. (2015). Experimental therapies in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(10), 2292–2300. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.04.026>
- Ommen, D. D. Z., Vijftigschild, L. A. W., Kruisselbrink, E., & Vonk, A. M. (2016). Limited premature termination codon suppression by read-through agents in cystic fibrosis intestinal organoids. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(2), 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.07.007>
- Passini, M. A., Dodge, J. C., Bu, J., Yang, W., Zhao, Q., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kaminsky, S. M., Mao, Q., Shihabuddin, L., Cheng, S. H., Sleat, D. E., Stewart, G. R., Davidson, B. L., Lobel, P., & Crystal, R. G. (2006). Intracranial Delivery of CLN2 Reduces Brain Pathology in a Mouse Model of Classical Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Journal of Neuroscience*, 26(5), 1334–1342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2676-05.2006>
- Poole, E. S., Brown, C. M., & Tate, W. P. (1995). The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 14(1), 151–158. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb06985.x>
- Radke, J., Stenzel, W., & Goebel, H. H. (2015). Human NCL Neuropathology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(10), 2262–2266. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.007>
- Recht, M. I., Douthwaite, S., & Puglisi, J. D. (1999). Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *EMBO Journal*, 18(11), 3133–3138. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3133>

- Rider, J. A., & Rider, D. L. (1999). Thirty years of Batten disease research: Present status and future goals. *Molecular Genetics and Metabolism*, 66(4), 231–233. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2827>
- Sadava, D., Hillis, D. M., Heller, H. C., & Berenbaum, M. R. (2011). *Biologie* (9. Auflage). Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag.
- Sarkar, C., Zhang, Z., & Mukherjee, A. B. (2011). Stop codon read-through with PTC124 induces palmitoyl-protein thioesterase-1 activity , reduces thioester load and suppresses apoptosis in cultured cells from INCL patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(3), 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.05.021>
- Schulz, A., Ajayi, T., Specchio, N., de Los Reyes, E., Gissen, P., Ballon, D., Dyke, J. P., Cahan, H., Slasor, P., Jacoby, D., & Kohlschütter, A. (2018). Study of intraventricular cerliponase alfa for CLN2 disease. *New England Journal of Medicine*, 378(20), 1898–1907. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1712649>
- Schulz, A., Kohlschütter, A., Mink, J., Simonati, A., & Williams, R. (2013). NCL diseases - clinical perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(11), 1801–1806. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.008>
- Selden, N. R., Al-Uzri, A., Huhn, S. L., Koch, T. K., Sikora, D. M., Nguyen-Driver, M. D., Guillaume, D. J., Koh, J. L., Gultekin, S. H., Anderson, J. C., Vogel, H., Sutcliffe, T. L., Jacobs, Y., & Steiner, R. D. (2013). Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 11(6), 643–652. <https://doi.org/10.3171/2013.3.PEDS12397>
- Siintola, E., Lehesjoki, A. E., & Mole, S. E. (2006). Molecular genetics of the NCLs - status and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(10), 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.006>
- Silva, A. L., & Romão, L. (2009). The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? In *FEBS Letters* (Vol. 583, Issue 3, pp. 499–505). Federation of European Biochemical Societies. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.058>
- Sleat, D. E., Donnelly, R. J., Lackland, H., Liu, C. G., Sohar, I., Pullarkat, R. K., & Lobel, P. (1997). Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Science*, 277(5333), 1802–1805. <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1802>
- Sleat, D. E., Gin, R. M., Sohar, I., Wisniewski, K., Sklower-brooks, S., Pullarkat, R. K., Palmer, D. N., Lerner, T. J., Boustany, R., Uldall, P., Siakotos, A. N., Donnelly, R. J., & Lobel, P. (1999). Mutational Analysis of the Defective Protease in Classic Late-Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis , a Neurodegenerative Lysosomal Storage Disorder. *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 1511–1523.
- Sleat, D. E., Sohar, I., Gin, R. M., & Lobel, P. (2001). Aminoglycoside-mediated suppression of nonsense mutations in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *European Journal of Paediatric Neurology*, 5, 57–62. <https://doi.org/10.1053/ejpn.2000.0436>
- Sondhi, D., Peterson, D. A., Giannaris, E. L., Sanders, C. T., Mendez, B. S., De, B., Rostkowski, A. B., Blanchard, B., Bjugstad, K., Sladek, J. R., Redmond, D. E., Leopold, P. L., Kaminsky, S. M., Hackett, N. R., & Crystal, R. G. (2005). AAV2-mediated CLN2 gene transfer to rodent and non-human primate brain results in long-term TPP-I expression compatible with therapy for LINCL. *Gene Therapy*, 12(22), 1618–1632. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302549>
- Stengel, O. C. (1826). Beretning om et mærkeligt Sygdomstilfaelde hos fire Sødskende I Nærheden af Røraas. *Eyr*, 1, 347–352.
- Stypulkowska, K., Blazewicz, A., Fijalek, Z., & Sarna, K. (2010). Determination of gentamicin sulphate composition and related substances in pharmaceutical preparations by LC with charged aerosol detection. *Chromatographia*, 72(11–12), 1225–1229. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1763-y>

- Tamaki, S. J., Jacobs, Y., Dohse, M., Capela, A., Cooper, J. D., Reitsma, M., He, D., Tushinski, R., Belichenko, P. V., Salehi, A., Mobley, W., Gage, F. H., Huhn, S., Tsukamoto, A. S., Weissman, I. L., & Uchida, N. (2009). Neuroprotection of Host Cells by Human Central Nervous System Stem Cells in a Mouse Model of Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *Cell Stem Cell*, 5(3), 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.022>
- Thermann, R., Neu-Yilik, G., Deters, A., Frede, U., Wehr, K., Hagemeyer, C., Hentze, M. W., & Kulozik, A. E. (1998). Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO Journal*, 17(12), 3484–3494. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3484>
- Torii, H., Yoshida, K., & Tsukamoto, T. (1985). Metabolic fate of amoxanox (AA-673), a new antiallergic agent, in rats, mice, guinea-pigs and dogs. *Japanese Pharmacology & Therapeutics*, 13, 4933–4954.
- Uma Maheswari, T. N., & Shanmugasundaram, P. (2013). Amlexanox in treatment of aphthous ulcers: A systematic review. *Journal of Pharmacy Research*, 6(1), 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2012.11.033>
- Valenzano, K. J., Khanna, R., Powe, A. C., Boyd, R., Lee, G., Flanagan, J. J., & Benjamin, E. R. (2011). Identification and Characterization of Pharmacological Chaperones to Correct Enzyme Deficiencies in Lysosomal Storage Disorders. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 9(3), 213–235. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0370>
- Vines, D. J., & Warburton, M. J. (1999). Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I. *FEBS Letters*, 443(2), 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01683-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01683-4)
- Vuillemenot, B. R., Kennedy, D., Cooper, J. D., Wong, A. M. S., Sri, S., Doeleman, T., Katz, M. L., Coates, J. R., Johnson, G. C., Reed, R. P., Adams, E. L., Butt, M. T., Musson, D. G., Henshaw, J., Keve, S., Cahayag, R., Tsuruda, L. S., & O'Neill, C. A. (2015). Nonclinical evaluation of CNS-administered TPP1 enzyme replacement in canine CLN2 neuronal ceroid lipofuscinosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 114(2), 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.09.004>
- Wagner, K. R., Hamed, S., Hadley, D. W., Gropman, A. L., Burstein, A. H., Escolar, D. M., Hoffman, E. P., & Fischbeck, K. H. (2001). Gentamicin Treatment of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Due to Nonsense Mutations. *Annals of Neurology*, 49, 706–711.
- Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C. R., Hwang, S., Wilde, R. G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y. C., Corson, D., Turpoff, A. A., ... Sweeney, H. L. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447(7140), 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature05756>
- Wilschanski, M., Miller, L. L., Shoseyov, D., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Cohen, M., Armoni, S., Yaakov, Y., Pugatch, T., Cohen-Cymberek, M., Miller, N. L., Reha, A., Northcutt, V. J., Hirawat, S., Donnelly, K., Elfring, G. L., Ajayi, T., & Kerem, E. (2011). Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 38(1), 59–69. <https://doi.org/10.1183/09031936.00120910>
- Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebock, Z., Shushi, L., Kerem, B., & Kerem, E. (2003). Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *New England Journal of Medicine*, 349(15), 1433–1441. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022170>
- Wong, A. M. S., Rahim, A. A., Waddington, S. N., & Cooper, J. D. (2010). Current therapies for the soluble lysosomal forms of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1484–1488. <https://doi.org/10.1042/BST0381484>

- Worgall, S., Sondhi, D., Hackett, N. R., Kosofsky, B., Kekatpure, M. V., Neyzi, N., Dyke, J. P., Ballon, D., Heier, L., Greenwald, B. M., Christos, P., Mazumdar, M., Souweidane, M. M., Kaplitt, M. G., & Crystal, R. G. (2008). Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Human Gene Therapy*, *19*(5), 463–474. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.022>
- Xu, M., Motabar, O., Ferrer, M., Marugan, J. J., Zheng, W., & Ottinger, E. A. (2016). Disease models for the development of therapies for lysosomal storage diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1371*(1), 15–29. <https://doi.org/10.1111/nyas.13052>
- Zeman, W., & Donahue, S. (1963). Fine structure of the lipid bodies in juvenile amaurotic idiocy. *Acta Neuropathologica*, *3*(2), 144–149. <https://doi.org/10.1007/BF00687063>

## **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



## **Danksagung**

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ritva Tikkanen für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit, für die Bereitstellung aller für die Arbeit benötigten Materialien, sowie für die ausgezeichnete Betreuung.

Ganz herzlich danke ich auch Dr. Antje Banning, Petra Janson und Ralf Füllkrug, die mich bei der Durchführung meiner Versuche mit grenzenloser Geduld und Hilfsbereitschaft unterstützt haben.

Ich danke zudem ganz besonders meinen Eltern und Großeltern, die mich sowohl während des gesamten Studiums, als auch während der Dissertation unterstützt haben, wo sie nur konnten. Danke, dass ich mich immer und in jeder Situation auf euch verlassen kann.



## **Lebenslauf**

*Dieser Inhalt wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.*