

Charakterisierung von Aspartylglukosaminurie-Varianten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Godany, Halen

aus Duhok

Gießen, 2022

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachterin: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Gutachterin: Prof. Dr. Daniela Steinberger

Tag der Disputation: 15.09.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Lysosomen	1
1.2	Lysosomale Speicherkrankheiten (LSK)	2
1.3	Aspartylglukosaminurie (AGU).....	3
1.3.1	Prävalenz und Inzidenz	3
1.3.2	AGU-Pathogenese und Symptomatik.....	4
1.3.3	Diagnose von Aspartylglukosaminurie.....	5
1.4	Aspartylglukosaminidase (AGA).....	6
1.4.1	Struktur von AGA.....	6
1.4.2	AGA-cDNA und –Gen	7
1.4.3	Autokatalytische Aktivierung von AGA	7
1.5	AGU-Mutationen	9
1.5.1	AGU-FIN-major- und -minor–Mutationen.....	9
1.5.2	Weitere AGU-Mutationen	11
1.6	Therapieansätze.....	12
1.7	Ziele der Arbeit	13
2	Materialien	15
2.1	Materialien und Geräte.....	15
2.2	Chemikalien und Puffer	17
2.3	SDS-Polyacrylamidgele	21
2.4	Kits und Säulen	22
2.5	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	23
2.6	Plasmide	23
2.7	Primer.....	24

2.8	Humane Zelllinien und Bakterienstämme.....	25
3	Methoden	27
3.1	Zellbiologische Methoden.....	27
3.1.1	Kultivierung von HEK- und HEK-Flp-In-Zellen	27
3.1.2	Passagieren von HEK- und HEK-Flp-In-Zellen	27
3.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
3.1.4	Zellzählung der in vitro kultivierten Zellen	28
3.1.5	CRISPR/Cas9-vermittelter Knockout von AGA in HEK-Flp-In-Zellen	28
3.1.6	Einzelzellklonierung der HEK-Flp-In-AGA-Knockout-Zellen	29
3.1.7	Transiente Transfektion von HEK-AGA-Knockout-Zellen	29
3.1.8	Stabile Transfektion von HEK-Flp-In-AGA-Knockout-Zellen	30
3.1.9	Zeocin-Selektion der HEK-Flp-In-Zellen.....	32
3.1.10	Lysotrackermarkierung in HEK-Flp-In-Zellen.....	32
3.1.11	Quantifizierung der Fluoreszenz nach Lysotrackerfärbung	33
3.2	Molekularbiologische Standardmethoden.....	33
3.2.1	RNA-Extraktion aus Fibroblasten	33
3.2.2	Reverse Transkription.....	34
3.2.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	34
3.2.4	Restriktionsspaltung von Vektor und Inserts	35
3.2.5	Gelelektrophorese und Extraktion der Plasmid-DNA	35
3.2.6	Ligation.....	36
3.2.7	Transformation.....	36
3.2.8	Plasmidpräparation (Mini).....	36
3.2.9	DNA/RNA-Konzentrationsmessung.....	37
3.2.10	Anfertigung von Glycerolstocks	37
3.2.11	Mutagenese	38
3.2.12	Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford	39
3.2.13	Zelllysatherstellung aus Fibroblasten, HEK- und HEK-Flp-In-Zellen.....	39
3.2.14	SDS-PAGE	39

3.2.15	Western Blot	40
3.2.16	Immundetektion	40
3.2.17	Strippen	41
3.2.18	Immunfluoreszenzmessung der HEK-Flp-In-Zellen	41
3.3	Aktivitätsassay	42
3.3.1	Fluorometrischer AGA-Aktivitätsassay (Mononen et al. 1993b; Voznyi et al. 1993)	42
3.3.2	Beta-Galactosidase-Aktivitätsassay	43
3.4	Statistik	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Sequenzierung der AGU-L126V-Patienten-DNA	44
4.2	Mutagenese der AGA-L126V-Variante in das pCDNA3-Plasmid	44
4.3	Generierung von AGA-KO-Flp-In-Zellen	45
4.4	Lysotrackermarkierung in behandelten HEK-Flp-In-Zellen	48
4.5	Expression von AGA-Varianten in AGA-KO-HEK-In-Zellen	50
4.5.1	Transiente Expression des AGA-L126V-pcDNA3-Konstruktes in AGA-KO-Zellen	50
4.5.2	Transiente Expression von AGA-pcDNA5/FRT-Konstrukten in AGA-KO-Zellen	53
4.6	Generierung und Charakterisierung der AGA-HEK-Flp-In-Zellen	55
4.7	Expression von AGA-Varianten in stabil transfizierten AGA-KO-Flp-In-Zellen	59
4.8	AGA-Aktivitätsmessungen	61
4.8.1	AGA-Aktivitätsmessung in L126V-Patientenfibroblasten	62
4.8.2	AGA-Aktivitätsmessung in L126V-Patientenserum	63
5	Diskussion	65
5.1	Etablierung eines AGU-Zellmodells mithilfe des Flp/FRT-Systems	65
5.2	Charakterisierung der AGU-L126V-Mutation	70
5.3	Ausblick	74
6	Summary	75

7	Zusammenfassung.....	76
8	Abkürzungsverzeichnis.....	77
9	Abbildungsverzeichnis.....	79
10	Tabellenverzeichnis	81
11	Literaturhinweise	82
	Erklärung zur Dissertation	95
	Danksagung.....	96

1 Einleitung

1.1 Lysosomen

Lysosomen, erstmalig entdeckt von Christian De Duve im Jahre 1955, sind membranumschlossene Organellen in eukaryotischen Zellen (Duve et al. 1955). Die ubiquitär vorkommenden Zellorganellen sind von einer Lipid-Doppelmembran umgeben, die das saure Lumen vom Zytosol abtrennt (Schulze et al. 2009). Charakterisiert werden die vesikulären Zellorganellen durch eine Vielzahl von hydrolysierenden Enzymen, welche essentiell für deren Funktion sind (Bainton 1981).

Funktionell dienen Lysosomen unter anderem als terminale Abbau-Kompartimente der Zellen, in denen zelleigene Makromoleküle, darunter zum Beispiel Proteine, Fettsäuren und Nukleinsäuren, durch lysosomale Enzyme degradiert werden (Duve et al. 1955). Nach neueren Erkenntnissen beteiligen sich Lysosomen zudem sowohl an zellulären Signalwegen und der Plasmamembranreparatur als auch im Energiemetabolismus (Saftig und Klumperman 2009; Settembre et al. 2013). Durch Phagozytose oder Endozytose können extrazelluläre Abbauprodukte aufgenommen werden und dadurch das Lysosom erreichen (Luzio et al. 2014; Saftig und Klumperman 2009). Der Transport von intrazellulären Makromolekülen in das Lysosom erfolgt durch Autophagie (Kaushik und Cuervo 2012). Des Weiteren enthält die lysosomale Membran eine Vielzahl an Membranproteinen, die abgebaute Produkte zurück ins Zytosol transportieren, um der Zelle die Möglichkeit zu geben, neue Makromoleküle aufzubauen (Saftig und Klumperman 2009).

Zu den lysosomalen Proteinen zählen bisher mehr als 60 Hydrolasen und Enzyme, die in ihrer Gesamtheit für die Degradations- und Recyclingfunktion der Lysosomen zuständig sind (Xu und Ren 2015). Der niedrige pH-Wert (4,6-5,0) des Lumens ist notwendig, um die Funktionalität der lysosomalen Enzyme zu ermöglichen, da diese in der Regel ihr Aktivitätsoptimum im sauren Milieu (pH-Wert < 5) erreichen (Lloyd und Forster 1986). Die Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes wird durch eine membranständige ATP-abhängige Protonenpumpe ermöglicht (Cuppoletti et al. 1987). Mutationen in lysosomalen Genen können zu einer Beeinträchtigung des codierten Proteins und dessen

Funktion führen. Die daraus resultierenden lysosomalen Fehlfunktionen und der beeinträchtigte Substratabbau führen zu zellulärer Dysfunktion und häufig zum Zelltod (Parkinson-Lawrence et al. 2010; Platt et al. 2018).

1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten (LSK)

Zu der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten (LSK) gehören über 70 erblich bedingte Störungen des lysosomalen Metabolismus (Platt et al. 2018). Lysosomale Speicherkrankheiten werden durch eine Mutation von hydrolytischen Enzymen, nicht-enzymatischen lysosomalen Proteinen oder nicht-lysosomalen Proteinen, die an der lysosomalen Biogenese beteiligt sind, verursacht (Filocamo und Morrone 2011). Größtenteils werden diese monogenetischen Störungen autosomal-rezessiv vererbt, jedoch sind auch X-chromosomal bedingte lysosomale Mutationen bekannt (Platt et al. 2018).

Die pathogenen Varianten führen zu einer Störung des Substratabbaus und einer sukzessiven Akkumulation von nicht oder nur teilweise abgebautem Substrat in den Lysosomen (Parkinson-Lawrence et al. 2010; Platt et al. 2018). Die Anreicherung von Makromolekülen in den Lysosomen kann zu sekundären Störungen weiterer biochemischer und zellulärer Funktionen führen und die schwere Pathologie von lysosomalen Störungen begründen (Vellodi 2005). Bei den akkumulierenden Makromolekülen kann es sich unter anderem um Glykoproteine oder Lipide, wie etwa Glykolipide und Sphingolipide, handeln (Ciechanover 2012; Jurkat 2019). Das spezifische, nicht abgebaute Substrat kann charakteristisch für die jeweilige lysosomale Speicherkrankheit sein. Zudem sind auch Fälle bekannt, bei der es zu einer Anreicherung von Sekundärspeichermetaboliten kommt (Walkley 2004).

Die Gesamthäufigkeit von lysosomalen Stoffwechselerkrankungen liegt schätzungsweise bei 1 zu 5000 Lebendgeburten (Mehta et al. 2006). Zu den am häufigsten auftretenden lysosomalen Speicherkrankheiten gehört Morbus Gaucher mit einer Prävalenz von ungefähr 1 zu 40 000 (Mehta 2006).

Häufig treten lysosomale Störungen als pädiatrische, neurodegenerative Erkrankungen auf, welche unter anderem von Entwicklungsstörungen, Dysmorphien, Viszeromegalie oder muskuloskelettalen Abnormalitäten begleitet sein können (Kingma et al. 2015).

Oft ist ein progressiver und multisystemischer Verlauf zu beobachten (Vellodi 2005). Da durch die Erkrankung auch periphere Organe und Gewebe betroffen sind, führt der Großteil der lysosomalen Störungen zu chronischen Folgeerkrankungen (Pastores et al. 2013). Zum Zeitpunkt der Geburt scheinen die Betroffenen gesund, jedoch sind auch Ausnahmen vorhanden. Im Fall von Mukopolysaccharidosen ist sowohl das Skelett als auch die extrazelluläre Matrix der Erkrankten betroffen (Jurkat 2019; Wraith 2002). Durch die Seltenheit und die unterschiedliche Manifestation der lysosomalen Störungen ist deren Diagnose schwierig (Kingma et al. 2015). Durch die verspätete Diagnose werden oftmals keine Maßnahmen zur genetischen Beratung bei der Familienplanung getroffen, sodass mehrere Mitglieder einer Familie mit derselben lysosomalen Störung geboren werden (Jurkat 2019; Kingma et al. 2015).

1.3 Aspartylglukosaminurie (AGU)

Aspartylglukosaminurie (AGU) bezeichnet eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die durch eine Störung des Glykoproteinabbaus gekennzeichnet ist. Der gestörte Glykoproteinabbau wird durch eine Mutation des *AGA*-Gens bedingt, welche zu einer mangelnden Aspartylglukosaminidase-Aktivität führt. Erstmalig wurde die Erkrankung im Jahre 1968 anhand zweier britischer Geschwister durch den Nachweis einer erhöhten Ausscheidung von Aspartylglukosamin im Urin beschrieben (Arvio und Mononen 2016; Pollitt et al. 1968). Zur selben Zeit wurden in Finnland im Rahmen einer Screening-Studie von 2177 geistig behinderten Individuen, elf Patienten mit ähnlicher klinischer Symptomatik und einer erhöhten Ausscheidung von Asparaginsäure im Urin identifiziert (Arvio und Mononen 2016; Palo 1967).

1.3.1 Prävalenz und Inzidenz

Mit einer Prävalenz von 1,7-5 von 100.000 Lebendgeburten in Finnland zählt AGU zu den finnischen Erbkrankheiten (Finnish Disease Heritage) (Arvio et al. 2002; Arvio und Mononen 2016; Mononen et al. 1993a; Peltonen 1997). Jährlich werden 1-3 Kinder mit Aspartylglukosaminurie in Finnland geboren. Es sind schätzungsweise 260 Patienten in Finnland betroffen, davon sind 160 am Leben (Arvio und Mononen 2016). Weltweit sind 200-300 lebende AGU-Patienten bekannt. Die steigende Anzahl der AGU-Betroffenen deutet darauf hin, dass die Erkrankung möglicherweise unterdiagnostiziert ist.

Bei 98% der finnischen AGU-Patienten wird die Erkrankung durch eine Punktmutation im AGA-Gen bedingt (s. 1.5.1) (Arvio und Mononen 2016). Es wird davon ausgegangen, dass 1 von 50-60 Individuen in Finnland Träger dieser Mutation ist (Hietala et al. 1993; Kallinen et al. 2001).

1.3.2 AGU-Pathogenese und Symptomatik

Die Mutation des AGA-Gens führt zu einer reduzierten Aspartylglukosaminidase-Aktivität, welche zu einer Akkumulation von Glykoasparaginen in den Lysosomen der Zellen führt (Haltia et al. 1975). Bereits nach dem 2.- 3. Lebensjahr sind phänotypisch Symptome zu erkennen (Laitinen et al. 1997).

AGU ist eine progressive, generalisierte neurodegenerative lysosomale Speicherkrankheit charakterisiert durch Entwicklungsverzögerung, psychomotorische Regression, geistige Entwicklungsstörung, Gangstörungen und verkürzter Lebenserwartung (Arvio et al. 1997; Arvio et al. 1999a; Arvio et al. 2002). Zwar variiert die Progressionsgeschwindigkeit der Erkrankung zwischen den einzelnen Patienten, jedoch ist ein langsames Fortschreiten bei Frauen zu beobachten. Zum Zeitpunkt der Geburt weisen erkrankte Kinder keine pathologischen Veränderungen auf (Arvio und Mononen 2016). Zu den ersten Anzeichen von AGU zählen ein infantiler Wachstumsschub, ein vergrößerter Kopfumfang und das gehäufte Auftreten von Hernien und Atemwegsinfektionen. Betroffene Kinder leiden unter anderem an einer verspäteten Sprachentwicklung und einer verschlechterten motorischen Koordination (Arvio et al. 1993a; Arvio et al. 1999b; Arvio und Mononen 2016). In Finnland wird die klinische Diagnose von Aspartylglukosaminurie durchschnittlich im Alter von fünf Jahren gestellt. Aufgrund des progressiven Verlaufs der lysosomalen Speicherkrankheit verschlechtert sich der geistige und körperliche Zustand der Patienten bis hin zu einer geistigen Entwicklungsstörung vom mittleren bis schweren Behinderungsgrad im Erwachsenenalter. Es können drei Phasen der Entwicklung bei Betroffenen unterschieden werden. Beginnend mit der ersten Periode, welche sich durch eine ungewöhnlich langsame, dennoch positive Entwicklungsphase bis zum 7. – 10. Lebensjahr kennzeichnet (Arvio et al. 1993a; Arvio und Mononen 2016; Harjunen et al. 2020). Anschließend folgt eine stabile Phase charakterisiert durch einen langsamen Rückgang

bis zum Alter von 25 bis 28 Jahren. Nach dem 30. Lebensjahr verschlechtert sich der Zustand der AGU-Patienten rapide (Arvio 1993; Arvio und Mononen 2016).

Häufig treten Bindegewebsdefekte auf, und die Patienten leiden unter chronisch entzündlicher Arthritis (Arvio et al. 1998a). Sowohl das Aussehen und die Körperstatur als auch die Persönlichkeit der Betroffenen sind kennzeichnend für die lysosomale Störung (Arvio et al. 2004). Jeder dritte AGU-Patient leidet unter periodischen, epileptischen Anfällen und ein Fünftel der Betroffenen ist an einer psychischen Störung erkrankt (Ambrosetto und Santucci 2009; Arvio et al. 1993b; Lindblom et al. 2006). Zu den charakteristischen Gesichtsmerkmalen von AGU-Patienten gehört unter anderem ein abnormal vergrößerter Abstand zwischen den Augen (Hypertelorismus), geschwollene Augenlider, ein verkürzter Nasenrücken, voluminöse Lippen und ein breites Gesicht (Arvio et al. 2004). Die orale Gesundheit der erwachsenen Patienten ist beeinträchtigt. Gingivitis, Zahnfleischhyperplasien und odontogene Tumore, assoziiert mit verfrühtem Zahnverlust und Kiefer- und Dentalfehlstellungen treten gehäuft auf (Arvio et al. 1997; Arvio et al. 1998b). Es sind Knochenabnormalien, wie verdickte, unförmige Rippen bei den Betroffenen zu beobachten. Die lysosomale Speicherkrankheit weist einen charakteristischen MRT-Befund auf. Mit steigendem Alter verliert der Patient Gehirnzellen und der Kopfumfang schrumpft (Arvio et al. 2005; Tokola et al. 2015). Die durchschnittliche Lebenserwartung von AGU-Patienten liegt zwischen 45 und 50 Jahren. Häufig sterben die Betroffenen an bakteriellen Infektionen, größtenteils pulmonalen Infektionen (Arvio und Mononen 2016).

1.3.3 Diagnose von Aspartylglukosaminurie

Zur Diagnose von AGU stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Durch die Untersuchung von Oligosacchariden im Urin der Patienten kann biochemisch die Diagnose gestellt werden (Mononen et al. 1988b; Sewell 1981; Xia et al. 2013). Eine weitere biochemische diagnostische Methode ist die Bestimmung der Aspartylglukosaminidase-Aktivität. Nach dem Nachweis von angehäuften Aspartylglukosamin (Kaartinen und Mononen 1989; Mononen et al. 1986) und anderen Glykoasparaginen im Urin, folgt die Messung der AGA-Aktivität im Serum, in Leukozyten oder in Fibroblasten der Patienten (Kaartinen und Mononen 1990; Mononen et al. 1994). Zur pränatalen Diagnose von AGU ist es möglich ein Enzymtest im kultivierten Fruchtwasserzellen oder in einer Chorionzottenbiopsie durchzuführen

(Aula et al. 1984; Aula et al. 1989; Jurkat 2019). Zudem kann eine direkte Untersuchung im Fruchtwasser erfolgen, jedoch wird diese diagnostische Methode als nicht verlässlich angesehen (Jurkat 2019; Mononen et al. 1988a). Zudem werden DNA-Tests zur Diagnose herangezogen. Durch die Rarität der lysosomalen Erkrankung besteht jedoch in vielen Gebieten kein Zugriff zu Screening-Systemen, wie im Fall von MALDI-TOF/ TOF MS. Über diese Methode lassen sich lysosomale Störungen durch den Nachweis von freien Oligosacchariden und Aspartylglukosamin im Urin erkennen (Jurkat 2019; Xia et al. 2013; Yamamoto et al. 2017). Desweiteren ist zu bemerken, dass die genaue Bestimmung der Mutation durch DNA-Tests besonders wichtig ist, da die verschiedenen Varianten auch unterschiedlich auf mögliche Therapieansätze ansprechen können (Banning et al. 2016; Jurkat 2019).

1.4 Aspartylglukosaminidase (AGA)

Das Enzym Aspartylglukosaminidase (AGA, 1-aspartamido-beta-N-acetylglucosamine amidohydrolase) ist eine lysosomale Glykoasparaginase, welches zur Familie der N-terminalen, nukleophilen Hydrolasen gehört (Oinonen et al. 1995; Tikkanen et al. 1996). Das AGA-Enzym ist am Glykoproteinabbau beteiligt, indem es die N-glykosidische Bindung zwischen L-Asparagin und N-Acetylglukosamin hydrolysiert (Mononen et al. 1993a). Eine Störung des Enzyms oder ein Mangel an AGA führt zu einem unzureichenden Abbau von N-glykosylierten Glykoproteinen, welches sich als lysosomale Speicherkrankheit Aspartylglukosaminurie äußert (Pollitt et al. 1968). Durch die fehlende AGA-Aktivität kommt es zu einer Ansammlung von nicht abgebautem Aspartylglukosamin und anderen Glykokonjugaten mit einem L-Asparaginrest in Geweben und Körperflüssigkeiten von Betroffenen (Jurkat 2019; Mononen et al. 1993a).

1.4.1 Struktur von AGA

Die Bestimmung der dreidimensionalen Kristallstruktur des humanen AGAs wurde mit 2.0 Å Auflösung untersucht (Oinonen et al. 1995). Das ausgereifte Enzym ist ein Heterotetramer aus jeweils zwei α -Untereinheiten und zwei β -Untereinheiten, welche heterogen glykosyliert sind (Saarela et al. 1998; Tikkanen et al. 1996). Aktiviertes AGA besitzt zwei katalytische Bereiche auf den entgegengesetzten Seiten des Moleküls (Kaartinen et al. 1991; Oinonen et al. 1995). Zudem enthält das AGA-Protein vier

intramolekulare Disulfidbrücken. Pro Untereinheit liegen zwei Disulfidbrücken vor (Cys64[^]Cys69; Cys163[^]Cys179; Cys286[^]Cys306; Cys317[^]Cys345). Das Molekül besitzt zwei äußerst ähnliche heterodimere $\alpha\beta$ -Domänen, dessen Kern eine $\alpha\beta\alpha$ -Sandwichstruktur aufweist. In dieser Struktur liegen antiparallel β -Ketten zwischen α -Helices (Riikonen et al. 1996). Zwischen den Alpha- und Beta-Untereinheiten oder den zwei Heterodimeren des AGA-Moleküls sind keine Disulfidbrücken vorhanden (Oinonen et al. 1995). Das für die Katalyse substanzielle N-terminale Threonin der β -Kette befindet sich in der tiefen Tasche des trichterförmigen aktiven Zentrums (Riikonen et al. 1996; Tikkanen et al. 1996). Die Erkenntnisse über die dreidimensionale Struktur erlaubten eine Voraussage der strukturellen Auswirkungen von Mutationen, die bei AGU vorkommen können (Oinonen et al. 1995).

1.4.2 AGA-cDNA und –Gen

Das AGA-Gen befindet sich in der Chromosomenregion 4q32-q33 und hat eine Gesamtlänge von 10.688 bp (Grön et al. 1990; Morris et al. 1992; Park et al. 1991). In evolutionärer Hinsicht ist das AGA-Gen hochkonserviert (Liu et al. 1996). Es besteht aus insgesamt neun Exons, die von Introns getrennt werden. Während das Exon 1 das Startcodon beinhaltet, weist Exon 9 das Terminationscodon und eine lange untranslatierte Sequenz mit drei Polyadenylierungssignalen auf (Ikonen et al. 1991b). Die cDNA der Aspartylglucosaminidase umfasst 1.041 bp, und 346 Aminosäuren kodieren für das Protein. Das Signalpeptid wird von 23 N-terminalen Aminosäuren gebildet. Die Molekülmasse des signalpeptidfreien Proteins (Ser24-Ile346) beträgt 34,6 kDa (Fisher et al. 1990; Ikonen et al. 1993).

1.4.3 Autokatalytische Aktivierung von AGA

Nachdem AGA als enzymatisch inaktives Vorläufer-Polypeptid synthetisiert wurde, folgt im endoplasmatischen Retikulum direkt post-translational eine Spaltung in eine Alpha- und Beta-Untereinheit (Ikonen et al. 1993; Riikonen et al. 1996). Die Dimerisierung von zwei inaktiven AGA-Vorläufermolekülen leitet die autoproteolytische Aktivierung, welche kurz vor dem Ende der Faltung und im Verlauf der frühen Phase der Faltung stattfindet, ein (Riikonen et al. 1996). Die zwei gebildeten Untereinheiten umfassen eine Pro- α -Untereinheit mit 27 kDa und eine β -Untereinheit mit 17 kDa.

Durch die C-terminale-Prozessierung wird das inaktive AGA-Vorläufermolekül in eine reife α -Untereinheit mit 24 kDa und β' -Untereinheiten mit 14 kDa gespalten (s. Abbildung 1). Die proteolytische Prozessierung findet in den Lysosomen statt, in welche der aktive Enzymkomplex vorher transportiert wird (Ikonen et al. 1993). Die Seitenkette und die freie α -Aminogruppe von Thr206 sind wesentlich für die katalytische Aktivität von AGA (Saarela et al. 1998; Tikkanen et al. 1996). Durch die freie α -Aminogruppe am N-Terminus der 17 kDa Untereinheit, wird AGA aktiviert, indem die Nucleophilie des Alkohol-Sauerstoffs von Thr206 gesteigert wird (Oinonen et al. 1995; Tikkanen et al. 1996). Dieses Ereignis bewirkt die kovalente Bindung des Carbonyl-Kohlenstoffes des Glykoasparagin-Substrates (Oinonen et al. 1995).

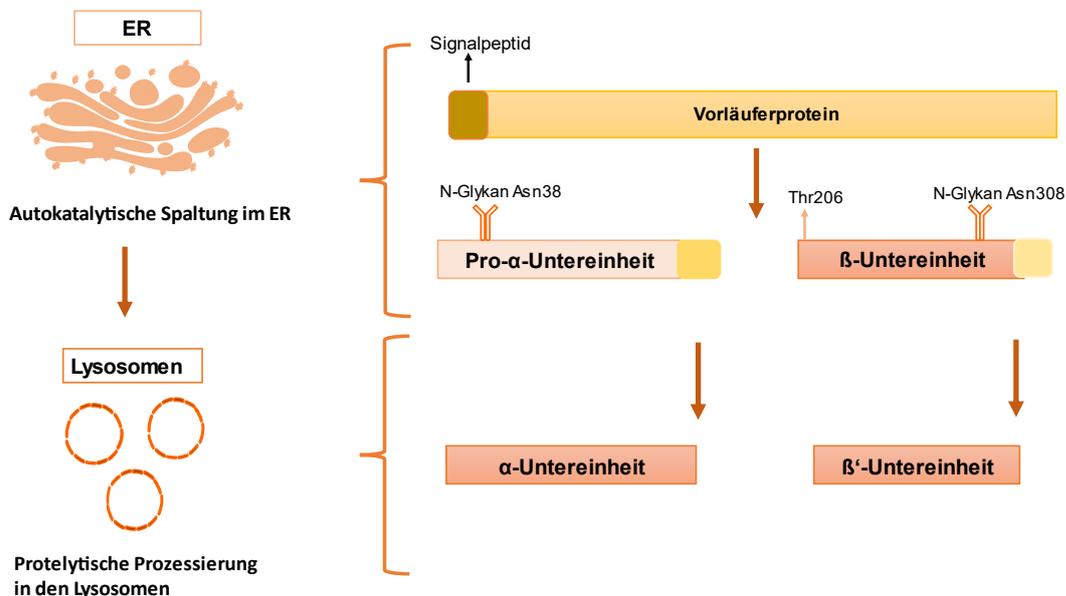


Abbildung 1: „Prozessierung und Aktivierung von Aspartylglucosaminidase (AGA)“ modifiziert nach (Banning et al. 2017): AGA wird als Vorläufermolekül im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Das Signalpeptid wird dabei entfernt. Im endoplasmatischen Retikulum bilden zwei Vorläufermoleküle kurz nach der Synthese ein Homodimer. Durch eine autokatalytische Spaltung zwischen Asp205 und Thr206 wird das Homodimer in zwei Pro- α -Untereinheiten mit 27 kDa und zwei β -Untereinheiten mit 17 kDa prozessiert. Nach dem Transport in die Lysosomen wird die Pro- α -Untereinheit durch C-terminale Trimmung in eine 24 kDa reife α -Untereinheit gespalten, während die β -Untereinheit zur einer 14 kDa β' -Untereinheit prozessiert wird. Das Molekül besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen.

1.5 AGU-Mutationen

Mutationen in Genen, die genetische Informationen für funktionelle Domänen menschlicher Proteine enthalten, führen zu humangenetischen Erkrankungen. Die Sichelzellanämie lieferte den Nachweis, dass die Änderung einer einzelnen Base gravierende Folgen für das kodierende Protein haben kann (Ingram 1956). Seitdem wurden mehr spezifische Mutationen für Erbkrankheiten identifiziert, wobei nur ein Bruchteil der Basenaustausche zu einer Beeinträchtigung der Struktur oder dem zellulären Metabolismus des kodierenden Proteins führen (Saarela et al. 2001).

AGA ist ein multimeres Molekül, das funktionell äußerst empfindlich auf den Austausch von Aminosäuren reagiert. Die Bildung des aktiven Moleküls setzt eine korrekte Faltung des Proteins im endoplasmatischen Retikulum voraus, damit die Oligomerisierung mit anschließender autokatalytischer Aktivierung des Moleküls erfolgen kann. Zudem bestimmt die dreidimensionale Molekülstruktur im Golgi-Apparat, ob eine Phosphorylierung von Mannose-6-Phosphat und ein Transport von AGA in die Lysosomen erfolgen soll (Saarela et al. 2001).

Bisher sind über 30 verschiedene Mutationen des AGA-Gens beschrieben. Dabei kann es sich bei den AGU-Mutationen um Insertionen, Substitutionen, Deletionen, Missense-, Nonsense- und Splicing-Mutationen handeln. Es können ebenso Kombination dieser Mutationen auftreten (Saarela et al. 2001).

1.5.1 AGU-FIN-major- und -minor-Mutationen

Bei der Untersuchung der finnischen AGU-Patienten wurden homozygot zwei Punktmutationen (c.482G>A und c.488C>G) in der cDNA von AGA identifiziert (Fisher et al. 1990; Ikonen et al. 1991b; Mononen et al. 1991). Die erste Basenänderung resultiert in einem Austausch von Arginin mit Glutamin (R161Q), während die zweite Veränderung zu einem Cystein-Serin Austausch (C163S) führt (Arvio und Mononen 2016). Ortsgerichtete Mutagenese und Studien zur Expression in COS-Zellen haben nachgewiesen, dass nur die Cystein-Serin-Substitution (C163S) den Mangel an AGA-Aktivität verursacht (Fisher und Aronson 1991; Ikonen et al. 1991b; Ikonen et al. 1991a). Die Mutation befindet sich im C-terminalen Ende der α -Untereinheit des AGA-Enzyms (Mononen et al. 1991). Die α -Untereinheiten bilden C-terminale Loops, welche als AGU-Fin-Loops beschrieben werden (Oinonen et al. 1995). Die Missense-Mutation

zerstört eine Disulfidbrücke und führt zu Konformationsänderungen des inaktiven Vorläuferenzym, sodass seine Spaltung in Untereinheiten und somit die Wandlung in ein aktives Enzymprotein erschwert wird (McCormack et al. 1995; Riikonen et al. 1996; Sui et al. 2014).

Durch DNA-Tests wird in Finnland sowohl die Diagnose von AGU-Fin-major - sowie -minor-Mutationen gestellt als auch Träger der Mutationen identifiziert (Delahunty et al. 1995; Fisher et al. 1990; Hietala et al. 1996; Ikonen et al. 1991b; Isoniemi et al. 1995; Mononen et al. 1991). Das Screening von 115 finnischen AGU-Patienten zeigte, dass 98% der Studienteilnehmer homozygote Träger der zwei Nukleotid-Änderungen (G482A und G488C) waren (Syvanen et al. 1992). Diese sogenannte AGU-FIN-major-Mutation ist das Ergebnis eines Gründer-Effekts und zeigt eine hohe molekulare Homogenität der AGU-Allele in der finnischen Bevölkerung (Arvio und Mononen 2016). Es wird davon ausgegangen, dass die Trägerfrequenz des AGU-FIN-major-Gens 1 von 50-60 Individuen in Finnland beträgt (Hietala et al. 1993; Kallinen et al. 2001). Höchstwahrscheinlich ist ein lokaler Faltungsdefekt das Kernproblem der AGU-FIN-major-Patienten, wobei es weder zu einer erheblichen Destabilisierung noch zu einer Degradation des Proteins kommt. Es wurde nachgewiesen, dass AGU-Fin-mutiertes AGA größtenteils in den Lysosomen vorliegt (Banning et al. 2016). Lediglich eine geringe Ansammlung des Enzyms kommt im endoplasmatischen Retikulum und im trans-Golgi-Netzwerk vor. Der lysosomale Transport hängt von der Struktur des zu transportierenden Proteins ab. Deshalb kann angenommen werden, dass die beschriebene Variante die Enzymstruktur nicht erheblich beeinträchtigt. In den Fibroblasten der Betroffenen ist dennoch eine signifikant verringerte AGA-Aktivität messbar (Banning et al. 2016; Gülec 2017).

Das zweite AGU-verursachende Allel in der finnischen Bevölkerung ist eine Deletion von zwei Basenpaaren im Exon 2 des Gens (AGU-FIN-minor-Mutation), die etwa 1,5% der finnischen Patienten ausmacht (Isoniemi et al. 1995). Die AGU-FIN-minor-Mutation führt zu einem vorzeitigen Stopcodon und somit zu einer drastischen Reduzierung der Transkriptmengen des Enzyms in den Fibroblasten der Patienten. Nach der AGU-FIN-major-Mutation, wird die AGU-FIN-minor-Variante als weltweit zweithäufigste AGU-verursachende-Mutation beschrieben.

1.5.2 Weitere AGU-Mutationen

Neben den beiden oben genannten Varianten sind auch weitere AGU-Mutationen weltweit bekannt. Diese sind häufig familienspezifisch, führen jedoch größtenteils zu einer deutlichen Beeinträchtigung oder Inaktivierung des AGA-Enzyms. Bei den bisher mehr als 30 bekannten Mutation ist der Phänotyp der AGU-Patienten, trotz der unterschiedlichen Mutation und deren Lokalisation auf dem AGA-Gen, relativ übereinstimmend (Ikonen et al. 1991a). Die aus der Literatur bekannten Mutationen sind in der Abbildung 2 schematisch dargestellt. Diese umfassen die gesamte AGA-cDNA. Dabei handelt es sich sowohl um Deletionen, Insertionen, Missense- und Nonsense-Mutationen als auch Spleiß-Fehler (Saarela et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird ein besonderes Augenmerk auf eine neuartige Punktmutation gelegt, die an einem sechsjährigen Patienten mit algerischen Wurzeln in der Schweiz diagnostiziert wurde. Bei dieser genannten AGU-Mutation c.376C>G erfolgt der Austausch von Leucin 126 zu Valin (s. Abbildung 2). Das Krankheitsbild der Aspartylglukosaminurie zeigt sich am Patienten in Form von Sprachproblemen und Verhaltensstörungen. Vor der AGU-Diagnosestellung wurde die Symptomatik des Kindes als eine Erkrankung des Autismus-Spektrum interpretiert. Erst nach genauerer Untersuchung wurde eine neue Punktmutation von AGU bestätigt. Der sechsjährige Patient stellt somit den ersten mit AGU diagnostizierten Fall in der Schweiz dar (<https://raretraitswiss.ch/de/,04.04.2021>).

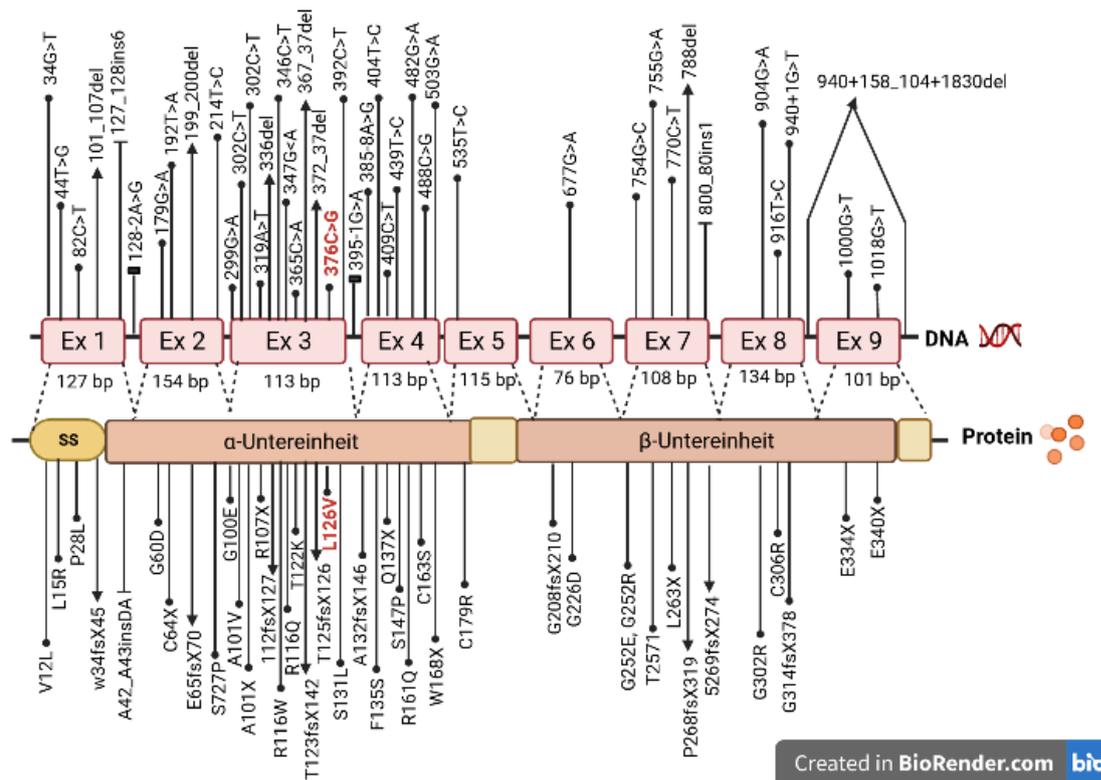


Abbildung 2: Karte der bekannten AGU-Mutationen, aktualisiert und modifiziert nach (Saarela et al. 2001): Basenveränderungen sind über den Exons (abgekürzt mit „Ex“) dargestellt. Die entsprechenden Veränderungen auf Polypeptid-Ebene sind unterhalb des AGA-Vorläuferpeptides (Protein) abgebildet. Substitutionen sind mit einem Punkt versehen, während Deletionen mit Dreiecken gekennzeichnet sind. Insertionen sind mit einem horizontalen Strich vermerkt. Splicing-Mutationen sind mit einem Rechteck versehen und liegen in den Introns (als Linie zwischen den Exons dargestellt). Linien, welche die Bezeichnung der Basenveränderung mit dem Exon verbinden, verweisen auf den Deletionsbereich. Die AGU-Mutation c.376C>G ist in Rot hervorgehoben. Die Abbildung wurde mithilfe von Biorender.com erstellt.

1.6 Therapieansätze

Derzeit gibt es keine zugelassene Therapiemöglichkeit für die Behandlung von Aspartylglukosaminurie, obwohl diverse präklinische Studien, welche eine Enzyersatz- (ERT) oder eine Gentherapie anzielen, veröffentlicht wurden (Dunder et al. 2010; Kelo et al. 2005; Peltola et al. 1998; Virta et al. 2006). Da zu erwarten ist, dass keine dieser Behandlungsoptionen in den nächsten Jahren verfügbar sein werden, besteht ein großer Bedarf an einem alternativen Therapiekonzept für AGU (Banning et al. 2016).

In den letzten Jahren hat sich ein vielversprechendes Therapiekonzept über die Verwendung von pharmakologische Chaperonen (PC) zur Behandlung von AGU entwickelt (Banning et al. 2016). Pharmakologische Chaperonverbindungen sind kleine

Moleküle, die jeweils an das Zielprotein binden und dessen Stabilität erhöhen, wodurch mutierte Proteine ihre biologische Funktion wiedererlangen können (Arakawa et al. 2006; Fan und Ishii 2007). Pharmakologische Chaperone, welche oral verabreicht werden können, wurden auch schon für die Behandlung anderer lysosomaler Speicherkrankheiten, wie zum Beispiel Morbus Gaucher und Morbus Pompe entwickelt (Parenti et al. 2015). Da die meisten AGU-Mutationen keinen direkten Einfluss auf das aktive Zentrum des Enzyms haben, stellt die PC-Therapie eine nicht invasive Behandlungsoption für AGU dar. In einer präklinischen Studie zeigte Betain, zugelassen unter dem Namen Cystadane, als pharmakologisches Chaperon erfolgsversprechende Wirkungen auf Patientenfibroblasten mit den AGU-Mutationen T122K und FIN-major. Zwar ist der molekulare Mechanismus der verstärkenden Wirkung von Betain auf die Enzymaktivität nicht vollständig geklärt, aber es konnte eine Steigerung der AGA-Enzymaktivität für die AGU-FIN-major- und T122K-Mutation bestätigt werden. Des Weiteren konnten sowohl eine Prozessierung des AGA-Vorläuferpolypeptids in seine Untereinheiten als auch eine Verbesserung der Morphologie der Lysosomen nachgewiesen werden (Banning et al. 2016; Gülec 2017). In Finnland wird seit Februar 2018 eine Studie zur Chaperon-vermittelten Therapie durchgeführt, in der die Wirkung von Betain klinisch an 21 AGU-FIN-major-Patienten untersucht wird (EudraCT Nummer: 2017-000645-48).

1.7 Ziele der Arbeit

Um den Einfluss einer Mutation auf das betreffende Protein zu entschlüsseln, bedarf es der Untersuchung verschiedener biologischer Aspekte. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Zellmodell mithilfe eines Knock-In-Systems zu etablieren, um das Spektrum der AGA-Varianten langfristig untersuchen zu können. Die ektope Expression wird häufig für Untersuchungen von humanen Proteinen verwendet. Sie kann durch transiente oder stabile Transfektion von kultivierten Zellen mit einem Plasmid oder Virus erreicht werden. Rekombinase-abhängige Genintegrationsverfahren, wie das in dieser Arbeit verwendete Flp-InTM-System, stellen eine Möglichkeit dar, um stabile Zelllinien mit konstitutiver Expression zu generieren. Besonders in Hinsicht auf die schwierige Verfügbarkeit von Primärzellen der AGU-Patienten bietet das zu generierende Zellmodell einen unkomplizierten Ansatz zur langfristigen funktionellen Validierung

identifizierter Mutationen. Mithilfe des zellulären Modells werden stabile Zelllinien ausgewählter AGA-Varianten generiert und charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit soll insbesondere die neuartige AGU-Variante Leu126Val hinsichtlich der AGA-Prozessierung und Enzymaktivität mittels Western Blot und der fluorometrischen Aktivitätsmessung näher untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Materialien und Geräte

Die nachfolgend aufgeführten Materialien und Geräte wurden für die vorliegende Arbeit verwendet. Die Hersteller sind der Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte mit Hersteller und dessen Niederlassung

Produktname	Hersteller	Niederlassung
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Neolab	Heidelberg (DE)
Blotsystem Criterion™ Blotter	BIO-RAD Laboratories GmbH	München (DE)
CryoPure Röhrchen 1,6 ml	Sarstedt	Nümbrecht (DE)
Deckgläschen (15 mm Durchmesser)	Menzel	Braunschweig (DE)
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa	Düsseldorf (DE)
Filterpapier	Whatman	Dassel (DE)
Frischhaltefolie	Papstar	Kall (DE)
Heizblock HLC	Haep Labor Consult	Bovenden (DE)
Incucell-Inkubator	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH	Planegg (DE)
Konfokales Laserscan Mikroskop Zeiss LSM710	Carl-Zeiss	Jena (DE)
Lichtmikroskop (AE31)	Motic	Wetzlar (DE)
Mikroplatte OptiPlate-96 F schwarz	Perkin Elmer	Baesweiler (DE)
Mikroplattenleser TECAN Infinite M200	TECAN	Crailsheim (DE)
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen (DE)

Neubauer-Zählkammer	Optik- Labor	Bad Homburg (DE)
Nitrocellulose-Membran	Whatman	Dassel (DE)
Objektträger	Roth	Karlsruhe (DE)
PCR-Reaktionsgefäße PP	nerbe plus GmbH	Winsen/Luhe (DE)
Pipetten (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, Multipette plus)	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf (DE)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND	Wertheim (DE)
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht (DE)
Real-Time PCR System CFX Connect™	BIO-RAD Laboratories GmbH	München (DE)
Röntgenfilm Super RX-N	FUJIFILM	Düsseldorf (DE)
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments	Schwabach (DE)
SDS-Gel-Gießkammer GE	Healthcare	München (DE)
SDS-PAGE Kammer GE	Healthcare	München (DE)
Sicherheitswerkbank Scientific	Herasafe™ KS ThermoFisher	Dreieich (DE)
Spannungsquelle EPS 301 GE	Healthcare Life Sciences	München (DE)
Thermozykler Biometra T-Personal Combi	Biometra GmbH	Göttingen (DE)
Ultraschall-Homogenisator SONOPULS GM3100	BANDELIN electronic GmbH & Co.KG	Berlin (DE)
Vortex-Schüttler V-1	PEQLAB	Erlangen (DE)
Waage PB602-S	Mettler Toledo	Gießen (DE)
Western-Blot-System Criterion™ Blotter	BIO-RAD Laboratories GmbH	München (DE)
Wippschüttler (WS-10)	Edmund Bühler GmbH	Hechingen (DE)
Zellkultur-Flaschen	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht (DE)

Zellkulturplatten TC-Platte (6 Well, 12 Well)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht (DE)
Zellkultur-Schalen (6 cm)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht (DE)
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht (DE)
Zentrifuge Heraeus™ Fresco 17	Invitrogen	Dreieich (DE)
Zentrifuge MICRO 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen (DE)
Zentrifuge Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen (DE)
Zentrifugenröhrchen PP (15ml, 50ml) CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen (DE)

2.2 Chemikalien und Puffer

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Puffer sind in Tabelle 2 und 3 zusammengestellt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit dem Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller	Niederlassung
β-Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe (DE)
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth	Karlsruhe (DE)
Agarose	Roth	Karlsruhe (DE)
Ampicillin	Roth	Karlsruhe (DE)
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem	Darmstadt (DE)
Artificial serum/plasma II	Biopanda Diagnostics	Belfast (UK)
BamHI	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
Betain	AppliChem	Karlsruhe (DE)
Bradford Reagenz	BioRad	München (DE)
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe (DE)
Coomassie brilliant blue G-250	AppliChem	Darmstadt (DE)
Cumarinsäure	Sigma Aldrich	Taufkirchen (DE)
CutSmart Buffer	New England Biolabs	Frankfurt a.M. (DE)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) high glucose	Invitrogen	Karlsruhe (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth	Karlsruhe (DE)
DMSO (für die PCR)	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (DE)
DNA-1kb-Ladder	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
dNTPs	Roth	Karlsruhe (DE)
DTT (Dithiothreitol)	AppliChem	Darmstadt (DE)
ECL Western blotting detection reagents	GE Healthcare	München (DE)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem	Darmstadt (DE)
Essigsäure	Roth	Karlsruhe (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid	AppliChem	Darmstadt (DE)
Gelmount Mounting Medium	Biomeda	Foster City, CA (US)
Glycerin	Roth	Karlsruhe (DE)
Hygromycin B-Lösung 50 mg/ml	Roth	Karlsruhe (DE)
Isopropanol	Roth	Karlsruhe (DE)
LB-Medium	Invitrogen	Karlsruhe (DE)
Lysis-Buffer 2x	PJK GmbH	Kleinblittersdorf (DE)
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe (DE)
MACSfectin™ Reagent	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach (DE)
Methanol	Roth	Karlsruhe (DE)
M-MuLV Reverse Transcriptase	New England BioLabs	Frankfurt a. M. (DE)
M-MuLV Reverse Transcriptase Buffer	New England BioLabs	Frankfurt a. M. (DE)
Milchpulver	Roth	Karlsruhe (DE)
Oligo d(T) 18 mRNA Primer	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)

Opti-MEM	Invitrogen	Karlsruhe (DE)
PBS	Invitrogen	Karlsruhe (DE)
Penicillin/Streptomycin	GE Healthcare	München (DE)
PFA (Paraformaldehyd)	Roth	Karlsruhe (DE)
Poly-L-Lysin, 0,01% Lösung	Sigma Aldrich	Taufkirchen (DE)
Ponceau S	AppliChem	Darmstadt (DE)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (DE)
Proteinmarker	BioRad	München (DE)
Puromycin	Life Technologies	Darmstadt (DE)
Q5 ® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
Q5 ® Reaction Buffer	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
RNase Inhibitor Murine	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
D(+)-Saccharose	Roth	Karlsruhe (DE)
Salzsäure	Roth	Karlsruhe (DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Invitrogen	Karlsruhe (DE)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Invitrogen	Dreieich (DE)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Invitrogen	Dreieich (DE)
T4 DNA-Ligase Buffer	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
TEMED	Roth	Karlsruhe (DE)
Trehalose Dihydrat	TCI GmbH	Eschborn (DE)
Tris	AppliChem	Darmstadt (DE)
Tween 20	AppliChem	Darmstadt (DE)
Trypan-Blau-Lösung	Sigma-Aldrich	Taufkirchen (DE)
Trypsin	Invitrogen	Karlsruhe (DE)
Wasserstoffperoxid 30%	Roth	Karlsruhe (DE)
Xho I	New England Biolabs	Frankfurt a. M. (DE)
Zeocin 100 mg/ml	Invitrogen	Dreieich (DE)
Zitronensäure	Merck	Darmstad (DE)

Tabelle 3: Verwendete Puffer/Lösungen und ihre Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Blockierungspuffer	TBST (Tris buffered saline & Tween 20) 5% Milchpulver
Blottingpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% MeOH
DMEM++	500 ml DMEM 10% Fötale Kälberserum 1% Penicillin / Streptomycin
DRAMA DNA-Marker	eigene Herstellung AG Tikkanen
ECL Lösung (verstärkte Chemielumineszenz Lösung)	100 mM Tris HCl (pH 8,5) 1 mL 1,25 mM Luminol 440 µl 0,2 mM Cumarinsäure
Glycerol-Stock-Puffer	65% Glycerol 0,1 M MgSO ₄ 25 mM Tris-HCl (pH 8)
Immunfluoreszenz Stripping Lösung (pH 2,9)	300 mM NaCl 200 mM Essigsäure
Laemmli-Gelelektrophorese-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
LB-Agar	15 g Agar-Pulver 1 l LB-Medium
LB (Luria/Miller) -Medium	20 g LB broth 1 l dd H ₂ O
PBS 1x (Phosphat gepufferte Saline)	150 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄
Ponceau-Färbelösung	1% Ponceau S 5% Essigsäure

Proteinladepuffer (4x)	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 10% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 100 mM DTT 20% β -Mercaptoethanol
Stripp-Puffer alkalisch	0,1 M NaOH (pH 12,7)
Lysepuffer	50 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40
TBST (Tris buffered saline + Tween 20)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% Tween
Tris-Acetat-EDTA Puffer, TAE	40 mM Tris (pH 8) 1 mM EDTA

2.3 SDS-Polyacrylamidgele

Die Tabelle 4 zeigt die Art und die Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Art	Zusammensetzung
Sammelgel 1 mm, 4%	11,7 ml H ₂ O 624 µl 3 M Tris (pH 6,8) 75 µl SDS (20%) 2,55 ml Acrylamid 22,5 µl TEMED 75 µl APS
Trenngel 1 mm, 15%	14,25 ml H ₂ O 5 ml 3 M Tris (pH 8,8) 200 µl SDS (20%) 20,09 ml Acrylamid 64 µl TEMED 400 µl APS

2.4 Kits und Säulen

In Tabelle 5 sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Kits und Säulen mit dem Hersteller und dessen Niederlassung angegeben.

Tabelle 5: Verwendete Kits und Säulen mit dem Hersteller und dessen Niederlassung

Bezeichnung	Hersteller	Niederlassung
β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer	Promega	Madison, Wisconsin (USA)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up	Macherey-Nagel GmbH &Co. KG	Düren (DE)
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH &Co. KG	Düren (DE)
Phire Tissue Direct PCR Master Kit	Invitrogen	Dreieich (DE)
RNeasy® Plus Micro Kit	Qiagen	Hilden (DE)

2.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

In den Tabellen 6 und 7 sind die für den Western Blot eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper, sowie die für die Lysotracker-Markierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung (*WB)	Hersteller/Referenz
AGA	Kaninchen	1:5000	(Tikkanen et al. 1995)
GAPDH	Maus	1:10 000	Abcam, via Biozol, Eching (DE)
HRP	Ziege anti Kaninchen	1:10 000	Dako, Hamburg (DE)
HRP	Ziege anti Maus	1:10 000	Dako, Hamburg (DE)

*WB= *Western Blot*

Tabelle 7: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Niederlassung
DAPI	1:1000	Merck	Darmstadt (DE)
LyoTracker® Red DND-99 1 mM Solution in DMSO	1:1000 1:2000	Invitrogen	Dreieich (DE)

2.6 Plasmide

Die folgende Tabelle stellt eine Übersicht aller Plasmide dar, welche für die vorliegende Doktorarbeit verwendet worden sind.

Tabelle 8: Verwendete Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Referenzen

Konstrukt	Resistenz	Ursprung/Referenz	Restriktionsenzyme
pcDNA3	Ampicillin/ Neomycin	Invitrogen Karlsruhe (DE)	BamHI, XhoI
pcDNA3-Fin- major	Ampicillin/ Neomycin	(Banning et al. 2016)	BamHI, XhoI

pcDNA3-C179R	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-E340X	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-G302R	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-P28L	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-Q137X	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-R107X	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-R116Q	Ampicillin/ Neomycin	Dr. Antje Banning (AG Tikkanen)	BamHI, XhoI
pcDNA3-R116W	Ampicillin/ Neomycin	(Banning et al. 2016)	BamHI, XhoI
pcDNA3-W168X	Ampicillin/ Neomycin	(Banning et al. 2017)	BamHI, XhoI
pcDNA5/FRT	Hygromycin	Invitrogen Karlsruhe (DE)	BamHI, XhoI
pSpCas9(BB)- 2A-Puro (PX459) V2.0	Ampicillin, Puromycin	Geschenk von Feng Zhang Addgene plasmid #62988, http://n2t.net/addgene:62988 (Ran et al. 2013)	

2.7 Primer

Die im Rahmen der Doktorarbeit eingesetzten Primer und ihre Sequenzen sind in der Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Primer und ihrer Sequenz

Primer	Sequenz (von 5' zu 3')
AGA-sgRNA fwd	CACCGATACCCTCCAATAATTTGGC
AGA-sgRNA rev	AAACGCCAAATTATTGGAGGGTATC
AGU-Fin-PCR screening fwd	AGCTCACTTAAGATGCTGCTGACC
AGU-Fin-PCR screening rev	AGCTCTCCATGCTGGATATGCAC
AGA-L126V fwd	CTGGAACATACAACACACACAGTTTTAGTAGGAGAGTCAGC
AGA-L126V rev	GCTGACTCTCCTACTAAAACACTGTGTGTGTTGTATGTTCCAG
AGA-pcDNA3- fwd	CTATAGGATCC ATGGCGCGGAAGTCGAACTTG
AGA-pcDNA3-rev	CTATA CTCGAG TTA GATGCAGTCCACTTTTTCC

2.8 Humane Zelllinien und Bakterienstämme

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Zelllinien, sowie des eingesetzten Bakterienstamms mit weiterführenden Informationen.

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien und der Bakterienstamm mit weiteren Informationen

Bezeichnung	Informationen	Bezugsquelle
HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney)	Humane, embryonale Nierenzellen	ATTC, Teddington (UK)
HEK293T Klon 20	HEK293T ohne AGA- Expression (mit CRISPR/ Cas9 generiert)	(Kapahnke et al. 2016)
HEK-Flp-In TM -293-Zellen	Humane, embryonale Nierenzellen mit integrierter pFRT/lacZeo im Genom	Invitrogen, Dreieich (DE)

E.Coli (Escherichia Coli) XL1- Blue	Zur Vermehrung der Plasmidkonstrukten bei der Transformation	Stratagene, CA (USA)
Fibroblasten, Wildtyp	Humane Hautfibroblasten, immortalisiert	Dr. Steven J. Gray (Mussche et al. 2013)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von HEK- und HEK-Flp-In-Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Zellkulturgefäße im Inkubator bei 37°C mit 8% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM++ (Dulbecco`s modified Eagle`s medium), welches mit 10% FCS (Fetales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Durch die Zugabe von Antibiotika wird einer möglichen Kontamination vorgebeugt.

3.1.2 Passagieren von HEK- und HEK-Flp-In-Zellen

Zur Passage der Zellen wurde zunächst das verbrauchte Nährmedium verworfen und es erfolgte ein Waschvorgang mit 2 ml PBS. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl Trypsinlösung versetzt. Um die Wirkung der Trypsinlösung zu stoppen, wird anschließend 1 ml DMEM++ zugegeben und resuspendiert. Ungefähr 90% der Zellsuspension wurde mittels einer sterilen Pipette verworfen, während der Rest der Lösung mit 5 ml frischem Nährmedium in der Zellkulturflasche weiterkultiviert wurde.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nach dem Trypsinieren der Zellen wurde die Reaktion mit Nährmedium gestoppt und die Zellen resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für vier Minuten bei 1100 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet wurde mit 0,5 ml Einfriermedium (FCS+ 10% DMSO) vermischt. Schließlich wurde die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und in einer Einfrierbox in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Die Einfrierbox gewährleistet eine schonende und gleichmäßige Abkühlung von 1°C/min. Nach 24 h können die Kryoröhrchen bei -150°C aufbewahrt werden. Zum Auftauen der Zellen wurde 1 ml erwärmtes Nährmedium in das Kryoröhrchen hinzugefügt und mit den Zellen vermischt. Im Anschluss wurde die

Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit 7 ml Nährmedium überführt und für fünf Minuten bei 1100 U/min als Pellet abzentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt. Das Pellet wurde in 5 ml frisches Medium resuspendiert. Bei Adhärenz der Zellen folgte ein Mediumwechsel.

3.1.4 Zellzählung der in vitro kultivierten Zellen

Zur Gewährleistung von standardisierten Bedingungen für die Durchführung von Verdünnungsexperimenten wurde die Zellzahl mithilfe eines Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Entsprechend 3.1.2 wurde eine Zellsuspension hergestellt, die man in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau ansetzte. Mittels einer Pipettenspitze wird 20 µl der Zellsuspension an die obere Kante des Deckglases angelegt und abgegeben. Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Zellen innerhalb der vier Großquadranten mit jeweils 16 Gruppenquadranten mithilfe eines Handzählers gezählt.

Die Bestimmung der Zellzahl kann anhand folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Zellzahl der Eckquadranten}}{\text{Anzahl der Eckquadranten}} \times 10^4$$

3.1.5 CRISPR/Cas9-vermittelter Knockout von AGA in HEK-Flp-In-Zellen

Mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems lässt sich DNA an vorbestimmten Stellen im Genom umändern. Das System basiert auf der bakterielle Nuklease Cas9, die gezielte DNA-Doppelstrangbrüche induzieren kann. Ihre Sequenzspezifität erhält die Cas9-Nuklease durch die Vorgabe einer genspezifischen Single Guide RNA (sgRNA). Anschließend können die zelleigenen Reparatursysteme den durchtrennten DNA-Strang zufällig (nicht-homolog) oder gezielt (homolog) wieder zusammenfügen. Für die vorliegende Arbeit wurden beide Komponenten mittels einer Transfektion von AGA-sgRNA (Kapahnke et al. 2016) im Plasmid PX459 (1 µg/ml) (s. Tabelle 8) in die Zelle eingebracht. Das Plasmid PX459 besitzt eine Puromycin-Resistenz für die spätere Selektion. Für die Transfektion wurde wie unter 3.1.7 beschrieben verfahren. Die Zellen befanden sich auf einer 6 cm Petrischale. Es wurde ein DNA/MACsfectin – Verhältnis von 1:4 verwendet. Der Transfektionsansatz bestand aus 5 µg PX459 in 250 µl OptiMEM und 20 µl Macsfectin in 250 µl OptiMEM. Nach einem Tag erfolgte der Mediumwechsel in DMEM++ mit

2 mg/ml Puromycin. Nach zwei weiteren Tagen folgte die Einzelzellklonierung der überlebenden Zellen.

3.1.6 Einzelzellklonierung der HEK-Flp-In-AGA-Knockout-Zellen

Zur Generierung von Einzelzell-Knockout-Klonen folgte eine serielle Verdünnung auf einer 96-well-Platte. Dafür wurde die Zellzahl der 6 cm Petrischale mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und auf eine theoretische Anzahl von einer Zelle pro 2 µl verdünnt. Anschließend erfolgte die Aussaat auf der 96-well-Platte. Die 96-well-Platte wurde für eine Woche bei 37°C inkubiert. Zellen aus den Wells, die nur von einer einzelnen Kolonie besetzt waren, wurden sukzessiv in eine 24-well-Platte und nach Konfluenz auf zwei 12-well-Platten transferiert. Nachdem die 12-well-Platten konfluent bewachsen waren, wurden aus einer Platte Zelllysate hergestellt für das Screening der Klone mittels AGA-Aktivitätsmessung (s. Abschnitt 3.4.1). Aus der zweiten 12-well-Platte wurden 70% der Zellen in Kryoröhrchen konserviert (s. Abschnitt 3.1.3) und der verbliebene Teil wurde als Pellet für die PCR der positiven Klone (s. Abschnitt 3.2.3) abzentrifugiert.

3.1.7 Transiente Transfektion von HEK-AGA-Knockout-Zellen

Zur Untersuchung der Expression des gewünschten Proteins wurden die Plasmide mit und ohne Mutation in die Zellen integriert. Für die Transfektion wurde ein DNA/MACSelectin – Verhältnis von 1:4 verwendet. Am Vortag wurden die Zellen in eine 12-well-Platte mit jeweils 150 000 Zellen pro Well ausgesät, um eine ausreichende Konfluenz von 70% bis 80% am nächsten Tag zu gewährleisten. Der Transfektionsansatz wurde in zwei separaten Eppendorfgefäßen angesetzt und danach vermischt. Im ersten Eppendorfgefäß wurden 500 ng Plasmid-DNA in 100 µl OptiMEM gelöst. Der Inhalt des zweiten Eppendorfgefäßes bestand aus 2 µl MACSelectin in 100 µl OptiMEM. Schließlich wurden die Inhalte beider Eppendorfgefäße zusammengegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel der 12-well Platte mit DMEM++. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz in die jeweiligen Wells der Platte getropft. Am nächsten Tag wurden die Zellen der einzelnen Wells trypsiniert und jeweils auf eine 6 cm Petrischale überführt.

Nach zwei Tagen wurden Zelllysate für die Messung der AGA-Aktivität (s. Abschnitt 3.4.1) und des anschließenden Western Blots (s. Abschnitt 3.2.13 und 3.2.14) hergestellt.

3.1.8 Stabile Transfektion von HEK-Flp-In-AGA-Knockout-Zellen

Mithilfe des Flp-InTM-Systems ist es möglich, DNA-Sequenzen im Genom ortsspezifisch zu integrieren. Bei diesem System ist die Flp-Rekombinase-Erkennungssequenz bereits stabil in die genomische Sequenz der Zellen bereits integriert. Die Erkennungssequenz für das ursprünglich aus dem 2 μ -Plasmid der Hefe stammendes Enzym befindet sich direkt 3' nach dem Start-Codon zwischen dem kodierenden Bereich eines Fusionsproteins aus β -Galactosidase und einer Zeocin-Resistenz. Demzufolge weisen Zellen des Flp-InTM-Systems β -Galactosidase-Aktivität und eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin auf. Das verwendete Plasmid pOG44 kodiert für die benötigte Flp-Rekombinase. Die Flp-InTM-Zellen wurden gemeinsam mit dem pOG44-Plasmid und mit den gewünschten Transgen-enthaltenen pcDNA5/FRT-Plasmiden transfiziert. Der pcDNA5/FRT-Vektor besitzt eine FRT-Erkennungssequenz. Die Flp-Rekombinase erkennt in den Zellen, die mit beiden Plasmiden transfiziert worden sind, die FRT-Stelle im Genom und auf dem Plasmid und ermöglicht hier den DNA-Doppelstrang Austausch und somit den Einbau des Transgens.

Durch die Integration des pcDNA5/FRT-Plasmides am Ort der FRT-Sequenz befindet sich der codierende Bereich für die Hygromycin-Resistenz stromabwärts vom SV40-Promotor, sodass das vorher bestehende Start-Codon nun den Anfang des Leserasters der Hygromycin-Resistenz bildet. Die transfizierten Zellen besitzen eine Hygromycin-Resistenz, die für die spätere Selektion verwendet wird.

Zunächst einmal erfolgte für die Transfektion die Aussaat der konfluent gewachsenen Zellen auf sieben Wells einer 12-well-Platte (150 000 Zellen/well). Für die Transfektion wurde ein pOG44-Plasmid: AGA-pcDNA5/FRT-Konstrukt - Verhältnis von 9:1 verwendet. Die Transfektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurden pro Well zwei Ansätze angefertigt. Der erste Ansatz bestand aus 100 μ l OptiMEM und den beiden Plasmiden. In einem weiteren Eppendorfgefäß folgte der zweite Ansatz bestehend aus 100 μ l OptiMEM mit 1,5 μ l Macsfectin. Für die Transfektion der Zellen wurden die folgenden Konzentrationen an pcDNA5/FRT-Konstrukt und Plasmid pOG44 verwendet:

Transfektion der 12-well-Platte:

- Well 1: nicht transfizierte Zellen
- Well 2: Transfektion von 55 ng AGA-WT-pcDNA5/FRT + 445 ng pOG44
- Well 3: Transfektion von 55 ng AGA-FIN-major-pcDNA5/FRT + 445 ng pOG44
- Well 4: Transfektion von 55 ng AGA-P28L-pcDNA5/FRT + 445 ng pOG44
- Well 5: Transfektion von 55 ng AGA-W168X-pcDNA5/FRT + 445 ng pOG44
- Well 6: Transfektion von 55 ng AGA-Leu126Val-pcDNA5/FRT + 445 ng pOG44
- Well 7: Transfektion von 500 ng AGA-WT-pcDNA5/FRT

Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel mit DMEM++ durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen der 12-well-Platte trypsiniert und auf eine 10 cm Petrischale in DMEM ++ mit 100 µg/ml Hygromycin überführt. Durch den Zusatz von Hygromycin erfolgte die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen. Für die darauffolgenden zwei bis drei Wochen wurde das Nährmedium alle vier Tage gewechselt. Nach ungefähr zehn Tagen sind alle Zellen des ersten und siebten Wells gestorben, da diese keine Resistenz gegen Hygromycin aufwiesen. In den restlichen Wells überlebten nur Zellen mit korrekt integriertem Insert. Sobald einzelne Kolonien makroskopisch sichtbar waren, wurden die einzelnen Kolonien mit einer 200 µl Pipettenspitze gepickt und jeweils in ein Well einer 12-well-Platte überführt.

Nachdem die Wells konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen in 6 cm Petrischalen umgesetzt und es erfolgte die Zelllysatherstellung für das Screening mittels Western Blot und die Messung der AGA-Aktivität. Des Weiteren wurde ein Teil der Zellen in Kryoröhrchen mit 0,5 ml FCS + 10% DMSO zur weiteren Lagerung eingefroren (s. Abschnitt 3.1.3). Zusätzlich wurden die einzelnen gepickten Klone in Kulturflaschen weiterkultiviert. Zur Bestätigung der erfolgreichen stabilen Transfektion erfolgte zudem der β -Galactosidase-Aktivitätsassay (s. Abschnitt 3.4.2) und die negative Zeocin-Selektion der gepickten HEK-Flp-In-Klone wie unten beschrieben.

3.1.9 Zeocin-Selektion der HEK-Flp-In-Zellen

Mithilfe des Antibiotikums Zeocin lässt sich der Einbau des gewünschten Inserts nach erfolgreich homologer Rekombination bestätigen, da die Expressionskassette, bestehend aus CMV-Promoter, dem integrierten Transgen und der Signalsequenz für die Polyadenylierung aus dem Gen des Rinder-Wachstumshormon (BGH), stromaufwärts des Konstruktes aus lacZ und Zeocin-Resistenz im Genom integriert wurde. Durch diesen Einbau kann die Transkription dieses Gens nicht mehr erfolgen, da der SV40-Promotor und der Start-Codon entfernt worden sind. Infolgedessen sind die stabil mit dem Transgen transfizierten Zelllinien zwar resistent gegen Hygromycin, jedoch sensitiv gegenüber Zeocin. Außerdem weisen diese Zellen keine β -Galactosidase-Aktivität mehr auf.

Für die Zeocin-Selektion wurden die gepickten HEK-Flp-In-Klone am Vortag in einer 12-well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag sollten die Zellen eine Konfluenz von 25% aufweisen, da das Zeocin am effektivsten auf aktiv teilende Zellen wirkt. Anschließend erfolgte ein Mediumaustausch in DMEM++ mit 400 μ g/ml Zeocin. Das Zeocin-Medium wurde alle drei Tage gewechselt, und die Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet. Die durch Zeocin getöteten Zellen zeigten eine abnormale Zellform und Größe im Vergleich zu resistenten Zellen. Als Positivkontrolle wurden Flp-InTM-Zellen ohne eingebautes Insert (Zeocin-resistent) verwendet.

3.1.10 Lysotrackermarkierung in HEK-Flp-In-Zellen

Die HEK-Flp-In- und AGA-KO-Flp-In-Zellen wurden auf Deckgläschen (Coverslips) in einer 12-well-Platte ausgesät (100 000 Zellen/Well). Für einen besseren Halt der Zellen, wurden die Deckgläschen vorher mit Poly-L-Lysin beschichtet. Pro Zelllinie wurden drei Wells ausgesät. Jeweils ein Well der Zelllinie blieb unbehandelt, während die Zellen des zweiten und dritten Wells mit 100 mM Trehalose oder 100 mM Saccharose behandelt wurden. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 60% erreicht hatten, wurde das Medium abgesaugt und 500 μ l frisches Nährmedium mit 1 μ M Lysotracker (Verdünnung 1:1000) in alle Wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten im Brutschrank wurde das Medium erneut abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 500 μ l 4%igem Paraformaldehyd (PFA) für zehn Minuten bei 37°C. Anschließend wurden das PFA entfernt, und es folgten zwei Waschvorgänge mit PBS und ein Waschvorgang mit destilliertem Wasser. Schließlich

wurden die Deckgläschen mit ROTI[®]-Mount FluorCare DAPI eingedeckelt und auf Objektträgern fixiert. Die Aufnahmen erfolgten durch ein konfokales Laserscanning-Mikroskop. Die Objektträger wurden bei 4°C gelagert.

3.1.11 Quantifizierung der Fluoreszenz nach Lyotrackerfärbung

Vor der Behandlung wurden die HEK-Flp-In- und AGA-KO-Flp-In-Zellen in Triplikaten der jeweiligen Zelllinie in eine 12-well-Platte (100 000 Zellen/Well) ausgesät. Zusätzlich wurde ein weiteres unbehandeltes Well als Leerwert ausgesät. Während das erste Well der Zelllinie unbehandelt verblieb, wurden in das zweite Well 100 mM Saccharose und in das dritte Well 100 mM Trehalose hinzugefügt. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 70% erreicht hatten, wurde das Medium von allen Wells außer dem Leerwert-Well entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 500 µl frischem Nährmedium mit 0,5 µM Lyotracker (1:2000) und 1 µg/ml DAPI (1:1000) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen des Leerwert-Wells verblieben unbehandelt. Danach wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurde die Reaktion durch frisches Nährmedium gestoppt, und die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurde das Zellgemisch für fünf Minuten bei 1800 U/Minuten und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet in 250 µl PBS aufgelöst. Schließlich wurde die Fluoreszenz der Zellen wie unter 3.2.19 beschrieben gemessen.

3.2 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1 RNA-Extraktion aus Fibroblasten

Die Isolierung der RNA aus Fibroblasten erfolgte mithilfe des RNeasy[®] Plus Micro Kits von Qiagen nach Herstellerangaben. Die Probe wurde in 25 µl RNase-freies Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die spektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration, wie unter 3.2.9 beschrieben.

3.2.2 Reverse Transkription

Die RNA aus den Fibroblasten wurde durch den Vorgang der Reversen Transkription in eine einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Eingesetzt wurde ein Ansatz bestehend aus 15,54 µl bzw. 3 µg RNA, 1,5 µl Oligo d(T) mRNA-Primer und 2,54 µl DEPC-Wasser, welcher bei 70°C im Thermozykler für vier Minuten denaturiert wurde, damit bestehende Sekundärstrukturen aufgeschmolzen werden. Im Anschluss wurde ein 24 µl Gemisch wie folgt angesetzt: 3 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl RNase-Inhibitor, 0,5 µl M-MuLV Reverse Transcriptase, 4,5 µl MuLV Reverse Transcriptase 10xBuffer und 15,5 µl DEPC-Wasser. Das Gemisch wurde zum ersten Ansatz hinzugefügt und die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C. Schließlich wurde die Transkriptase bei 80°C für fünf Minuten inaktiviert. Im nächsten Schritt wurde die entstandene cDNA über die Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert.

3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die Sequenzanalyse der positiven HEK-Flp-In-Knockout-Klone wurde das Phire Tissue Direct PCR Master Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurde das abzentrifugierte Pellet in 10 µl Dilution-Buffer und 0,5 µl DNA-Release-Agent resuspendiert. Nach dem Vortexen der Zellsuspension folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Anschließend wurde das Zellgemisch für zwei Minuten bei 98°C erhitzt. Nachfolgend wurde der PCR-Ansatz wie folgt zusammengegeben: 1 µl Lysat, 10 µl 2xTissue Mix, 0,5 µl Primer Screening Primer AGU-fin forward (20 µM), 0,5 µl Primer Screening Primer AGU-fin reverse (20 µM) und 4 µl destilliertes Wasser. Zunächst einmal wurde die Template-DNA einmalig bei 98°C für 30 Sekunden erhitzt. Für weitere zehn Sekunden folgte die Denaturierung bei 98°C. Der darauffolgende Annealing-Schritt wurde für 30 Sekunden bei 60°C durchgeführt. Die Synthese fand bei 72°C für eine Minute statt und der Zyklus wurde 39-mal wiederholt.

Für die PCR der zuvor hergestellten cDNA aus der RNA der Fibroblasten wurde der Ansatz wie folgt angesetzt: 13,3 µl destilliertes Wasser, 1 µl L126V cDNA, 0,5 µl Primer fwd (pcDNA3: hAGA-Start-BamHI, s. Tabelle 10), 0,5 µl Primer rev (pcDNA3: hAGA-Stop-XhoI, s. Tabelle 10), 0,4 µl dNTP, 4 µl Q5 5xPuffer, 0,6 µl DMSO und 0,2 µl Q5 Polymerase. Der Zyklus wurde 45-mal wiederholt.

Schließlich wurde das PCR-Produkt auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetragen und anschließend mithilfe des Gel-Extraktion Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA-Konzentration der Proben wurde spektrometrisch gemessen. Die fertigen Proben wurden zum Sequenzieren an Microsynth Seqlab geschickt.

3.2.4 Restriktionsspaltung von Vektor und Inserts

Der Restriktionsverdau dient als eine Methode zur Spaltung von DNA an bestimmten Schnittstellen. Hierfür verwendet man Restriktionsendonukleasen, die jeweils an einer charakteristischen Erkennungssequenz die DNA spalten. Dabei entstehen je nachdem, ob die Enzyme beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz oder versetzt schneiden, glatte - (blunt ends) oder klebrige Enden (sticky ends). Die Restriktionsspaltung wird verwendet, um DNA für eine Klonierung vorzubereiten oder DNA basierend auf den erhaltenen charakteristischen DNA-Fragmenten zu charakterisieren (Restriktionsverdauungsanalyse).

Die Vektorspaltung erfolgte, indem 5 µg des pcDNA/FRT-Vektors mit 2 µl CutSmart 10xPuffer, je 0,5 µl BamHI und XhoI und 13,1 µl destilliertem Wasser zu einem Gesamtansatz von 20 µl angesetzt wurde. Die Insertspaltung wurde mit 5 µg des ausgewählten AGA-pcDNA3-Konstruktes, 2 µl CutSmart 10xPuffer, jeweils 0,5 µl der Restriktionsenzyme (BamHI und XhoI) angesetzt und mit destilliertem Wasser zu einem Gesamtansatz von 20 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

3.2.5 Gelelektrophorese und Extraktion der Plasmid-DNA

Im Anschluss wurden die Proben des Verdau auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Moleküle durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld voneinander getrennt. Da DNA-Moleküle negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Die ersten zwei Taschen des Gels wurden mit 3 µl DRAMA-Marker und 1 kb DNA-Leiter gefüllt, während die DNA-Proben in die weiteren Aussparungen pipettiert wurden.

Zuvor wurde den zu untersuchenden Proben jeweils 3 µl 6-fachen Ladepuffer hinzugefügt. Zur Färbung der DNA wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid ergänzt, um das Ergebnis der Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Apparatur wurde bei 125 V für 30 Minuten angeschlossen. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE 0,5x benutzt. Anhand der aufgetragenen Größenstandards wurde das Ergebnis unter UV-Licht begutachtet. Der geschnittene Vektor und die Inserts wurden aus dem Agarosegel extrahiert und mithilfe des Gel-Extraktions-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Die Proben wurden in 15 µl Elutionspuffer aufgenommen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration spektrometrisch, wie unter 3.2.9 beschrieben, bestimmt.

3.2.6 Ligation

Zur Verknüpfung des gereinigten Inserts in den geschnittenen Vektor wurde die Ligation wie folgt angesetzt: 1 µl Plasmid, 7 µl Insert, 1 µl T4 10xLigase Puffer und 1 µl T4 Ligase. Die Ligation erfolgte für 12 h bei 16°C.

3.2.7 Transformation

Für die Transformation wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl kompetenten *E. coli* XL-1 blue in einem Eppendorfgefäß vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden. Daraufhin wurde der Ansatz für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium zur Zellsuspension, schüttelte das Eppendorfgefäß bei 220 U/min und 37°C für 45 Minuten. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 30 Sekunden bei 7000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich erfolgte das Ausplattieren der transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin. Über Nacht folgte die Inkubation der LB-Platten bei 37°C im Brutschrank.

3.2.8 Plasmidpräparation (Mini)

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien. Dafür wurden sechs Klone der selektiven LB-Platte mithilfe einer 200 µl Pipettenspitze gepickt und jeweils in einem Bakterienröhrchen mit 5 ml LB-Medium mit

Ampicillin (250 µg/ml) überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Bakterienröhrchen bei 220 U/min und 37°C über Nacht im Schüttelinkubator. Am nächsten Tag wurden zweimal nacheinander 2 ml der Bakteriensuspension in einem Eppendorfgefäß bei 14 000 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mithilfe des Plasmid DNA Purification Kits (Macherey-Nagel) laut Herstellerangaben. Die Proben wurden in jeweils 50 µl Elution Buffer (AE) aufgenommen. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration spektrometrisch gemessen. Zur Selektion der positiven Klone wurde ein Restriktionsverdau wie folgt angesetzt: jeweils 5 µl der Minipräparation, 1 µl CutSmart 10xPuffer, 0,2 µl BamHI, 0,2 µl XhoI und 3,6 µl destilliertes Wasser. Der Verdau inkubierte für eine Stunde bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 6-fachem Ladepuffer auf einem 1%igem Agarosegel geladen. Zur Ermittlung der positiven Klone wurde das Ergebnis unter UV-Licht ausgewertet und die fertigen Proben wurden zum Sequenzieren an Microsynth Seqlab geschickt.

3.2.9 DNA/RNA-Konzentrationsmessung

Zur Bestimmung der DNA bzw. RNA-Konzentration wurde die Tecan Nanoquant-Platte verwendet. Zur Berechnung des Leerwerts wurde pro Messstelle 2 µl Elution Buffer AE benutzt und im Tecan gemessen. Nachfolgend wurden die Messstellen mit jeweils 2 µl der Probe benetzt und die Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

3.2.10 Anfertigung von Glycerolstocks

Die Herstellung von Glycerolstocks dient der langfristigen Lagerung der transformierten Bakterien. Dafür wurden 50 µl der verbliebenen transformierten Bakteriensuspension in ein Bakterienröhrchen mit 2 ml frischen LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 800 µl Glycerol-Stock Puffer (s. Tabelle 3) mit 800 µl der frischen Bakterienkultur in einem Kryoröhrchen resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.11 Mutagenese

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Stränge gezielt *in vitro* verändert werden, um beispielsweise Punktmutationen einzubauen. Durch die Modifikation der Primer lassen sich Mutationen während der Amplifikation gezielt einbauen. Die Mutageneseprimer wurden zunächst einmal in DEPC-behandeltem Wasser aufgelöst, um eine Konzentration von 100 μM anzusetzen. 10 μl dieser Lösung wurde mit jeweils 90 μl TE Puffer vermischt, um eine Gebrauchslösung von 10 μM zu erhalten. In ein Eppendorfgefäß wurde der folgende Ansatz zusammen pipettiert: 40,5 μl DPEC-Wasser, 0,5 μl Plasmid-DNA (100-250 ng), 5 μl 10xPCR-Puffer, 1 μl Primer forward (10 μM), 1 μl Primer reverse (10 μM), 1 μl dNTPs, 1 μl PfuTurbo DNA-Polymerase. Im Thermozykler wurde die Plasmid-DNA einmalig für fünf Minuten bei 95°C in ihre Einzelstränge denaturiert. Danach begann der erste Zyklus: für weitere zehn Sekunden folgte die Denaturierung bei 95°C und in der darauffolgenden Minute fand der Annealing-Schritt bei 65°C statt. Zum Erreichen des Temperaturoptimums der verwendeten PfuTurbo DNA-Polymerase wurde die Temperatur für zwölf Minuten auf 68°C erhöht. Der Zyklus wurde 19-mal wiederholt. Im Anschluss wurde die Temperatur für weitere sieben Minuten auf 68°C belassen, damit die Polymerase die DNA-Stränge vollständig synthetisieren kann. Die PCR wurde durch das Absenken der Temperatur auf 10°C beendet. Schließlich wurde die amplifizierte DNA mithilfe des Gel-Extraktion Kits der Firma Macherey-Nagel extrahiert. Nachfolgend wurde der Ansatz für den DpnI-Verdau wie folgt zusammengegeben: 44 μl der Probe, 5 μl CutSmart 10xPuffer und 1 μl DpnI. Der Verdau inkubierte für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank. Da das Restriktionsenzym DpnI nur methylierte DNA schneidet, ist es optimal dazu geeignet, den nichtmutierten parentalen DNA-Strang des Plasmids zu spalten. Durch den Verdau bleibt allein der mutierte DNA-Strang intakt. Nach einer erneuten Reinigung der Probe mit dem Nucleospin Gel und PCR Clean-up Kits (Macherey Nagel) laut Herstellerangaben, wurde wie unter 3.2.5 beschrieben, 10 μl der Probe transformiert. Anschließend wurde eine Miniplasmidpräparation, wie unter 3.2.8 beschrieben, durchgeführt und die DNA-Konzentration spektrometrisch gemessen. Die fertige Probe wurde zum Sequenzieren an Microsynth Seqlab geschickt.

3.2.12 Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford

Um gleichmäßig konzentrierte Gelproben herzustellen und vergleichbare Messwerte zu gewährleisten, wurden die Zellysate bezüglich ihres Proteingehalts aneinander angeglichen. Dafür erfolgte die Proteinmessung in einer transparenten 96-well-Platte im Mikrotiterplatten-Reader in Triplikaten des jeweiligen Zellysates und Standards. Zunächst wurden je drei Ansätze aus 10 µl der verdünnten Probe und 200 µl Biorad-Reagenz, welches in einem Verhältnis von 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt wurde, angesetzt. Zur Kalibrierung wurde eine Standardreihe mit folgender Albumin Konzentration verwendet: S1: 0,02 mg/ml, S2: 0,05 mg/ml, S3: 0,1 mg/ml, S4: 0,15 mg/ml, S5: 0,2 mg/ml, S6: 0,25 mg/ml und S7: 0,3 mg/ml. Die Proteinmessung erfolgte bei 595 nm. Die HEK-Zellysate wurden je nach Proteingehalt in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:40 in destilliertem Wasser verdünnt.

3.2.13 Zellysatherstellung aus Fibroblasten, HEK- und HEK-Flp-In-Zellen

Zur Untersuchung der gewünschten Proteine werden diese durch Zellaufschluss extrahiert. Die Herstellung von Zellysaten fand auf Eis statt. Zunächst einmal wurden die adhären gewachsenen Zellen der 6 cm Petrischale mit 2 ml kalten PBS gewaschen. Die darauffolgende Ernte der Zellen fand ebenso in 2 ml PBS statt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von den Platten gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für vier Minuten bei 1100 U/min und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein Gemisch aus 200 µl Lysepuffer und 2 µl Protease-Inhibitor-Cocktail wurde zum Pellet hinzugefügt. Nach der Resuspension der Pellets erfolgte die Lyse auf Eis für mindestens 30 Minuten. Anschließend folgte eine zehn-sekündige Sonifikation bei einer Amplitude von 95%. Danach wurde die Zellsuspension für zehn Minuten bei 15 000 U/min und 4°C zentrifugiert und das Lysat vom Pellet getrennt, indem der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde.

3.2.14 SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Herstellung von gleichmäßig konzentrierten Proben wurden diese mit destilliertem Wasser auf eine einheitliche

Proteinkonzentration verdünnt. Danach wurden die Proben mit 4-fachem Ladebuffer versetzt und bei 94°C für fünf Minuten erhitzt. Das Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), welches Teil des Lade- als auch Laufpuffers ist, denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung. Diese erlaubt eine Auftrennung der negativ geladenen Proteine nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, da längere Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden als kürzere. Die Gelelektrophorese erfolgte mit Sammel- und Trenngel nach Laemmli. Als Referenz wurde 4 µl Biorad-Proteinmarker in eine Geltasche hinein pipettiert, in die restlichen Aussparungen folgten jeweils 20 µl der Proteinprobe. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese in 1xLaemmli-Puffer (s. Tabelle 3) bei 15 mA pro Gel für 1,5 h. Sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, wurde auf 20 mA hochgestellt. Der Vorgang wurde beendet, bevor das Ende des Gels erreicht wurde.

3.2.15 Western Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und können dort indirekt detektiert werden. Dafür wurden das SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran in einem Blotting-Gitter beidseitig mit jeweils einem Schaumstoffschwamm und einem Filter-Papier fixiert. Der Transfer erfolgte in einer gekühlten Blotkammer bei 400 mA für 1,5 h. Als Puffer wurde einfaches Blotsalz mit 10 MeOH verwendet. Zur Bestätigung des erfolgreichen Transfers wurden die membrangebundenen Proteine mit dem Farbstoff Ponceau S unspezifisch angefärbt. Nach wenigen Sekunden waren rote Proteinbanden auf der Membran zu sehen. Schließlich wurde die Färbung durch das Waschen mit destilliertem Wasser und 1xTBST entfernt.

3.2.16 Immundetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Trägermembran, folgte die Detektion mittels Immunfärbung. Durch eine einstündige Inkubation in einer 5%igen Milchpulverlösung in 1xTBST wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Anschließend folgten drei 15-minütige Waschvorgänge mit 1xTBST. Schließlich inkubierte der primäre, Antigen-spezifische Antikörper (s. Tabelle 6) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut dreimal für 15 Minuten mit 1xTBST

gewaschen und der sekundäre Antikörper (s. Tabelle 6) inkubiert für 30 Minuten bis eine Stunde auf dem Schwenktisch. Nachdem die Membran erneut mit 1xTBST gewaschen wurde, folgte das Abtrocknen und die dreiminütige Inkubation von 1 ml ECL-Lösung (s. Tabelle 3) + 1 µl 10%iger Wasserstoffperoxid. Wenn das Signal zu schwach war, wurde ein stärkeres Reagenz zum Entwickeln verwendet (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Thermo Scientific). Hierfür wurde 500 µl der schwachen Lösung (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) mit 500 µl der starken Lösung (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) gemischt und für drei Minuten inkubiert. Zur Visualisierung des Signals wurde die Membran in einer Filmkassette fixiert. Ein Röntgenfilm wurde je nach Signalstärke für 30 Sekunden bis 15 Minuten aufgelegt. Im Anschluss wurde der Röntgenfilm entwickelt und das Ergebnis wurde optisch ausgewertet.

3.2.17 Strippen

Um die Nitrocellulosemembran für weitere Immunfärbungen zugänglich zu machen, müssen die bereits gebundenen Antikörper vorher denaturiert und entfernt werden. Dafür wurde die Membran für zehn Minuten mit 0,1 M NaOH inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser und 1xTBST für jeweils fünf Minuten gewaschen. Schließlich wurden die unspezifischen Bindungsstellen erneut mit 5%iger Milchpulverlösung in 1xTBST für 30 Minuten bis eine Stunde blockiert. Nach drei 15-minütigen Waschvorgängen mit 1xTBST stand die Membran für eine weitere Immundetektion zur Verfügung.

3.2.18 Immunfluoreszenzmessung der HEK-Flp-In-Zellen

Zur Messung der Fluoreszenz der Zellen wurden jeweils 200 µl der Proben in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert. Die Lysotracker-Messung erfolgte bei einer Exzitation von 530 nm und einer Emission von 590 nm. Die DAPI-Messung wurde bei einer Exzitation von 365 nm und einer Emission von 450 nm durchgeführt. Zur Berechnung der Fluoreszenz wurde von allen Messwerten der Wert der ungefärbten Zellen (Leerwert) abgezogen. Anschließend wurde der Wert der Lysotracker-Messung durch den Wert der DAPI-Messung geteilt. Schließlich wurde aus mehreren Endwerten der Mittelwert mit Standardabweichung zum Vergleich in einem Diagramm aufgetragen.

3.3 Aktivitätsassay

3.3.1 Fluorometrischer AGA-Aktivitätsassay (Mononen et al. 1993b; Voznyi et al. 1993)

Nach der Herstellung von Lysaten erfolgte die Aktivitätsmessung in einer schwarzen 96-Well-Platte in Triplikaten der zu untersuchenden Probe. Zur Messung der AGA-Aktivität wurden jeweils 20 µl des Zelllysates mit 20 µl 50 µM Asp-AMC in McIlvaine Puffer pH 6,5 angesetzt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl McIlvaine Puffer pH 4,5 wurde die Reaktion gestoppt. Im Anschluss erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Exzitation von 355 nm und Emission von 460 nm. Schließlich wurde AGA-Aktivität und ihre Angabe in µmol umgesetztes Substrat pro g Protein berechnet. Die Messung der AGA-Aktivität im Serum (Nummer HUS/2604/2017, Genehmigung durch Ethikkommission von Helsinki und Uusimaa-Region, Finnland, vom 19.10.2017) erfolgte in Triplikaten mit jeweils 20 µl der zu untersuchenden Probe. Anschließend wurde 20 µl 25 µM Asp-AMC in McIlvaine Puffer pH 6,5 dazugegeben. Zur Kontrolle wurde eine positive (gesunde) Probe verwendet mit 10 µl Serum, 10 µl NaCl-Lösung und 20 µl 25 µM Asp-AMC in McIlvaine Puffer pH 6,5. Zudem wurde eine AMC-Standardreihe (0-100 pmol) bestehend aus 15 Proben mit einer gleichbleibenden summierten Konzentration von 12,5 µM Asp-AMC + AMC in künstlicher Serummatrix angesetzt. Nach einer Inkubation von 24 h im Brutschrank wurde die Messung bei einem Gain von 120 wie oben beschrieben durchgeführt. Über die Standardreihe wurden die Werte in mU/L (1 U= 1 µmol/min) berechnet.

Reagenzien

- L-Aspartic acid β-(7-amido-4-methylcoumarin), Asp-AMC: Santa Cruz sc-211699 (1,5 mM in McIlvaine Puffer pH 6,5)
- 7-Amino-4-Methylcoumarin: Sigma Aldrich A9891 (Standardreihe aus 8 Standards in McIlvaine's Puffer pH 4,5 angesetzt)
- McIlvaine Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,5
- McIlvaine Phosphat-Citrat-Puffer pH 4,5

Tabelle 11: Zusammensetzung des Phosphat-Citrat-Puffers nach McIlvaine

pH	0,2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	0,1 M Zitronensäure (ml)
4,0	7,71	12,29
5,0	10,30	9,70
6,0	12,63	7,37
7,0	16,47	3,53

3.3.2 Beta-Galactosidase-Aktivitätsassay

Zur Untersuchung der β -Galactosidase-Aktivität der HEK-Flp-In-Klone wurden zunächst Zellysate hergestellt. Dafür wurden die Zellen trypsiniert, und anschließend wurden die Reaktion mit Nährmedium gestoppt. 500 μ l der Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und danach bei 8000 U/min als Pellet abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in 150 μ l 1xReporter Lysis Buffer (Promega) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zwischendrin wurde die verdünnte Zellsuspension mehrmals für fünf Sekunden vermischt. Nach der Inkubationszeit wurde das Zellgemisch bei 150 000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das fertige Lysat wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Jeweils 50 μ l, 10 μ l, 5 μ l und 2 μ l einer Probe wurden in eine durchsichtige 96-well-Platte gegeben und danach mit 50 μ l Assay 2xBuffer resuspendiert. Als Negativkontrolle wurden verdünnte Lysatproben von nicht transfizierten HEK-Flp-In-Zellen verwendet. Nachfolgend wurde die 96-well-Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Klone mit einer β -Galactosidase-Aktivität wiesen eine gelbe Färbung auf. Die negativen HEK-Flp-In-Klone verblieben farblos. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von 150 μ l 1M Natriumcarbonat gestoppt. Schließlich erfolgte die Messung der Absorption der Proben am Tecan-Plattenreader bei einer Wellenlänge von 420 nm.

3.4 Statistik

Die Experimente der vorliegenden Doktorarbeit wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Abweichungen in der Versuchsanzahl werden angegeben. Mithilfe der GraphPad Prism® 5.04 Software (Kalifornien, USA) erfolgte die statistische Analyse. Zur Auswertung wurde die one-way- als auch two-way-Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein besonderer Fokus auf die Charakterisierung einer neuartigen Punktmutation Leu126Val gelegt. Die beschriebene AGA-Variante wurde an einem sechsjährigen Patienten mit algerischen Wurzeln aus der Schweiz postuliert. Die Eltern des betroffenen Kindes sind verwandt. Bei der Mutation erfolgt ein Austausch von Leucin126 zu Valin.

4.1 Sequenzierung der AGU-L126V-Patienten-DNA

Zur Bestätigung der AGU-Mutation L126V wurde die RNA aus Patientenfibroblasten isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Das AGA-Transkript wurde mittels PCR vervielfältigt, auf einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt und anschließend extrahiert. Die Sequenzierungsergebnisse bestätigen das Vorliegen der AGU-L126V-Mutation in homozygoter Form (s. Abbildung 3). Es konnten keine weiteren Mutationen im kodierenden Bereich des AGA-Gens festgestellt werden.

```
TGGTGTGGCACGGAAAGTACTGGAACATACAACACACACACTTTTAGTAGGAGAGTCAGC 395 WT
|||||
TGGTGTGGCACGGAAAGTACTGGAACATACAACACACACACAGTTTTTAGTAGGAGAGTCAGC 602 L126V
```

Abbildung 3: DNA-Sequenz von AGA-L126V im Vergleich zum AGA-WT: In der DNA-Sequenz von AGA-L126V ist die Punktmutation (c.376C>G, hier: gelb markiert) zu erkennen. Das Codon CTT wird zu GTT (hier Rot umrahmt) verändert, wodurch es zu einem Austausch von Leucin126 zu Valin kommt. Striche zwischen den DNA-Sequenzen signalisieren eine Übereinstimmung der Nukleotide beider Sequenzen, fehlende Striche weisen auf Veränderung in der Basenabfolge einer Sequenz hin.

4.2 Mutagenese der AGA-L126V-Variante in das pCDNA3-Plasmid

Um die AGA-Variante L126V hinsichtlich Enzymaktivität und Prozessierung untersuchen zu können, wurde mithilfe zielgerichteter Mutagenese-PCR ein Expressionsplasmid generiert. Hierbei diente bereits vorhandenes Wildtyp-AGA in pCDNA3 als Ausgangsmaterial. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA von drei Bakterienkolonien bestätigte die erfolgreiche Mutagenese c.376C>G (s. Abbildung 4).

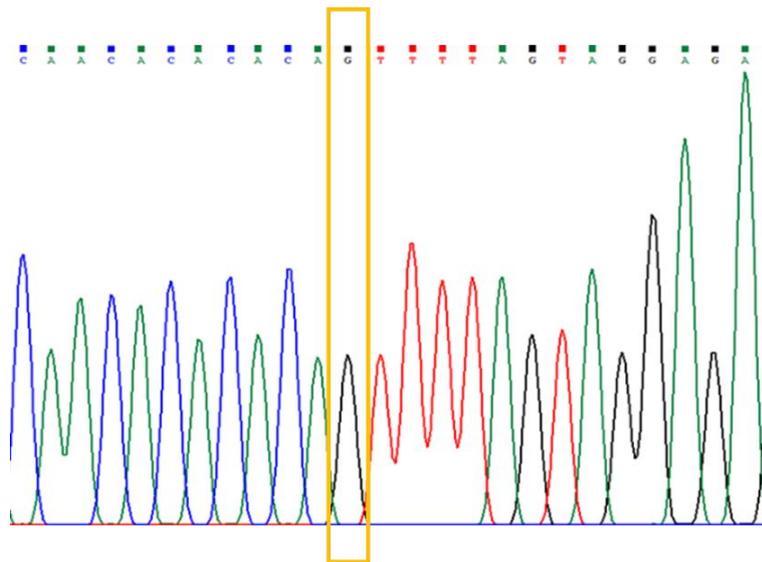


Abbildung 4: DNA-Sequenz von AGA-L126V: In der DNA-Sequenz von AGA-L126V ist die Punktmutation (c.376C>G) zu sehen. Das Codon CTT wird zu GTT verändert, dadurch erfolgt ein Austausch von Leucin126 zu Valin. Die Punktmutation wurde in Gelb hervorgehoben.

4.3 Generierung von AGA-KO-Flp-In-Zellen

Bevor eine stabile Transfektion des AGA-Wildtyps als auch der AGA-Varianten in die HEK-Flp-InTM-293-Zellen erfolgen konnte, war es erforderlich, AGA-Knockout (KO)-Flp-In-Zellen zu generieren. Die Herstellung von AGA-KO-Flp-In-Zellen wurde über das CRISPR/Cas9-System vermittelt. Hierfür stand bereits das Konstrukt AGA-sgRNA im Plasmid PX459 zur Verfügung, welches mittels transienter Transfektion in die HEK-Flp-In-Zellen eingebracht wurde. Nach der Selektion mit Puromycin erfolgte die Einzelzellklonierung der überlebenden Zellen. Das Screening der Einzelzellklone wurde mithilfe der AGA-Aktivitätsmessung durchgeführt (s. Abbildung 5). Anschließend wurde in drei ausgewählten Klonen ein DNA-Abschnitt im Bereich der gRNA-Zielsequenz über die Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. Anhand der Sequenziererergebnisse, welche in Abbildung 6 dargestellt sind, wurde der AGA-Knockout in den HEK-Flp-In-Zellen bestätigt. Bei den meisten Klonen lag eine Rasterverschiebung (frameshift) vor. Die positiven Klone wurden zur Übersicht nummeriert (Klone 5, 9 und 18).

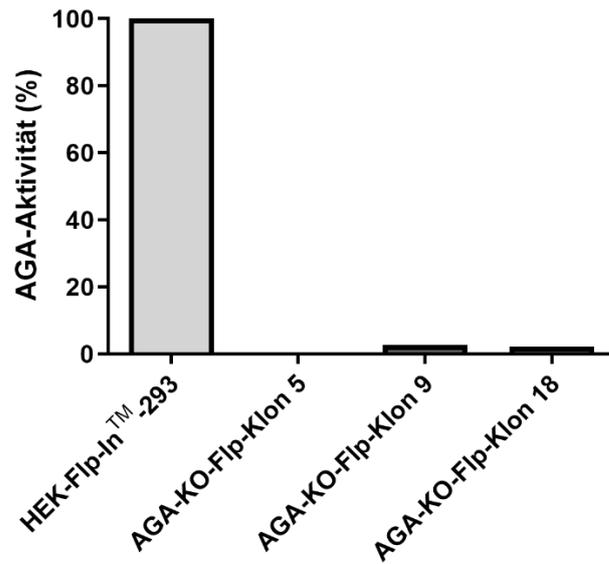


Abbildung 5: AGA-Aktivitäten der AGA-KO-Flp-In-Klone 5, 9 und 18: Nachdem Zelllysate hergestellt wurden und die Proteinmessung nach Bradford durchgeführt worden ist, folgte die AGA-Aktivitätsmessung. Zunächst wurden die Angaben in μmol umgesetztes Substrat pro g Protein berechnet, anschließend wurden die Werte in % Aktivität umgerechnet. Als Referenz dienten HEK-Flp-In™-293-Zellen, die auf 100% gesetzt worden sind. Alle AGA-KO-Flp-In-Klone zeigten keine oder eine äußerst geringe Restaktivität von unter 5%.

A**Wildtypsequenz AGA genomisch**

AGCTCACTTAAGATGCTGCTGACC CAGAATGTCTCTAGTACATATATTTTTGTTGAAAAGACAATACTTGAATAATTTATACTT
 CCTTTTTTCCAATCTCCAGCCACCACATTTGCTCAAAGTATGGGGTTTATCAATGAAGACTTATCTACCACTGCTTCTCAAGCT
 CTCATTCCAGATTGGCTTGCTCGGAATTGCCAGCCAAATTATTGGAGGGTATGCACACATTTAATTTAAAAAATAAGTTAATT
 GAAAATATTCAGTGACATCCTTTCTGCTCAGTGTTCCTGCCTGCTGTTGTCCAGGGTACTGGTTAGCATCCTGGCTGTACATTA
 GAACTAGTGGTTTTAGTTGACTCTCCAGGTATGGATGTTCTGAAACACCTCTAGCTGCATTGGTGCATATCCAGCATGGA
 GAGCT

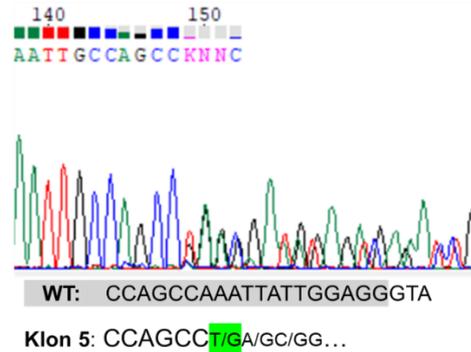
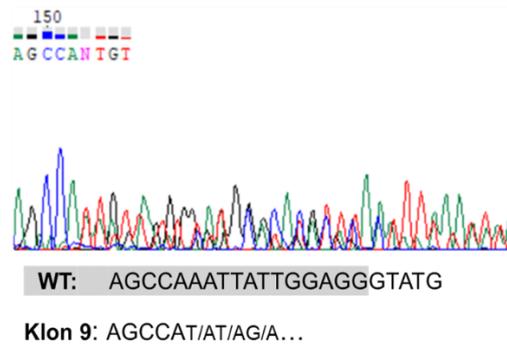
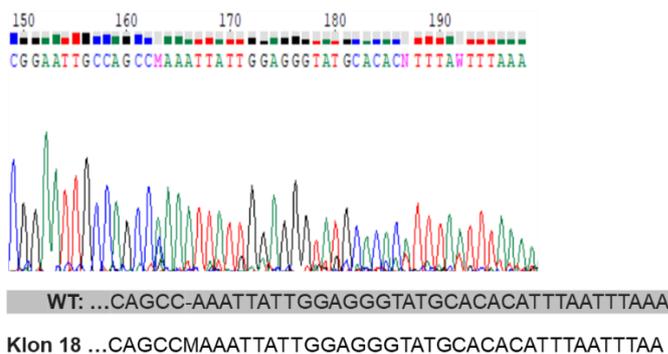
B**C****D**

Abbildung 6: DNA-Sequenzen der AGA-KO-Flp-In-Klone (A-D): DNA-Sequenzen des AGA-Wildtypes und der AGA-KO-Flp-In-Zellen der Klone 5, 9 und 18 **A)** Die genomische AGA-Wildtypsequenz nach PCR mit Screening Primern forward und reverse. In Rot wird die PAM (Protospacer Adjacent Motif) -Sequenz hervorgehoben. Diese stellt eine Erkennungssequenz für Cas9 auf der zu schneidenden DNA dar. Der grün hinterlegte DNA-Abschnitt zeigt die gRNA. Die gelben Sequenzabschnitte stellen die Primersequenzen dar. **B)** DNA-Sequenz des AGA-KO-Flp-In-Klons 5: Nach der PAM-Stelle ist die Sequenz überlagert. Es folgt eine Insertion von T/G (hier: grün markiert). Dadurch kommt es zu einer Rasterverschiebung. **C)** DNA-Sequenz des AGA-KO-Flp-In-Klons 9: Heterozygot mit Indel-Mutationen **D)** DNA-Sequenz des AGA-KO-Flp-In-Klons 18: Einschub von einer Base (A oder C) drei Basen nach PAM. Dadurch kommt es zu einer Rasterverschiebung. Übersichtshalber ist in der Abbildung nur die forward (fwd) DNA-Sequenz des jeweiligen Klons dargestellt. Die reverse Sequenzierung wurde ebenso durchgeführt und bestätigte das dargestellte Ergebnis.

4.4 Lysotrackermarkierung in behandelten HEK-Flp-In-Zellen

Trehalose ist ein natürliches Disaccharid, das aus zwei Glucosemolekülen besteht, die durch eine α,α -1,1-Glycosidbindung verbunden sind. Saccharose ist ein Disaccharid bestehend aus einem Glucose- und Fructosemolekül, welche über eine α,β -1,2-glykosidische Bindung miteinander verbunden sind. Beide Disaccharide werden von den Zellen endozytotisch aufgenommen und reichern sich im endolysosomalen System an. Aufgrund der schnellen Aufnahme induziert die Behandlung lysosomalen Stress. Die Behandlung mit Saccharose als auch Trehalose ahmt somit die zelluläre Pathologie lysosomaler Speicherkrankheit, wie zum Beispiel Aspartylglukosaminurie, nach (Burton et al. 2020; Jeong et al. 2021)

Zur Charakterisierung der AGA-KO-Flp-In-Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen mit dem für saure Organellen spezifischen Farbstoff Lysotracker angefärbt. Es wurden HEK-Flp-In-Zellen mit AGA-KO-Flp-In-Zellen verglichen. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit Trehalose oder Saccharose für 72 h behandelt, um lysosomalen Stress zu induzieren und die Biogenese von Lysosomen zu steigern. Als Referenz dienten unbehandelte Proben der verschiedenen Zelllinien. Die zu untersuchenden Zellen wurden durch die Lysotrackerfärbung quantifiziert, indem die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 530 nm und einer Emission von 590 nm am Plattenreader gemessen wurde.

Aus der Abbildung 7 geht hervor, dass die Intensität der gefärbten Lysosomen deutlich durch die Behandlung der zu untersuchenden Zelllinien zunimmt. Insbesondere bei den AGA-KO-Flp-In-Klonen sind verstärkt fluoreszierende Vesikel zu beobachten, die durch die Behandlung eine vergrößerte Morphologie aufweisen und in ihrer Anzahl vermehrt erscheinen. Zudem ist wichtig zu erwähnen, dass die Intensität der gefärbten Lysosomen der AGA-KO-Flp-In-Klone schon im unbehandelten Zustand, verglichen zu den unbehandelten HEK-Flp-InTM-293-Zellen, stärker erscheint.

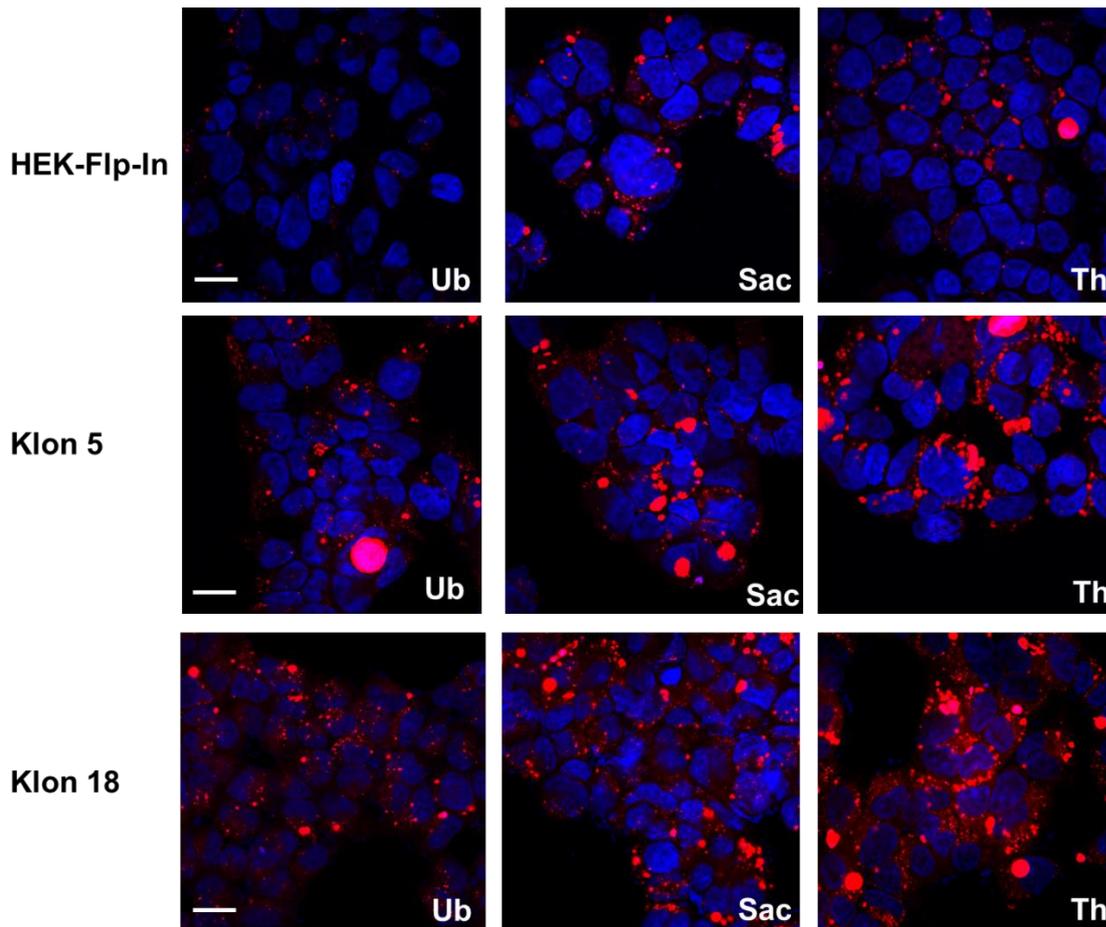


Abbildung 7: Charakterisierung der sauren Zellorganellen in AGA-KO-Klonen mittels Lysotracker: Die AGA-KO-Flp-In-Klone (hier: repräsentativ Klone 5 und 18) und HEK-Flp-InTM-293-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden für 72 h mit Saccharose (Sac) oder Trehalose (Th) behandelt. Die unbehandelte (Ub) Probe der jeweiligen Zelllinie diente als Kontrolle. Für die Markierung der Lysosomen wurde der spezifische Farbstoff Lysotracker verwendet (rot). Die Zellkerne wurden mit dem dsDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt (blau). Mittels PFA wurden die Zellen fixiert. Maßstab= 10 µm.

Zusätzlich zur mikroskopischen Auswertung wurde die Intensität des Lysotracker-Signals im Plattenreader quantifiziert. Wie sich schon in der mikroskopischen Analyse angedeutet hatte, konnte auch hier eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz durch die Behandlung mit Saccharose und Trehalose festgestellt werden. Ebenso war, wie von Zellen mit einem lysosomalen Defekt zu erwarten ist, von vornherein eine höhere Fluoreszenz der AGA-KO-Flp-In-Zellen zu beobachten. Zusammenfassend konnte eine steigende Tendenz der Anzahl der Lysosomen durch das Fehlen von AGA, sowie durch die Behandlung mit Trehalose oder Saccharose festgestellt werden.

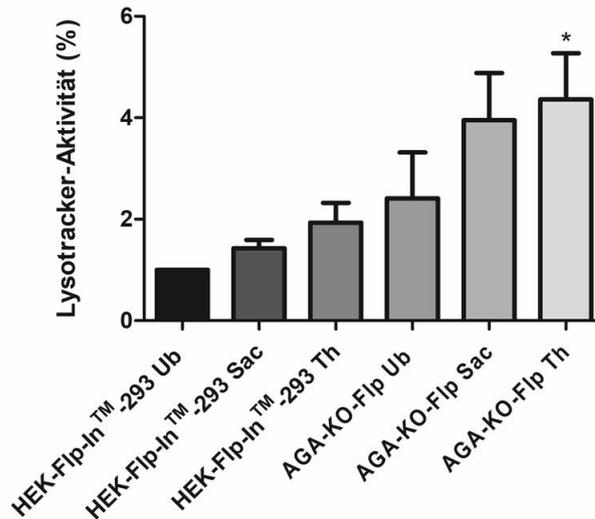


Abbildung 8: Fluoreszenzmessung von HEK-Flp-In-Zellen nach Behandlung und Lysotrackerfärbung mit einem Mikrotiterplatten-Reader: HEK-Flp-InTM-293- und AGA-KO-Flp-In-Zellen nach Behandlung mit Saccharose (Sac) oder Trehalose (Th) und anschließender Lysotrackerfärbung. Die Fluoreszenz der HEK-Flp-InTM-293 unbehandelt (Ub) wurde auf 100% gesetzt. Zur Kontrolle wurden die unbehandelten Proben mitgefärbt. Die Lysotrackerbehandlung erfolgte für 1 h vor der Messung. Die Werte für die AGA-KO-Flp-In-Klone 5, 9, und 18 sind im Diagramm als „AGA-KO-Flp“ zusammengefasst. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei separat durchgeführten Experimenten. N=3, *p<0.05.

4.5 Expression von AGA-Varianten in AGA-KO-HEK-In-Zellen

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage, ob und wie die ausgewählten AGA-Varianten im Vergleich zum AGA-Wildtyp prozessiert werden. Dafür wurden die entsprechenden AGA-Konstrukte in AGA-KO-Zellen transient (HEK293T) transfiziert. Nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt. Das Screening der transfizierten Zellen erfolgte über Western Blots und der fluorometrischen Messung der AGA-Aktivität.

4.5.1 Transiente Expression des AGA-L126V-pcDNA3-Konstruktes in AGA-KO-Zellen

Die Transfektion des mittels Mutagenese erzeugten AGA-L126V-pcDNA3-Konstruktes erfolgte in AGA-KO-Zellen. Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, erfolgte die Zelllysatherstellung nach der transienten Transfektion, um im Anschluss AGA über Western Blot zu detektieren und mithilfe der Aktivitätsmessung zu analysieren.

Als Kontrolle wurde der AGA-WT verwendet. Nicht transfizierte AGA-KO-Zellen wurden als Negativkontrolle benutzt. Es wurden drei Klone des AGA-L126V-pcDNA3-Konstruktes für den Versuch verwendet, die in der Abbildung 9 durchnummeriert (1-3) sind.

In der Abbildung 9 ist deutlich zu erkennen, dass bei allen drei AGU-L126V-Proben der AGA-Vorläufer vollständig prozessiert wird. Sowohl AGA-Vorläufermoleküle („Precursor“, 42 kDa) als auch die Pro- α - (27 kDa), β - (17 kDa) und α -Untereinheit (24 kDa) sind detektierbar. Die β '-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 14 kDa ist aufgrund der geringen Menge oft nicht zu detektieren. Zudem ist eine vollständige AGA-Prozessierung beim AGA-WT sichtbar. AGA-Vorläufermoleküle und die Pro- α -Untereinheit sind schwach zu sehen. Auf der Höhe von 24 kDa ist eine deutliche Ansammlung der α -Untereinheit des AGA-Moleküls zu erkennen. Die schwächere Detektierbarkeit der einzelnen Untereinheiten kann vermutlich auf die Proteinkonzentration der Western Blot der WT-Probe und/oder auf den AGA-Antikörper zurückgeführt werden. Die Negativkontrolle weist, wie erwartet, kein AGA-Signal auf.

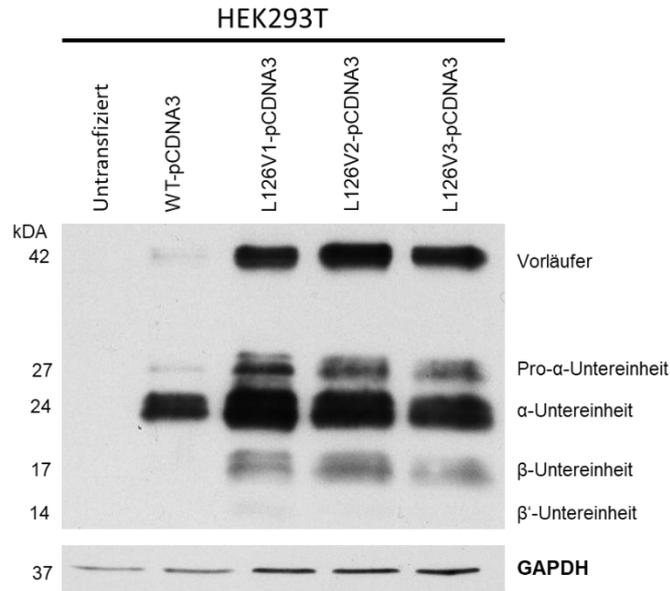


Abbildung 9: Western Blot von AGA-L126V-pCDNA3 in AGA-KO-Zellen nach transients Transfektion: Western Blot von drei transient transfizierten AGA-L126V-pCDNA3-Klonen (hier: von 1-3 durchnummeriert) in AGA-KO-Zellen. Als Kontrolle wurden der transfizierte WT und die nicht transfizierten AGA-KO-Zellen verwendet. Nach der transienten Transfektion folgte die Herstellung der Zellysate mit anschließender Messung der Proteinkonzentration nach Bradford. Die Lysate wurden auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion mit anti-AGA- und anti-GAPDH-Antikörpern (Ladekontrolle). Die Untereinheiten (hier: nur Pro- α -Untereinheit, α - und β -Untereinheit sichtbar) sind auf der entsprechenden Höhe der Signale beschriftet. Das als Ladekontrolle verwendete GAPDH-Protein ist bei einem Molekulargewicht von 37 kDa abgebildet.

Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, wurde die AGA-Aktivität der AGU-L126V-Variante im Vergleich zum Wildtypen untersucht (Abbildung 10). In der folgenden Abbildung ist eine AGA-Aktivität zwischen 50-70% bei der L126V-Variante zu vermerken. Bei der Negativkontrolle ist keine AGA-Aktivität zu messen, während die transfizierten WT-Zellen auf 100% AGA-Aktivität definiert wurden.

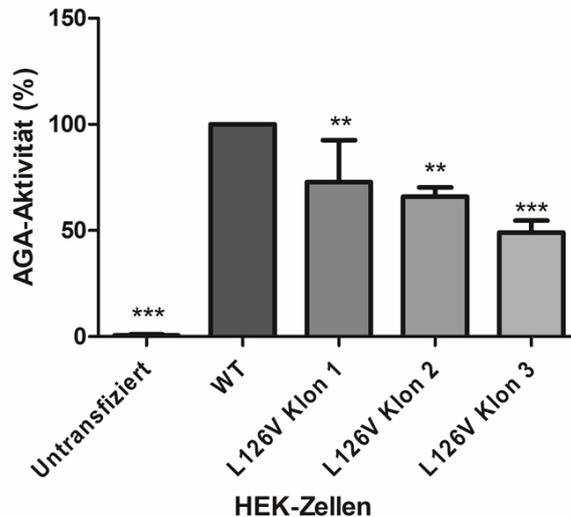


Abbildung 10: AGA-Aktivität der AGU-L126V-Mutation im Vergleich zum AGA-WT nach transienter Transfektion: Die hergestellten Zelllysate der AGU-L126V-Variante wurden zur Messung der AGA-Aktivität verwendet. Die L126V-Klone wurden auf der Abbildung durchnummeriert (Klon 1, Klon 2 und Klon 3). Die AGA-Aktivität der verschiedenen Proben wurde zum WT verglichen. N=4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.5.2 Transiente Expression von AGA-pCDNA5/FRT-Konstrukten in AGA-KO-Zellen

Die folgenden AGA-Varianten wurden im Vergleich zum AGA-Wildtypen untersucht: C179R, E340X, FIN-major, P28L, Q137X, R116Q, R116W, R107X, W168X und G302R. Nicht-transfizierte AGA-KO-Zellen dienten als Negativkontrolle. Die ausgewählten AGA-Varianten wurden zuvor in das pCDNA5/FRT-Plasmid kloniert. Nach der transienten Transfektion in AGA-KO-HEK-Zellen wurden Zelllysate hergestellt. Mithilfe von Western Blots wurde AGA detektiert. Im Anschluss wurden die Zelllysate zur Messung der AGA-Aktivität verwendet. Das Molekulargewicht des nicht-prozessierten AGA-Vorläufers liegt bei ungefähr 40 kDa, während die Pro- α -Untereinheit 27 kDa und die β -Untereinheit 17 kDa aufweisen. Ein Molekulargewicht von 24 kDa bzw. 14 kDa ist bei der reifen α - und β' -Untereinheit zu erwarten.

Anhand der Western-Blot-Analyse (Abbildung 11) ist eine vollständige Prozessierung des AGA-Wildtyps zu beobachten. Es ist die Pro- α - und β -Untereinheit bei einem Molekulargewicht von 27 und 17 kDa zu erkennen. Zudem ist eine weitere Prozessierung in die reife α -Untereinheit und β' -Untereinheit auf der Höhe von 24 und 14 kDa sichtbar. Dagegen ist bei den AGA-Varianten C179R, E340X, FIN-major, R116W, W168X und

G302R nur eine Ansammlung von nicht-prozessiertem AGA auf der Höhe von 42 kDa, ohne weitere Prozessierung in die AGA-Untereinheiten, zu erkennen.

Des Weiteren ist eine teilweise Prozessierung bei den Varianten AGA-P28L und -R116Q zur α -Untereinheit bei einem Molekulargewicht von 24 kDa zu beobachten. Eine weitere Prozessierung in die β' -Untereinheit ist aufgrund der niedrigen Menge häufig nicht zu vermerken.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den AGA-Varianten Q137X und R107X weder eine AGA-Prozessierung noch eine Akkumulation von Vorläufermolekülen erfolgt. Die Negativkontrolle bestehend aus nicht transfizierten AGA-KO-Zellen weist, wie erwartet, kein AGA-Polypeptid auf.

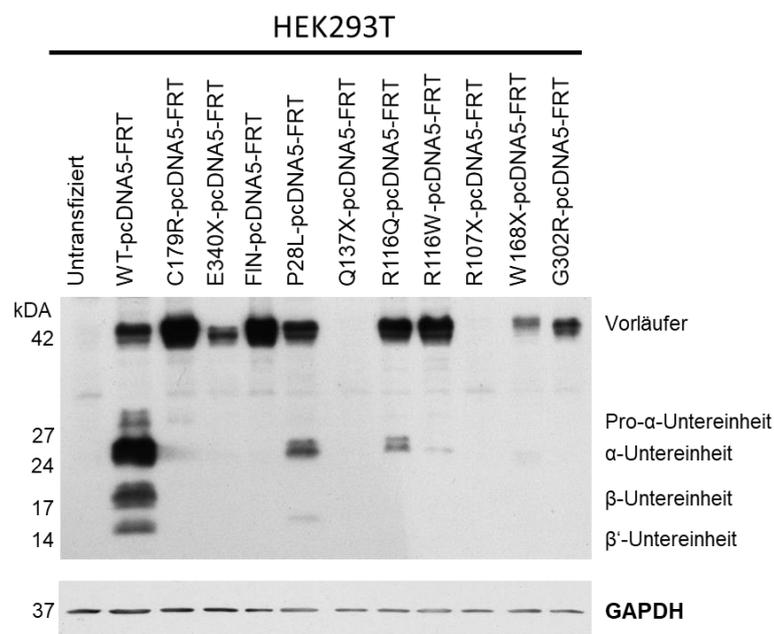


Abbildung 11: Western Blot von AGA-pCDNA5/FRT-Varianten in AGA-KO-Zellen nach transients Transfektion: Western Blot von AGA-KO-Zellen nach Transfektion mit AGA-pCDNA5/FRT-Konstrukten C179R, E340X, FIN-major (hier: mit „FIN“ abgekürzt), P28L, Q137X, R116Q, R116W, R107X, W168X, G302R in. Als Kontrollen wurden der transfizierte WT und die nicht transfizierten AGA-KO-Zellen verwendet. 72 h nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt und eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt. Gleiche Proteinmengen der Proben wurden auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit anti-AGA-Antikörper detektiert. Der AGA-Vorläufer als auch die Pro- α -, β -, reife α - und β' -Untereinheit sind in der Abbildung neben den dazugehörigen Signalen auf der Höhe des entsprechenden Molekulargewichts dargestellt. Das als Ladekontrolle verwendete GAPDH-Protein ist bei einem Molekulargewicht von 37 kDa abgebildet.

Als Nächstes wurde die AGA-Aktivität der verschiedenen AGA-Varianten im Vergleich zum Wildtypen analysiert. In der Abbildung 12 ist bei den AGA-Varianten C179R, P28L, und R116Q eine geringe AGA-Restaktivität von unter 20% im Vergleich zum AGA-Wildtypen sichtbar. Die Varianten FIN-major, E340X, Q137X, R116Q, R116W, R107X, W168X und G302R zeigen keine oder nur eine minimale Restaktivität von nahezu 0%.

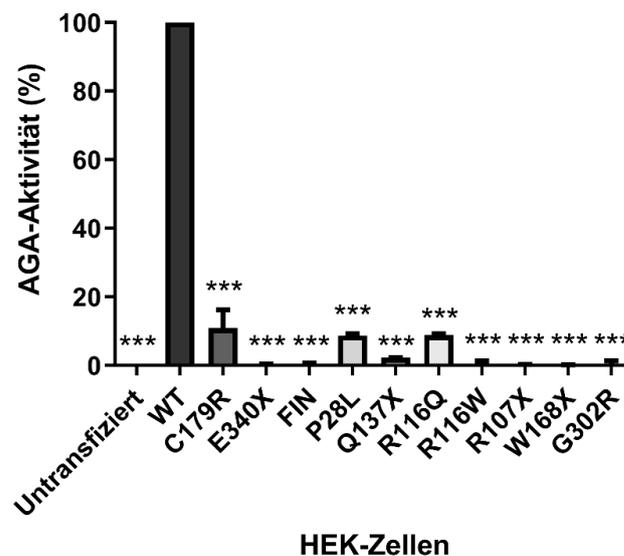


Abbildung 12: AGA-Aktivität der AGA-Varianten im Vergleich zum AGA-WT nach transienter Transfektion: Mit den hergestellten Lysaten (nicht transfizierte AGA-KO-Zellen, WT, C179R, E340X, FIN-major, P28L, Q137X, R116Q, R116W, R107X, W168X, G302R) wurde fluorometrisch die AGA-Aktivität gemessen. Die AGA-Aktivität der verschiedenen Proben wurde zum WT (100%) verglichen und in % angegeben. N=3, ***p<0.001 vs. WT.

4.6 Generierung und Charakterisierung der AGA-HEK-Flp-In-Zellen

Nach der transienten Transfektion verschiedener AGA-Varianten erfolgte die stabile Transfektion der Varianten FIN-major, P28L und L126V, sowie des AGA-WT in die zuvor generierten AGA-KO-Flp-In-Zellen. In dieser Arbeit wurde die stabile Transfektion ausgewählter AGA-Varianten über das Flp/FRT-System vermittelt (s. Abbildung 13). Die parentalen Zellen besitzen eine Flp-Rekombinase-Erkennungssequenz, welche stabil in die genomische Sequenz der parentalen Zellen

integriert ist. Die Erkennungssequenz befindet sich direkt 3' nach dem Start-Codon zwischen dem kodierenden Bereich eines Fusionsproteins aus β -Galactosidase und einer Zeocin-Resistenz. Infolgedessen besitzen Zellen des Flp-InTM-Systems β -Galactosidase-Aktivität und eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. Das hier verwendete Plasmid pOG44 kodiert für die benötigte Flp-Rekombinase. Die Flp-InTM-Zellen wurden gemeinsam mit den pOG44 – als auch mit den gewünschten Transgen enthaltenen pcDNA5/FRT-Plasmiden transfiziert. Bei der FLP-vermittelten Rekombination wird die Plasmid-DNA in das Chromosom inseriert, sodass die kodierende Sequenz des alten Selektionsmarkers durch die des neuen ersetzt wird. Dadurch verlieren die Zellen ihre ursprüngliche Antibiotikaresistenz und entwickeln dafür eine andere Antibiotikaresistenz (s. Abbildung 13). Mithilfe des Antibiotikums Zeocin lässt sich der Einbau des gewünschten Inserts nach erfolgreich homologer Rekombination bestätigen. Durch die Integration des pcDNA5/FRT-Plasmides am Ort der FRT-Sequenz befindet sich der codierende Bereich für die Hygromycin-Resistenz stromabwärts vom SV40-Promotor, sodass das vorher bestehende Start-Codon nun den Anfang des Leserahmens der Hygromycin-Resistenz bildet (s. Abbildung 13). Die transfizierten Zellen besitzen eine Hygromycin-Resistenz. Nach Selektion der Zellen durch Hygromycin wurden die überlebenden transfizierten Klone gepickt und kultiviert.

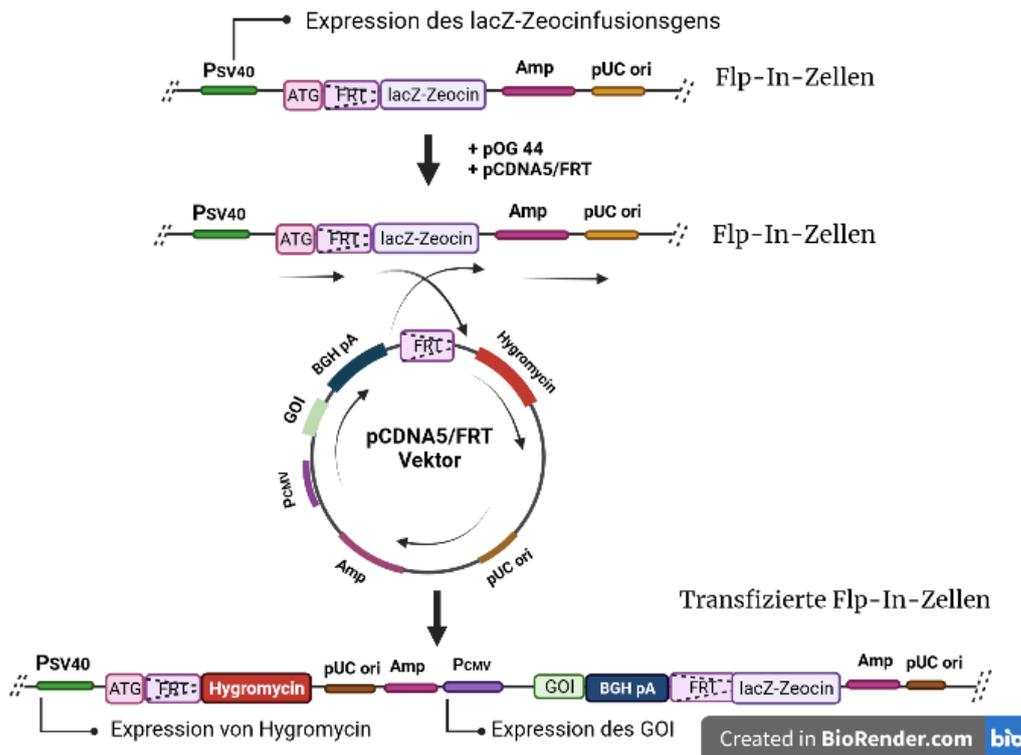


Abbildung 13: FLP-InTM-Mechanismus, modifiziert nach dem Manual des FLP-InTM-Systems (Version E, November 2010, Invitrogen): Eine FLP-InTM-Zelllinie mit eingebauter FRT-Site. Die FLP-InTM-Zellen wurden mit den pOG44 – als auch mit den gewünschten Transgen enthaltenden pcDNA5/FRT-Plasmiden kotransfiziert. Dadurch erfolgt über die FRT-Site eine Integration des GOI (Gene of Interest) und des Hygromycin-Resistenzgens in das Genom der FLP-InTM-Zelle. Daraus resultiert eine Zelle mit einem SV40-Promoter-getriebenem Hygromycin-Resistenzgen und einem CMV-Promotor (hier: als P_{SV40} und P_{CMV} abgekürzt) getriebenem GOI. Folgende Begriffe werden in der Abbildung mit Abkürzungen bezeichnet: Amp (Ampicillin), pUC origin (pUC ori), LacZ-ZeocinTM-fusionsgens (lacZ-Zeocin), ATG-Initiationscodon (ATG) und Rinder-Wachstumshormon poly-A-Signal (BGH pA). Die Abbildung wurde mithilfe von Biorender.com erstellt.

Mithilfe des Antibiotikums Zeocin und der Messung der β -Galactosidase-Aktivität lässt sich der Einbau des gewünschten Transgens nach erfolgreich homologer Rekombination bestätigen. Die stabil mit dem Transgen transfizierten Zelllinien reagieren sensitiv gegenüber Zeocin und weisen keine β -Galactosidase-Aktivität mehr auf. Dementsprechend verblieben die korrekt transfizierten Lysatproben farblos nach dem Durchführen des β -Galactosidase-Assays (s. Abbildung 12). Zudem starben die erfolgreich transfizierten AGA-HEK-FLP-In-Zellen durch die Zugabe von Zeocin in das Nährmedium ab. Anhand der Ergebnisse der Zeocin-Empfindlichkeit und dem β -Galactosidase-Assay wurde die erfolgreiche stabile Transfektion der folgend aufgelisteten Zelllinien (Tabelle 12) mithilfe des FLP-In/FRT-Systems bestätigt.

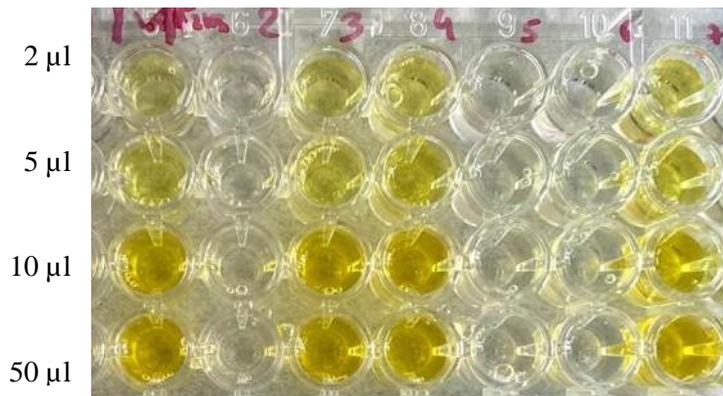


Abbildung 14: Beispiel der β -Galactosidase-Aktivitätsmessung anhand von AGA-Flp-In-Klonen: Die zu untersuchenden Klone wurden in verschiedenen Mengen (2 μ l, 5 μ l, 10 μ l und 50 μ l) mit Assay 2x Buffer verdünnt. Die verschiedenen Lysatproben wurden zur Übersicht nummeriert (hier: Probe 1-7 in Rot auf der Messplatte beschriftet). Als Negativkontrolle wurde eine verdünnte Lysatprobe nicht transfizierten HEK-Flp-In-Zellen (hier: die zweite dargestellte Probe) verwendet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C zeigten Klone mit einer β -Galactosidase-Aktivität eine gelbe Färbung auf. Die negativen HEK-Flp-In-Klone verblieben farblos.

Tabelle 12: Zelllinien mit erfolgreicher homologer Rekombination

AGA-Variante	Transfizierter AGA-KO-Flp-In-Klon
WT-2	Klon 5
WT-10	Klon 5
WT-11	Klon 5
WT-12	Klon 5
WT-4	Klon 18
FIN-major-11	Klon 5
FIN-major-2	Klon 9
FIN-major-3	Klon 9
FIN-major-9	Klon 9
L126V-1	Klon 18
P28L-2	Klon 5
P28L-3	Klon 5

4.7 Expression von AGA-Varianten in stabil transfizierten AGA-KO-Flp-In-Zellen

Nach der Selektion der erfolgreich stabil transfizierten Zellen anhand der Zeocin-Empfindlichkeit und β -Galactosidase-Aktivität, erfolgte das Screening der transfizierten AGA-HEK-Flp-In-Klone mittels Western Blot und der Messung der AGA-Aktivität. Die korrekt stabil transfizierten Klone der einzelnen Zelllinien wurden zur Übersicht durchnummeriert. Diese Nummerierung spiegelt sich in den dazugehörigen Abbildungen wider. Insgesamt wurde die stabile Transfektion mittels FLP/FRT-System zweimal durchgeführt. Im ersten Versuch erfolgte die Transfektion der AGA-KO-Flp-In-Klone 5 und 9 mit den AGA-pCDNA5/FRT-Konstrukten WT, FIN-major und P28L. In einem weiteren Versuch wurden die AGA-KO-Flp-In-Klone 5 und 18 mit den zuvor genannten Konstrukten, als auch dem AGA-L126V-pCDNA5/FRT-Plasmid transfiziert. Die Ergebnisse der beiden Versuche sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

Anhand der Western-Blot-Analyse in Abbildung 15 ist eine vollständige AGA-Prozessierung der stabil transfizierten WT-2-Klon 5 zu vermerken. Vorläufermoleküle sind bei einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa zu beobachten. Die weiteren Untereinheiten sind vollständig von der Pro- α - bis hin zur β -Untereinheit auf der Höhe von 27 -, 24 - und 17 kDa zu sehen. Die β' -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 14 kDa ist aufgrund der geringen Menge häufig nicht detektierbar. In der Abbildung 8 ist deutlich zu erkennen, dass beim WT-3-Klon 5, trotz einer niedrigeren Gesamtproteinmenge, die α -Untereinheit sichtbar ist. Bei allen dargestellten FIN-major-Flp-In-Klonen ist das Vorhandensein von AGA-Vorläufermoleküle ohne weitere Prozessierung zu sehen. Der P28L-2- und P28L-3-Klon 5 zeigt neben Vorläufern (42 kDa) auch eine geringfügige Prozessierung der AGA- α -Untereinheit. Die restlichen P28L-Klone weisen nur Vorläufer auf.

In der Abbildung 15 ist die AGA-Aktivität der stabil transfizierten AGA-Varianten im Vergleich zum Wildtypen dargestellt. Die verschiedenen Zelllinien wurden zum WT-2-Klon 5 verglichen, dessen AGA-Aktivität auf 100% festgelegt wurde. Im Vergleich dazu ist eine geringe Aktivität von unter 20% beim WT-3-Klon 5 zu vermerken. Bei allen FIN-major-Klonen ist keine AGA-Aktivität messbar. Eine Restaktivität zwischen 15-20% ist bei allen dargestellten P28L-Klonen zu beobachten.

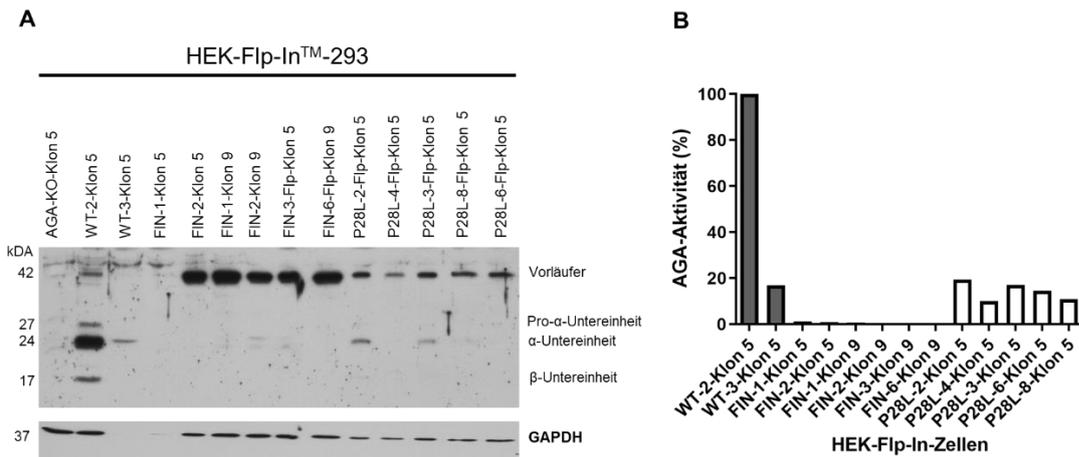


Abbildung 15: Stabile Transfektion der AGA-KO-Flp-In-Klone 5 und 9 (A-B): **A)** Western Blot von stabil transfizierten AGA-pCDNA5/FRT-Konstrukten WT, FIN-major (hier: mit „FIN“ abgekürzt), und P28L in AGA-KO-Flp-In-Zellen. Zur Kontrolle wurde der AGA-KO-Flp-In-Klon 5 verwendet. Nach der Transfektion folgte die Herstellung der Zelllysate mit anschließender Messung der Proteinkonzentration nach Bradford. Jeweils gleiche Proteinmengen der Proben wurden auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels anti-AGA- und anti-GAPDH-Antikörper (als Ladekontrolle) detektiert. Die Untereinheiten (hier: nur Pro- α -, α - und β -Untereinheit sichtbar) sind auf der entsprechenden Höhe der Signale beschriftet. Das als Ladekontrolle verwendete GAPDH ist bei einem Molekulargewicht von 37 kDa abgebildet. **B)** Aktivität von AGA-Varianten im Vergleich zum AGA-WT nach stabiler Transfektion. Mit den hergestellten Lysaten (WT, FIN-major und P28L) wurde fluorometrisch die AGA-Aktivität gemessen. Die AGA-Aktivität der verschiedenen Proben wurden zum WT verglichen und in % angegeben. N=1.

In der Abbildung 16 ist beim WT4-Klon 18 eine vollständige AGA-Prozessierung bis hin zur β' -Untereinheit zu erkennen. Bei den weiteren WT-Klonen ist nur die α -Untereinheit (24 kDa) zu sehen. Zudem erscheint bei der WT-12-Klon-5-Probe die β' -Untereinheit bei einem Molekulargewicht von 14 kDa. Die FIN-10- und FIN-12-Klone 5 weisen nur AGA-Vorläufer auf. Anhand der Ergebnisse ist eine Diskrepanz zwischen den L126V-Klonen zu vermerken. Die Klone L126V-1 und L126V-5 zeigen eine AGA-Prozessierung, während beim L126V-6-Klon nur AGA-Vorläufer zu beobachten sind. Sowohl die α -Untereinheit als auch die β' -Untereinheit sind bei einem Molekulargewicht von 24 – bzw. 14 kDa zu erkennen. Der P28L-10-Klon 5 zeigt keine AGA-Prozessierung.

Die Abbildung 16 stellt die AGA-Aktivität der verschiedenen AGU-Varianten im Vergleich zum WT-12-Klon 5 dar, dessen Aktivität auf 100% festgelegt wurde. Die WT-Klone weisen alle eine AGA-Prozessierung auf, jedoch korrelieren die Aktivitäten der WT-Klone nicht mit dem dargestellten Expressionslevel. Die Aktivität der WT-Klone (WT-4, WT-10 und WT-11) liegt bei ungefähr 40% im Vergleich zum WT-12-Klon 5.

Da dieser Versuch zum Screening der hergestellten HEK-Flp-In-Zellen nur einmal durchgeführt worden ist, kann man bei den vorliegenden Diskrepanzen zwischen den Klonen von einem technischen Problem bzw. Messfehler ausgehen. Die Aktivität der FIN-10- und FIN-12-Klone 5 liegt bei nahezu 0%. Die transfizierten L126V-1- und L126V-5-Klon 18 weisen eine AGA-Aktivität von 40-55% auf. Dagegen liegt der Wert für den L126V-6-Klon 18 bei ca. 10% und dem P28L-10-Klon 5 bei ungefähr 5%.

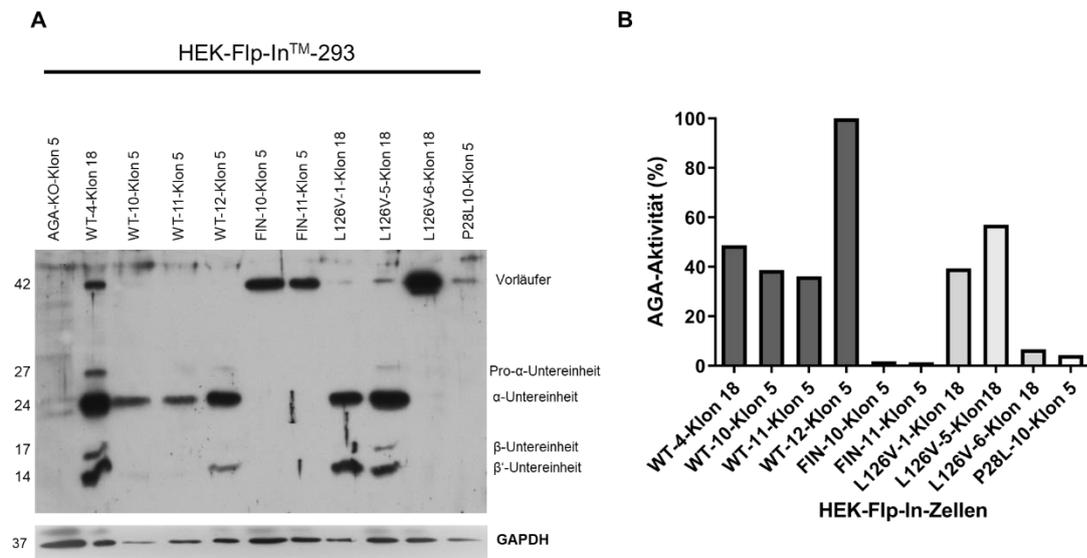


Abbildung 16: Stabile Transfektion der AGA-KO-Flp-In-Klone 5 und 18 (A-B): **A)** Western Blot von stabil transfizierten AGA-pCDNA5/FRT-Konstrukten WT, FIN-major (hier: mit „FIN“ abgekürzt), P28L und L126V in AGA-KO-Zellen. Als Kontrolle wurde der parentale AGA-KO-Klon 5 verwendet. Nachdem Zelllysate hergestellt wurden, folgte die Messung der Proteinkonzentration nach Bradford. Jeweils gleiche Proteinmengen der Proben wurden auf einem 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt mit anti-AGA-Antikörper detektiert. Die AGA-Untereinheiten sind auf der entsprechenden Höhe der Signale beschriftet. Das GAPDH-Protein (Ladekontrolle) ist bei einem Molekulargewicht von 37 kDa abgebildet. **B)** AGA-Aktivität von AGA-Varianten (WT, FIN-major, P28L und L126V) im Vergleich zum AGA-WT nach stabiler Transfektion. N=1.

4.8 AGA-Aktivitätsmessungen

Der fluorometrische AGA-Aktivitätsassay nach Voznyi et al. 1993 und Mononen et al. 1993b wurde zur Messung der AGA-Aktivität in L126V- und FIN-Major-Patientenfibroblasten und Patientenseren verwendet. Nach der Ernte der Zellen in PBS wurde das Zellpellet in 200 μ l Lysepuffer resuspendiert und mindestens 30 Minuten auf Eis lysiert. Nach der photometrischen Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

wurden die Ansätze zusammengefügt und bei 37°C inkubiert. Es wurde eine Inkubationszeit von 24 h verwendet. Durch den Zusatz von 200 µl McIlvain's Puffer pH 4,5 wurde die Reaktion beendet. Anschließend erfolgte die Messung im Plattenreader. Nach Angaben von Mononen et al. wurde die Berechnung in µU/mg Protein angegeben. Hierbei entspricht 1 U= µmol freigesetztem AMC pro min. Das Berechnen der AGA-Aktivität wurde bei diesen Versuchen mit Hilfe einer Standardreihe in µmol umgesetztes Substrat pro g Protein bzw. in mU/L Serum (1 U= 1 µmol/min) angegeben. Zudem wurde die AGA-Aktivität in % Aktivität/ 24 h berechnet. Aufgrund der Eigenfluoreszenz von Asp-AMC war dieses auch Bestandteil der Standards. Es wurde eine von den Empfehlungen von Mononen et al. und Voznyi et al. abweichende, niedrigere Asp-AMC-Konzentration von 25 µM für die Versuche benutzt.

4.8.1 AGA-Aktivitätsmessung in L126V-Patientenfibroblasten

Da die AGA-Variante L126V in HEK293T-Zellen eine unerwartet hohe Enzymaktivität aufwies, wurde die AGA-Aktivität auch in primären dermalen Fibroblasten eines AGU-Patienten mit der L126V-Variante untersucht. Hierfür wurde eine Hautbiopsie entnommen und daraus eine Fibroblastenkultur angelegt. Als Kontrolle wurden WT- und AGU-FIN-Major-Fibroblasten (Banning et al. 2016) verwendet. Die Fibroblasten wurden auf 10 cm Petrischalen kultiviert und in PBS, wie oben beschrieben, geerntet.

Anhand der Abbildung 17 ist eine reduzierte AGA-Aktivität beider Varianten im Vergleich zum WT-Fibroblasten zu vermerken. Während die L126V-Variante eine Aktivität von ca. 30% in den Fibroblasten aufweist, liegt der Wert in den Fibroblasten des FIN-major-Patienten deutlich niedriger, bei 8%.

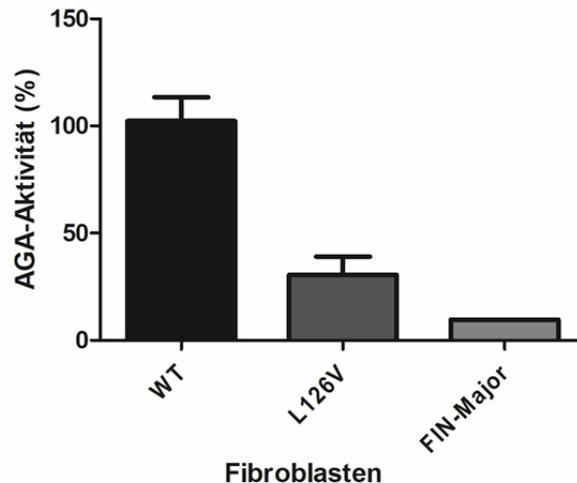


Abbildung 17: AGA-Aktivitätsmessung in L126V- und FIN-major-Patientenfibroblasten: Nach Zellysatherstellung und Messung der Proteinkonzentration folgte die Aktivitätsmessung nach einer 24 h Inkubation. Als Referenz dienen WT-Fibroblasten. Diese wurden auf 100% gesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen (N=3).

4.8.2 AGA-Aktivitätsmessung in L126V-Patientenserum

Die AGA-Aktivität wurde in den Seren von Patienten mit der L126V- und der AGU-FIN-major-Variante untersucht. Als Referenz diente das Serum eines gesunden Probanden. Anhand der Standardreihe wurde die AGA-Aktivität in mU/L berechnet, wobei 1 U = 1 μ mol/min entspricht (s. Abbildung 18 und 19A). Zudem wird die AGA-Aktivität in % der Aktivität des gesunden Probanden angegeben (s. Abbildung 19B).

In Abbildung 19 werden die AGA-Aktivitäten in Seren von AGU-L126V- und -FIN-major-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Probanden dargestellt. Anhand des Diagramms ist zu erkennen, dass der Patient mit der L126V-Variante eine AGA-Aktivität von 0,79 mU/L (34,1%) aufweist, während die gesunde Kontrolle einen Wert von 2,34 mU/L (100%) besitzt. Eine deutlich geringere Aktivität von 0,2 mU/L (8,5%) lässt sich im Serum des FIN-major-Patienten sicherstellen.

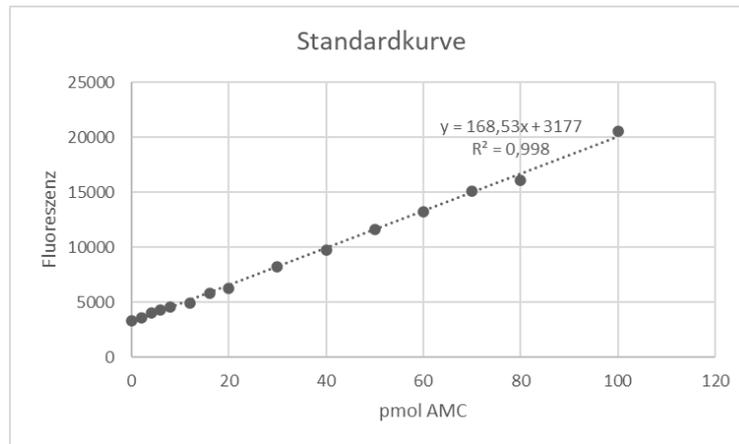


Abbildung 18: Beispiel einer Standardkurve des AMC: Die Standardkurve wurde in McIlvaine-Puffer pH 4.5 hergestellt. Dafür wurde eine AMC-Standardreihe (0-100 pmol) bestehend aus 15 Proben mit einer gleichbleibenden summierten Konzentration von 12,5 μ m Asp-AMC + AMC in künstlicher Serummatrix angesetzt. Die Messung erfolgte bei einer Exzitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm.

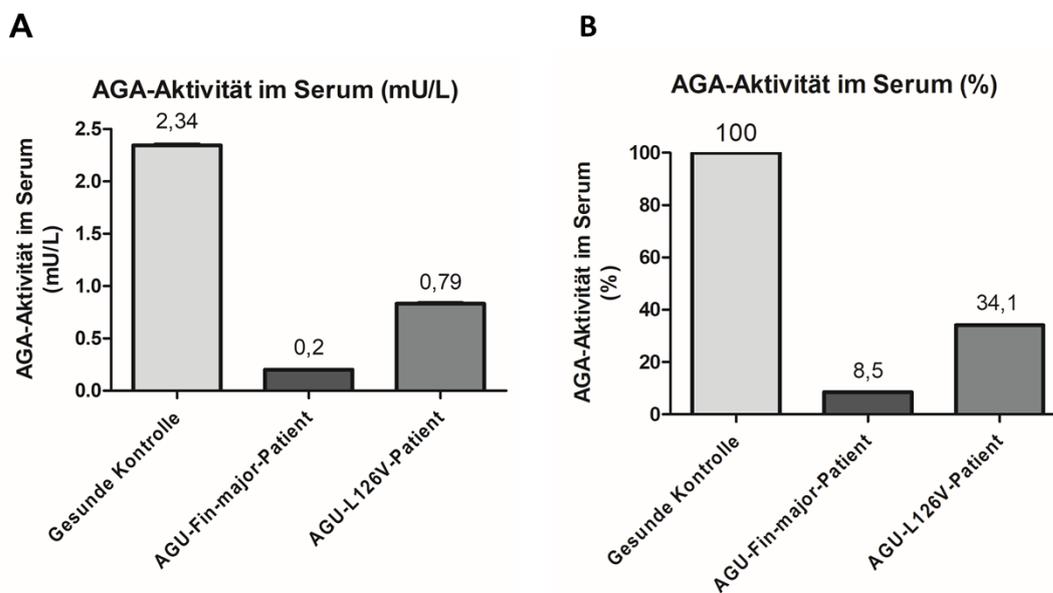


Abbildung 19: AGA-Aktivitätsmessung in Patienten- und Kontrollseren (A-B): Die Aktivitätsmessungen erfolgten nach 24 h Inkubation in Triplikaten. **A)** AGA-Aktivität in L126V- und FIN-major-Patientenserum anhand der Standardreihe berechnet und in mU/L angegeben **B)** AGA-Aktivität in L126V- und FIN-major-Patientenserum umgerechnet auf % der gesunden Kontrolle. Als Kontrolle wurde das Serum eines gesunden Spenders verwendet.

5 Diskussion

5.1 Etablierung eines AGU-Zellmodells mithilfe des Flp/FRT-Systems

Um den Einfluss einer potentiell pathogenen Genvariante auf das AGA-Protein zu entschlüsseln, wurde im Rahmen dieser Arbeit angestrebt, mithilfe des FRT/FLP-Systems ein stabiles zelluläres Modell zu etablieren, welches die Untersuchung der AGA-Varianten langfristig erleichtert. Ein solches Modell bietet den Vorteil, dass, im Gegensatz zu primären Hautfibroblasten, der genetische Hintergrund der Zellen identisch ist, wodurch ein direkter Vergleich der einzelnen AGA-Varianten ermöglicht wird. Außerdem sind HEK293T-Zellen, anders als primäre Zellkulturen, für die längerfristige Kultivierung geeignet.

Bevor eine stabile Transfektion der AGA-Varianten in die HEK-Flp-In-Zellen erfolgen konnte, war es notwendig, AGA-KO-Flp-In-Zellen zu generieren. Es konnten erfolgreich drei AGA-KO-Flp-In-Klone (Klone 5, 9 und 18) über das CRISPR/Cas9-System generiert werden (s. Abbildung 5), die auch in Zukunft für den Einbau weiterer AGA-Varianten genutzt werden können. In allen drei Klonen wurde der Knockout von AGA mittels Enzymaktivität und Sequenzanalyse bestätigt. Da beim Knockoutklon Nummer 18 die Mutation anhand der Sequenzanalyse am eindeutigsten zu identifizieren war (s. Abbildung 6), ist dieser Klon für zukünftige Knock-In-Experimente am ehesten zu empfehlen. Zudem konnte mittels LysoTRACKERmarkierung eine verstärkte Fluoreszenz und Anzahl gefärbter Lysosome der AGA-KO-Flp-In-Zellen, verglichen zu den HEK-Flp-InTM-293-Zellen, vermerkt werden (s. Abbildung 7 und 8). Durch Färbung der Zellen nahm die Intensität der gefärbten Vesikel, insbesondere bei den AGA-KO-Flp-In-Zellen, zu.

In der vorliegenden Arbeit wurden bereits zahlreiche AGA-Varianten in den pcDNA5/FRT-Vektor kloniert. Mittels stabiler Transfektion über das Flp/FRT-System konnten konstitutiv exprimierende Zelllinien der AGA-Varianten WT, FIN-major, P28L und L126V etabliert werden. Die stabile Transfektion und korrekte Integration der ausgewählten AGA-Varianten und des WTs wurden zusätzlich durch die Zeocin-Selektion und der β -Galactosidaseaktivität bestätigt. (s. Tabelle 12). Eine Überprüfung

der erhaltenen Zellklone mittels Zeocin und β -Galactosidase sollte auf jeden Fall durchgeführt werden, da nur so ausgeschlossen werden kann, dass die Plasmide nicht zufällig an unerwünschten Stellen des Genoms integriert wurden.

Wie bereits beim Screening der hergestellten AGA-Flp-In-Klone mittels Western Blots und Messung der Enzym-Aktivität festgestellt wurde, sind Diskrepanzen zwischen den Klonen der jeweiligen AGA-Varianten zu erkennen. Dazu gehörte unter anderem der P28L-10-Klon 5, der im Vergleich zu den weiteren P28L-Flp-In-Klonen (10%-15%) eine niedrigere AGA-Aktivität von ungefähr 5% aufweist (s. Abbildung 16). Anhand der Analyse mittels Western Blot konnten sowohl beim P28L-10-Flp-In-Klon 5 als auch bei den Flp-In-Klonen P28L-4, P28L-6 und P28L-8 nur Vorläufer ohne weitere AGA-Prozessierung beobachtet werden (s. Abbildung 15). Bei den Flp-In-Klonen P28L-2 und P28L-3 war neben Vorläufermolekülen auch eine geringfügige Prozessierung der AGA- α -Untereinheit zu sehen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen der transient transfizierten AGA-P28L-Zellen überein (s. Abbildung 11 und 12).

Neben Messfehlern und technischen Problemen, die Einfluss auf die Ergebnisse haben können, wiesen einige generierte AGA-Flp-In-Klone, darunter auch die P28L-Flp-Klone, weiterhin eine β -Gal-Aktivität und/oder eine Resistenz gegen Zeocin auf. Diese Flp-In-Zelllinien konnten durch die Zeocin-Selektion und dem β -Galactosidase-Assay aussortiert werden. Nach vollständiger Selektion der stabilen P28L-Flp-Klone konnte bei den Klonen P28L-2 und P28L-3 von einer korrekten Integration der zu untersuchenden AGA-Variante ausgegangen werden (s. Tabelle 12). Nur durch diese mehrschrittige Zellselektion kann der korrekte Einbau des GOI (*Gene of Interest*) in das Genom der HEK-Flp-In-Zellen und somit auch die konstante homogene Expression dessen Genprodukts sichergestellt werden.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden sowohl transiente als auch stabile Transfektionen mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Transfektionen stellen eine Methode dar, um fremde Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen einzuschleusen und damit die genetische Ausstattung der Wirtszelle zu verändern (Chong et al. 2021; Chow et al. 2016; Kim und Eberwine 2010). Die Fähigkeit genetisch modifizierte Wirtszellen zu generieren ermöglicht sowohl die Untersuchung physiologischer zellulärer Prozesse und pathologischer molekularer Mechanismen, als auch die Auswirkungen gentherapeutischer Maßnahmen (Chong et al. 2021). Durch das Verständnis des

molekularen Krankheitsweges können spezifische Biomarker entdeckt werden, welche zur Diagnose und Prognose von Krankheiten eingesetzt werden können (Chong et al. 2021; Roser et al. 2018; Ye et al. 2018). Außerdem kann die Transfektion in der Gentherapie zur Behandlung von unheilbaren genetischen Erbkrankheiten verwendet werden (Tomizawa et al. 2013; Yamano et al. 2010; Yao et al. 2008). Heute ermöglichen die Fortschritte in der Life-Science-Technologie die Transfektion von verschiedenen Nukleinsäuren wie Desoxyribonukleinsäuren (DNAs), Ribonukleinsäuren (RNAs) als auch kleinen, nicht kodierende RNAs, wie siRNA (small interfering RNA), shRNA (small hairpin RNA) und miRNA (micro RNA) (Chong et al. 2021; Lufino et al. 2008).

Grundsätzlich können Transfektionen in stabil und transient unterteilt werden. Stabile Transfektionen dienen zur Aufrechterhaltung der langfristigen Expression eines Transgens durch die Integration fremder DNA in das Genom des Wirts oder zur Beibehaltung eines episomalen Vektors im Wirtskern als extrachromosomales Element (Chong et al. 2021; Lufino et al. 2008). Das Transgen kann dann auch bei Replikation konstitutiv exprimiert werden (Kim und Eberwine 2010; Recillas-Targa 2006). Durch die dauerhafte Integration des GOI in das Genom wird dieses nicht von der Zelle als fremd anerkannt und abgebaut. Im Laufe der Zellteilung wird die Zell-DNA vervielfältigt, sodass die Menge an Fremd-DNA in der Zelle konstant ist (Chong et al. 2021; Kim und Eberwine 2010). Dagegen erfordert die transiente Transfektion keine Integration von Nukleinsäuren in das Wirtszellgenom (Riedl et al. 2018). Nukleinsäuren können in Form eines Plasmids oder als Oligonukleotide transfiziert werden (Chong et al. 2021; Igoucheva et al. 2006; Nejepska et al. 2012). Das transient transfizierte GOI existiert nur für einen begrenzten Zeitraum in der Zelle, da es nicht in das Wirtsgenom integriert ist (Kim und Eberwine 2010). Abhängig vom verwendeten Konstrukt kann transient exprimiertes Transgen im Allgemeinen ein bis sieben Tage lang nachgewiesen werden. Üblicherweise werden transient transfizierte Zellen 24 bis 96 Stunden nach der Transfektion geerntet. Die hohe Kopienzahl des transfizierten genetischen Materials führt jedoch zu hohen Spiegeln an exprimiertem Protein innerhalb des Zeitraums, in dem es in der Zelle existiert (Chaturvedi et al. 2018). Zudem führt die breite Verteilung der Kopienzahlen pro Zelle zu einer Expressionsheterogenität der transient transfizierten Zellen (Yang et al. 2021). Das GOI wird von der Zelle als eine Fremd-DNA erkannt, welche durch zellinterne Prozesse abgebaut wird. Infolge dessen wird innerhalb weniger Tage der größte Teil der Fremd-DNA durch Nukleasen abgebaut oder durch Zellteilung

verdünnt, welches insgesamt zu einer Abnahme des Expressionsniveaus führt (Chong et al. 2021; Kim und Eberwine 2010; Recillas-Targa 2006). Nach einer Woche wird die Anwesenheit des Transgens nicht mehr erkannt. Da das transient integrierte GOI sich nicht selbst vervielfältigen kann, geht die Transgenexpression schließlich verloren, wenn sich die Wirtszellen replizieren. Dadurch sinkt im Laufe der Zeit auch die Menge an exprimierten GOI-Genprodukt in der Zelle, welche die Analyse des zu untersuchenden Proteins und dessen langfristige Erforschung deutlich erschwert (Chong et al. 2021; Kim und Eberwine 2010; Recillas-Targa 2006). Infolgedessen sollten Erkenntnisse, die ausschließlich auf der Grundlage der transienten Überexpression basieren, bei nativer Expression und/oder in vitro bestätigt werden (Xing et al. 2009). Anhand dieser Aspekte lassen sich unter anderem die unterschiedlichen Messwerte für die Enzymaktivität der jeweiligen AGA-Varianten bei transienten und stabilen Transfektion begründen. Bei der transienten Transfektion von AGA-L126V war eine Enzymaktivität von 50-70% zu messen. Dagegen wies der stabile L126V-1-Flp-In-Klon 18 eine AGA-Aktivität von 40% auf. Nur eine stabile Integration des GOI bietet eine konstitutive Expression des GOI-Genprodukts, während die Expression bei der transienten Transfektion je nach Zeitpunkt der Messung schwankt.

Von beiden Transfektionsmethoden – transient und stabil – ist die erste Variante offensichtlich einfacher und schneller durchführbar, leidet jedoch an geringer Reproduzierbarkeit und Heterogenität der Zellpopulation. Die Zellen werden kurz nach der Transfektion analysiert, können aber immer noch unter dem durch das Verfahren bedingten Stress leiden. Zwar beseitigt die Erzeugung stabiler Zelllinien diese Probleme, jedoch erfordert die stabile Transfektion einen erheblichen Zeitaufwand, insbesondere wenn sich die Erstellung der DNA-Konstrukte und die Zellselektion als schwierig gestalten (Szczeny et al. 2018). Daher werden transiente Transfektion in der Regel für kurzzeitige Studien verwendet, um die Auswirkungen von Knock-in/-down bestimmter Gene zu untersuchen. Im Gegensatz dazu ist eine stabile Transfektion in der Langzeitgenetik und pharmakologischen Studien nützlich, in denen eine groß angelegte Proteinproduktion erforderlich ist (Chong et al. 2021; Elgundi et al. 2017; Kim und Eberwine 2010).

In dieser Arbeit wurde die stabile Transfektion ausgewählter AGA-Varianten über das Flp/FRT-System vermittelt (s. Abbildung 13). Die Flp-Rekombinase-Erkennungsequenz, welche den DNA-Doppelstrang-Austausch ermöglicht, ist stabil in die genomischen

Sequenz der parentalen Zellen integriert. Bei der Generierung transgener Zelllinien ist die Isogenität der Zellen, d. h. die Integration des Transgens in den gleichen Locus, ein häufiges Anliegen. Bei zufälliger Integration eines Plasmids wird eine isogene Zelllinie erhalten, indem eine einzelne Zelllinie selektiert und gezüchtet wird. Dies führt zu einer monoklonalen Zelllinie. Normalerweise müssen mehrere Klone getestet und untersucht werden, um sicherzustellen, dass das Integrationsereignis zur Expression des gewünschten Proteins führt. Da die FRT-Stelle in allen Flp-InTM-Zellen den gleichen Locus einnimmt, sind die parentalen Flp-InTM-Zellen von vornherein isogen. Dadurch kann auf die klonale Selektion verzichtet werden, wodurch das Verfahren stark vereinfacht wird (Szczesny et al. 2018). Außerdem können monoklonale Zelllinien gelegentlich an Genomumlagerungen leiden, welche bei in-vitro kultivierten Zellen auftreten und zu erheblichen Unterschieden zwischen den Linien führen können. In polyklonalen Zelllinien wird diese Wirkung über die Population verdünnt (Abdallah et al. 2013; Pelkmans 2012; Szczesny et al. 2018). Besonders wichtig ist zu betonen, dass die Expression des Transgens durch induzierbare Promotoren gesteuert werden kann, was ein gewisses Maß an Kontrolle über das Ausmaß, den Zeitpunkt der Expression und ihren Beginn ermöglicht (Szczesny et al. 2018).

Insgesamt gestaltet sich die Etablierung stabiler Zelllinien mit Hilfe des Flp/FRT-Systems weitaus unkomplizierter als der traditionelle Ansatz, bei dem ein Plasmid zufällig in das Genom integriert wird (Szczesny et al. 2018). Flp-InTM-System wird bereits in verschiedenen Forschungsbereichen, wie unter anderem zur Untersuchung von Mitochondrien oder in proteomischen Studien verwendet, welche die Existenz kompatibler Vektoren fordern, die eine einfache Klonierung gewährleisten (Pagliuca et al. 2011; Rorbach et al. 2011; Szczesny et al. 2018). Es sind mehrere mit dem Flp-InTM-System kompatible Zelllinien verfügbar, darunter HeLa- und HEK293-Zellen (Graham et al. 1977; Masters 2002; Shaw et al. 2002; Ward et al. 2011). Allerdings sollte erwähnt werden, dass sich das Flp/FRT-System nicht auf die derzeit verfügbaren Flp-In-kompetenten Zellen beschränkt, da die FRT-Sequenz in Genome anderer Zelllinien eingeführt werden kann (Szczesny et al. 2018). Die mithilfe des Flp/FRT-Systems generierten stabilen AGA-Zelllinien repräsentieren eine homogene Population bestehend aus selektierten Klonen, die eine konstante Expression des Zielproteins über Generationen hinweg sicherstellen. Eine einheitliche Expression zwischen einzelnen Zellen ist erforderlich, wenn Gene exprimiert werden, deren Eigenschaften von ihrer

Konzentration abhängig sind (Rice und McLysaght 2017). Viele natürliche und künstlich hergestellten Proteine können beispielsweise bei niedrigen Konzentrationen nicht funktionsfähig oder nicht nachweisbar sein und bei hohen Expressionsniveaus aggregieren, fehllokalisieren oder eine abweichende Funktion aufweisen (Kfir et al. 2005; Kintaka et al. 2016; Liu und Lehmann 2008; Moriya 2015; Wang und Li 2014). Durch eine homogene Expression des Proteins von Interesse wird eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Dadurch zeichnen sich stabile Zelllinien als leistungsstarkes Instrument für Wirkstoffscreenings, Genfunktionsstudien oder der Proteinproduktion aus (Elgundi et al. 2017). Unter der Verwendung von stabilen Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO) hat Riikonen et al. die Konsequenzen der Doppelmutation der FIN-Mutation untersucht (Riikonen et al. 1994). Das AGA-Zellmodell kann mit weiteren AGA-Varianten ausgeweitet werden und sowohl für die Identifizierung als auch das langfristige Verständnis der einzelnen Mutationen in weiteren Versuchen verwendet werden. Zwar beanspruchte die Erstellung und das Screening der stabilen Zelllinien einen Zeitaufwand von mehreren Monaten, jedoch ermöglicht das verwendete System durch die gezielte Integration des zu untersuchenden Gens die Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien untereinander (Urnov et al. 2005). Dadurch können isogene Versuchsbedingungen geschaffen werden, die eine bessere Validierung der AGA-Varianten ermöglichen. Aufgrund der schwierigen Verfügbarkeit und der begrenzten Lebenszeit von Patientenprimärzellen könnte das vorgestellte zelluläre Modell eine Alternative darstellen, um AGU-Mutationen funktionell zu validieren. Da gegenwärtig keine Therapie für die Behandlung von AGU verfügbar ist (Banning et al. 2016), können die generierten Zelllinien für das Screening und die Identifizierung von neuen Wirkungsstoffen in weiteren Versuchen angewendet werden.

5.2 Charakterisierung der AGU-L126V-Mutation

In der vorliegenden Arbeit wurde über Mutagenese die neuartige AGA-Variante L126V in den pCDNA3-Vektor eingebaut und anschließend in den pCDNA5/FRT-Vektor umklontiert (s. Abbildung 4). Anschließend folgte, wie zuvor beschrieben, die erfolgreiche Generierung einer stabilen L126V-Zelllinie mithilfe des Flp/FRT-Systems (s. Tabelle 12). Die neue AGA-Variante stellt eine Missense-Mutation dar, bei der die Nukleotidsequenz CTT in GTT verändert wird. Dadurch kommt es zu einem Austausch

von Leucin zu Valin. Zwischen Leucin und Valin bestehen relativ geringe strukturelle Differenzen. Die aliphatischen Aminosäuren zeichnen sich durch eine verzweigte strukturelle Anordnung und eine unpolare Seitenkette aus. Während Leucin über die Summenformel $C_6H_{13}NO_2$ beschrieben wird, ist bei Valin ($C_5H_{11}NO_2$) eine Methylgruppe weniger vorhanden. Die L126V-Variante befindet sich im Bereich der α -Untereinheit der AGA (s. Abbildung 2). Zwar wurde die (www.ncbi.nlm.nih.gov/, 24.07.2021). Kürzlich wurde diese AGA-Variante als krankheitsverursachend an einem sechsjährigen Patienten mit algerischen Wurzeln in der Schweiz postuliert. Die Beeinträchtigung der AGA-Aktivität führt zu einer Akkumulation von Glykoasparaginen in Lysosomen, welche zu einer fortschreitenden Entwicklungsstörung der Patienten führt (Banning et al. 2016). Häufig leiden betroffene Kinder an Sprachstörungen und einer verschlechterten motorischen Koordination (Arvio et al. 1999b; Arvio et al. 1999a; Arvio und Mononen 2016). Im frühen Erwachsenenalter sind AGU-Patienten schwer geistig eingeschränkt und zeigen typische Symptome von AGU wie grobe Gesichtszüge und Skelettanomalien (Banning et al. 2016). Derzeit äußert sich die AGU-Symptomatik am L126V-Patienten in Form einer für AGU ungewöhnlichen milden Entwicklungsstörung. Äußerst wichtig ist zu erwähnen, dass die Eltern des betroffenen Kindes verwandt sind, und somit weitere Genmutationen vorhanden sein könnten, die zum klinischen Bild beitragen. Über die Sequenzierung der Patienten-DNA konnte das Vorhandensein der L126V-Mutation (s. Abbildung 4) bestätigt werden. Zudem konnten keine weiteren Mutationen im kodierenden Bereich des AGA-Gens festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die AGU-L126V-Variante bezüglich der AGA-Prozessierung und -Aktivität charakterisiert. Die L126V-Plasmid-Konstrukte (pcDNA3 und pcDNA5/FRT) wurden sowohl transient als auch stabil transfiziert. Anhand des Screenings mittels Western Blots konnte eine vollständige Prozessierung des AGA-Vorläufers in die Untereinheiten bestätigt werden (s. Abbildung 10, 11 und 16). Sowohl AGA-Vorläufermoleküle („Precursor“, 42 kDa) als auch die Pro- α - (27 kDa), β - (17 kDa) und α -Untereinheit (24 kDa) konnten detektiert werden. Die β' -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 14 kDa ist oft aufgrund der geringen Menge nicht zu detektieren. Des Weiteren konnte über den fluorometrischen AGA-Aktivitätsassay eine Aktivität von 50-70% (transient) und über 40% (stabil) im Vergleich zu jeweiligem WT-AGA (s. Abbildung 10 und 16) sichergestellt werden. Nach der Messung der AGA-Aktivität in Fibroblasten des Patienten wurde eine Aktivität von ca. 30% im Vergleich zu WT-

Fibroblasten festgestellt werden (s. Abbildung 17). Im Serum des AGU-L126V-Patienten wurde eine Aktivität von 0,79 mU/L bzw. 34% zur gesunden Kontrollprobe bestätigt (s. Abbildung 19). Dagegen zeigt die AGU-FIN-major-Variante eine gemessene AGA-Aktivität von 0,2 mU/L bzw. 8,5% im Serum. In den AGU-FIN-major-Patientenfibroblasten konnte eine verminderte AGA-Aktivität von 8% im Vergleich zum Kontrollfibroblasten gemessen werden. Im Western Blot konnte nur eine Akkumulation von Vorläufer-Polypeptiden ohne weitere AGA-Prozessierung festgestellt werden. Bei der C163S-Mutation, auch AGU-FIN-major-Mutation genannt, kommt es zu einer Substitution von Cystein zu Serin im C-terminalen Ende der α -Untereinheit des AGA-Enzyms (Fisher und Aronson 1991; Mononen et al. 1991). Die Missense-Mutation zerstört eine Disulfidbrücke und führt zu Konformationsänderungen des inaktiven Vorläuferenzym-Proteins, sodass seine Spaltung in Untereinheiten und somit die Wandlung in ein aktives Enzymprotein erschwert wird (McCormack et al. 1995; Riikonen et al. 1996; Sui et al. 2014).

Anhand meiner Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die AGU-L126V-Mutation milde molekulare Auswirkungen aufweist. Sowohl die hohe Enzym-Aktivität als auch die vollständige AGA-Prozessierung sind im Vergleich zu den vorher beschriebenen Ergebnissen der weiteren AGA-Varianten ungewöhnlich hoch. Die Enzymaktivität der AGU-Mutationen L126V und FIN-major wurden sowohl anhand von immortalisierten Zelllinien untersucht als auch an Primärzellen und in Patientenserum. Die Messwerte der transient und stabilen Transfektion unterscheiden sich unter anderem aufgrund der unterschiedlichen Expressionssysteme, jedoch bestätigen alle genannten Versuche insgesamt eine hohe Restaktivität von AGA-L126V und eine geringe Aktivität von AGU-Fin-major im Vergleich zum WT. Die Ergebnisse der Transfektionen wurden durch die Untersuchungen an Primärzellen und Patientenserum bestätigt. Der derzeit milde AGU-Phänotyp, geprägt durch Verhaltensauffälligkeiten, des betroffenen Kindes korreliert ebenso mit der mehrfach bestätigten hohen AGA-Restaktivität.

Es sind weitere AGA-Varianten bekannt, welche ähnlich zu der L126V-Mutante milde Auswirkungen und eine AGA-Prozessierung aufweisen. Die AGU-Mutationen S72P, T257I und F135S weisen intrazellulär stabile Vorläufer-Polypeptide auf, von denen mindestens ein Anteil korrekt prozessiert wird. Intrazellulär sind diese AGA-Polypeptide sowohl im Golgi-Apparat und Lysosomen als auch im endoplasmatischen Retikulum

nachweisbar. Bei den genannten AGU-Mutationen kann eine AGA-Aktivität zwischen 7% und 30% im Vergleich zum Wildtypen gemessen werden (Saarela et al. 2001).

Die drei beschriebenen AGA-Varianten weisen eine deutlich geringere Aktivität als die L126V-Variante auf. Sowohl die anhand von Western Blots nachgewiesene AGA-Prozessierung als auch die hohe Restaktivität der L126V-Mutation deuten darauf hin, dass die korrekte Prozessierung des Enzyms nicht erheblich durch die Mutation beeinträchtigt wird. Vielmehr ist im weiteren Verlauf zu klären, inwiefern die vorliegende Mutation die Mannose-6-Phosphorylierung und somit den Transport des mutierten AGAs zu den Lysosomen beeinträchtigt. Zudem könnte die zelluläre Halbwertszeit des mutierten Enzyms verkürzt sein.

AGA wird als enzymatisch inaktives Vorläufer-Polypeptid synthetisiert, welches im endoplasmatischen Retikulum prozessiert wird (Ikonen et al. 1993; Riikonen et al. 1996). Nach der Dimerisierung zweier Vorläufer-Polypeptide im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Aktivierung des dimeren Vorläuferkomplexes durch die autokatalytische Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren D205 und T206. Dadurch entsteht ein tetrameres Molekül bestehend aus zwei Alpha- und zwei Beta-Untereinheiten (Ikonen et al. 1993; Riikonen et al. 1996; Saarela et al. 1998). Durch die Spaltung des Vorläufer-Polypeptides in die Untereinheiten wird die α -Aminogruppe von T206 frei, welche essentiell für den Mechanismus der AGA-Katalyse ist. Die α -Aminogruppe von T206 im N-terminalen Bereich der Beta-Untereinheit agiert als Base, welche die Nukleophilie der Hydroxylgruppe in der Seitenkette erhöht (Tikkanen et al. 1996). Im Golgi-Apparat erfolgt die Markierung mit Mannose-6-Phosphat, einem lysosomalen Erkennungssignal, an den N-Glykanen von AGA. Durch die Mannose-6-Phosphorylierung wird die reife Hydrolase in das lysosomale Kompartiment weitergeleitet. Die Phosphorylierung ist abhängig von drei Lysinresten und einem Tyrosinrest in räumlich definierten Positionen auf der Oberfläche des reifen AGA-Moleküls, die eine korrekte Faltung des Enzyms voraussetzen. Infolgedessen kann die Mannose-6-Phosphorylierung durch eine Mutation bedingten Faltungsdefekt beeinträchtigt werden (Saarela et al. 2001; Tikkanen et al. 1997). Im Rahmen meiner Arbeit stand kein spezifischer Antikörper zur Verfügung, um die zelluläre Lokalisation von AGA-L126V mittels Immunfluoreszenz in Patientenzellen zu untersuchen. Es könnte sein, dass durch die beschriebene Mutation der Transport zu den Lysosomen beeinflusst wird. In weiteren Experimenten könnten Lysosome fraktioniert werden, um die zelluläre

Lokalisation des mutierten Enzyms näher zu bestimmen. Zudem könnte mithilfe der stabil generierten L126V-Zelllinie oder in den primären Patientenzellen die Lokalisation von AGA-L126V anhand eines geeigneten spezifischen Antikörpers detektiert werden, um die molekularen Auswirkungen der Mutation näher zu untersuchen.

5.3 Ausblick

Seit der erstmaligen Entdeckung der lysosomalen Speicherkrankheit Aspartylglukosaminurie im Jahre 1968 wurden zahlreiche Mutationen des AGA-Gens beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein stabiles Zellmodell mithilfe des FRT/Flp-Systems etabliert, welches eine langfristige funktionelle Validierung von AGA-Varianten ermöglicht. Die gezielte Integration des zu untersuchenden Gens ermöglicht die Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien untereinander. Im Hinblick auf die schwere Verfügbarkeit und der begrenzten Lebenszeit von Patientenprimärzellen bietet das vorgestellte Modell eine Alternative zur Untersuchung von AGU-Mutationen. Bisher konnten in meiner Arbeit konstitutiv exprimierende Zelllinien der AGA-Varianten (WT, FIN-major, P28L und L126V) etabliert werden, welche in Zukunft durch weitere AGA-Varianten ergänzt werden können. Da gegenwärtig keine zugelassene Therapie für die Behandlung von AGU verfügbar ist, können die generierten Zelllinien für das langfristige Screening und die Identifizierung von Wirkungsstoffen angewendet werden. Hierfür müsste die Möglichkeit geschaffen werden, die AGA-Aktivität in kleinerem Maße zu messen oder zu automatisieren.

Ein weiterer Bestandteil meiner Arbeit war die Charakterisierung der neuartigen AGA-Variante L126V. Anhand meiner Ergebnisse konnte eine vollständige AGA-Prozessierung und eine hohe Restaktivität bestätigt werden. Aufgrund des ungewöhnlichen Phänotyps sollten weitere Methoden zur Bestätigung der AGU-Diagnose, wie die Untersuchung der AsnGlcNAc-Ausscheidung im Urin des Patienten, durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf könnte mittels Immunfluoreszenz und Lysotrackerfärbung die zelluläre Lokalisation von AGA in Patientenfibroblasten/L126V-Flp-Zellen charakterisiert werden. Über eine Dichtegradientenzentrifugation können Lysosome aus AGA-L126V-Zellen isoliert werden, um zu klären, inwiefern die vorliegende Mutation die Mannose-6-Phosphorylierung und somit den Transport des mutierten AGA-Enzyms zu den Lysosomen beeinträchtigt.

6 Summary

Aspartylglucosaminuria (AGU) is an autosomal, recessively inherited lysosome storage disease caused by a deficiency in the degradation of glycoproteins, with a high prevalence in the Finnish population. The progressive generalized course of the disease affects the whole body and results in developmental delays, severe mental retardation, psychomotor regression, and premature death. The impaired glycoprotein breakdown is caused by a mutation of the *AGA* gene, which leads to the deficiency of the aspartylglucosaminidase (AGA) enzyme and thus to accumulation of glycoasparagines in the lysosomes. So far, more than 30 pathogenic *AGA* gene variants have been described. Since no curative therapy is currently available for AGU, there is an urgent need for the development of alternative therapy concepts. The present dissertation aimed at establishing a cellular model using the Flp/FRT system that enables a long-term functional validation of the *AGA* variants. With a better understanding of the molecular effects of the various *AGA* variants, potential therapeutic approaches can be developed in a more targeted manner. In addition, this study aimed to investigate the novel AGU mutation L126V in more detail in terms of *AGA* processing and enzyme activity.

With the help of the FLP/FRT system, constitutively expressing cell lines of the *AGA* variants WT, FIN-major, P28L and L126V were generated. As an alternative to using primary patient cells, the stably expressing *AGA* cell lines can be used for drug screening in the future. Moreover, the patient cell model can be supplemented by generating further stable cell lines using additional *AGA* variants. The functional investigation of the new *AGA* variant L126V confirmed the correct processing of the *AGA* enzyme into subunits. Transfection of HEK cells revealed a residual activity of 50-70% (transient) and over 40% (stable). An *AGA* activity of approximately 30% was measured in patient fibroblasts, while the activity measurement in the serum confirmed a residual activity of 34%, compared to a healthy control sample. Due to the mild phenotype, the AGU diagnosis should be further confirmed by determining the AsnGlcAc excretion in the patient's urine. The pathological effects of the mutated L126V-*AGA* should also be characterized in further experiments, such as the determination of the cellular localization of *AGA*.

7 Zusammenfassung

Aspartylglukosaminurie (AGU) beschreibt eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die durch eine Störung des Glykoproteinabbaus gekennzeichnet ist. Der gestörte Glykoproteinabbau wird durch eine Mutation des *AGA*-Gens bedingt, welche zu einer mangelnden Enzymaktivität und somit zu einer Akkumulation von Glykoasparaginen in den Lysosomen führt. Bisher sind insgesamt über 30 pathogene *AGA*-Varianten beschrieben worden. Der progressive, generalisierte Verlauf der Erkrankung wird durch Entwicklungsverzögerungen, psychomotorische Regression, geistige Entwicklungsstörung und verkürzte Lebenserwartung charakterisiert. Da derzeit keine Therapiemöglichkeiten für die Behandlung von Aspartylglukosaminurie zugelassen sind, besteht großer Bedarf an der Entwicklung von alternativen Therapiekonzepten. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, ein zelluläres Modell mittels Flp-In/FRT-Systems zu etablieren, welche eine langfristige, funktionelle Validierung der potentiell pathogenen *AGA*-Varianten ermöglicht. Durch das bessere Verständnis der molekularen Auswirkungen der verschiedenen *AGA*-Varianten können potentielle Therapieansätze gezielter entwickelt werden. Außerdem sollte im Zuge dieser Doktorarbeit die neuartige AGU-Mutation L126V bezüglich der *AGA*-Prozessierung und Enzymaktivität näher charakterisiert werden.

Mithilfe des FLP/FRT-System war es möglich, konstitutiv exprimierende Zelllinien der *AGA*-Varianten WT, FIN-major, P28L und L126V zu generieren. Als Alternative zur Verwendung von Primärzellen aus Patienten können die stabil generierten *AGA*-Zelllinien zukünftig zum Wirkstoffscreening verwendet werden. Zudem kann das entwickelte Modell über die Generierung weiterer stabiler Flp-In-Zelllinien mit zusätzlichen *AGA*-Varianten ergänzt werden. Die funktionelle Untersuchung der neuartigen AGU-Mutation L126V bestätigte eine vollständige Prozessierung des *AGA*-Enzyms in die Untereinheiten. Die Transfektion von HEK-Zellen zeigte eine hohe Restaktivität. In Patientenfibroblasten wurde eine *AGA*-Aktivität von ca. 30% gemessen, während die Aktivitätsmessung im Serum eine Restaktivität von 34% verglichen zu einer gesunden Kontrollprobe bestätigte. Aufgrund des milden Phänotyps sollte die Sicherstellung der AGU-Diagnose über die Bestimmung der AsnGlcNAc-Ausscheidung im Urin des L126V-Patientens bestätigt werden. Durch weitere Versuche, wie die Bestimmung der zellulären Lokalisation von *AGA* über Immunfluoreszenz, können die pathologischen Auswirkungen des mutierten L126V-*AGA* weiter charakterisiert werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

AGA	Aspartylglukosaminidase
AGA-KO	Aspartylglukosaminidase-Knockout
AGU	Aspartylglukosaminurie
AGU-FIN-major	Doppelmutation 482G->A + 488G->C, R161Q + C163S
AsnGlcNAc	2-acetamido-1-(β '-L-aspartamido)-1,2-dideoxyglucose
bp	Basenpaar
BGH	Rinder-Wachstumshormon
cDNA	Komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4,6-Diamidin-2-Phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified-Eagle's-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FRT	FLP Recognition Target
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	Gene of Interest
HEK/ HEK293T	Humane, embryonale Nierenzellen
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LSK	Lysosomale Speicherkrankheiten
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Pharmakologische Chaperone
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sgRNA	Single Guide RNA
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-Buffered-Saline with Tween
TEMED	N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Å	Ångström (10-10 m)

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Prozessierung und Aktivierung von Aspartylglucosaminidase (AGA)“ modifiziert nach ((Banning et al. 2017).....	8
Abbildung 2:	„Karte der bekannten AGU-Mutationen“ aktualisiert und modifiziert nach (Saarela et al. 2001).....	12
Abbildung 3:	DNA-Sequenz von AGA-L126V im Vergleich zum AGA-WT...	43
Abbildung 4:	DNA-Sequenz von AGA-L126V.....	44
Abbildung 5:	AGA-Aktivitäten der AGA-KO-Flp-In-Klone 5, 9 und 18.....	45
Abbildung 6:	DNA-Sequenzen der AGA-KO-Flp-In-Klone (A-D).....	46
Abbildung 7:	Charakterisierung der sauren Zellorganellen in AGA-KO-Klonen mittels LysoTracker.....	48
Abbildung 8:	Fluoreszenzmessung von HEK-Flp-In-Zellen nach Behandlung und LysoTrackerfärbung mit einem Mikrotiterplatten-Reader.....	49
Abbildung 9:	Western Blot von AGA-L126V-pCDNA3 in AGA-KO-Zellen nach transienter Transfektion.....	51
Abbildung 10:	AGA-Aktivität der AGU-L126V-Mutation im Vergleich zum AGA-WT nach transienter Transfektion.....	52
Abbildung 11:	Western Blot von AGA-pCDNA5/FRT-Varianten in AGA-KO-Zellen nach transienter Transfektion.....	53
Abbildung 12:	AGA-Aktivität der AGA-Varianten im Vergleich zum AGA-WT nach transienter Transfektion.....	54
Abbildung 13:	Flp-In TM -Mechanismus, modifiziert nach dem Manual des Flp-In TM -Systems (Version E, November 2010, Invitrogen).....	56
Abbildung 14:	Beispiel der β -Galactosidase-Aktivitätsmessung anhand von AGA-Flp-In-Klonen.....	57
Abbildung 15:	Stabile Transfektion der AGA-KO-Flp-In-Klone 5 und 9 (A-B).....	59
Abbildung 16:	Stabile Transfektion der AGA-KO-Flp-In-Klone 5 und 18 (A-B).....	60

Abbildung 17: AGA-Aktivitätsmessung in L126V- und FIN-major-Patientenfibroblasten.....	62
Abbildung 18: Beispiel einer Standardkurve des AMC.....	63
Abbildung 19: AGA-Aktivitätsmessung in Patienten- und Kontrollseren (A-B).	63

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Materialien und Geräte mit Hersteller und dessen Niederlassung.....	15
Tabelle 2:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Hersteller und dessen Niederlassung.....	17
Tabelle 3:	Verwendete Puffer/Lösungen und ihre Zusammensetzung.	20
Tabelle 4:	Verwendete Substanzen zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	22
Tabelle 5:	Verwendete Kits und Säulen mit dem Hersteller und dessen Niederlassung.....	22
Tabelle 6:	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller.....	23
Tabelle 7:	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit den jeweiligen Verdünnungen und dem Hersteller.....	23
Tabelle 8:	Verwendete Plasmide bzw. Konstrukte, sowie deren Hersteller....	23
Tabelle 9:	Verwendete Primer und ihrer Sequenz.....	25
Tabelle 10:	Verwendete Zelllinien und des Bakterienstamms mit weiteren Informationen.....	25
Tabelle 11:	Zusammensetzung des Phosphat-Citrat-Puffers nach McIlvaine....	42
Tabelle 12:	Zelllinien mit erfolgreicher homologer Rekombination.....	57

11 Literaturhinweise

- Abdallah, B. Y.; Horne, S. D.; Stevens, J. B.; Liu, G.; Ying, A. Y.; Vanderhyden, B.; Krawetz, S. A.; Gorelick, R.; Heng, H. H. (2013): Single cell heterogeneity: why unstable genomes are incompatible with average profiles. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12 (23), S. 3640–3649.
- Ambrosetto, G.; Santucci, M. (2009): Sleep-related hypermotor seizures in aspartylglucosaminuria: a case report. *Epilepsia*, 50 (6), S. 1638–1640.
- Arakawa, T.; Ejima, D.; Kita, Y.; Tsumoto, K. (2006): Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochimica et biophysica acta*, 1764 (11), S. 1677–1687.
- Arvio, M. (1993): Follow-up in patients with aspartylglucosaminuria. Part I. The course of intellectual functions. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 82 (5), S. 469–471.
- Arvio, M.; Arvio, P.; Hurmerinta, K.; Pirinen, S.; Sillanpää, M. (2005): Reduction in head size in patients with aspartylglucosaminuria. *Acta neurologica Scandinavica*, 112 (5), S. 335–337.
- Arvio, M.; Autio, S.; Louhiala, P. (1993a): Early clinical symptoms and incidence of aspartylglucosaminuria in Finland. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 82 (6-7), S. 587–589.
- Arvio, M.; Laiho, K.; Kauppi, M.; Peippo, M.; Leino, P.; Kautiainen, H.; Kaipainen-Seppänen, O.; Mononen, I. (2002): Carriers of the aspartylglucosaminuria genetic mutation and chronic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 61 (2), S. 180–181.
- Arvio, M.; Mononen, I. (2016): Aspartylglycosaminuria: a review. *Orphanet journal of rare diseases*, 11 (1), S. 162.
- Arvio, M.; Oksanen, V.; Autio, S.; Gaily, E.; Sainio, K. (1993b): Epileptic seizures in aspartylglucosaminuria: a common disorder. *Acta neurologica Scandinavica*, 87 (5), S. 342–344.
- Arvio, M. A.; Peippo, M. M.; Arvio, P. J.; Kääriäinen, H. A. (2004): Dysmorphic facial features in aspartylglucosaminuria patients and carriers. *Clinical dysmorphology*, 13 (1), S. 11–15.

- Arvio, M. A.; Rapola, J. M.; Pelkonen, P. M. (1998a): Chronic arthritis in patients with aspartylglucosaminuria. *The Journal of rheumatology*, 25 (6), S. 1131–1134.
- Arvio, P.; Arvio, M.; Kero, M.; Pirinen, S.; Lukinmaa, P. L. (1999a): Overgrowth of oral mucosa and facial skin, a novel feature of aspartylglucosaminuria. *Journal of medical genetics*, 36 (5), S. 398–404.
- Arvio, P.; Arvio, M.; Marttinen, E.; Sipilä, I.; Pirinen, S. (1999b): Excessive infantile growth and early pubertal growth spurt: Typical features in patients with aspartylglycosaminuria. *The Journal of Pediatrics*, 134 (6), S. 761–763.
- Arvio, P.; Arvio, M.; Pirinen, S. (1997): Characteristic dental arches and occlusion in patients with aspartylglucosaminuria. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*, 17 (3), S. 133–140.
- Arvio, P.; Arvio, M.; Wolf, J.; Lukinmaa, P.-L.; Saxen, L.; Pirinen, S. (1998b): Impaired oral health in patients with aspartylglucosaminuria. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 86 (5), S. 562–568.
- Aula, P.; Mattila, K.; Piironen, O.; Ammälä, P.; Koskull, H. von (1989): First-trimester prenatal diagnosis of aspartylglucosaminuria. *Prenatal diagnosis*, 9 (9), S. 617–620.
- Aula, P.; Rapola, J.; Koskull, H. von; Ammälä, P. (1984): Prenatal diagnosis and fetal pathology of aspartylglucosaminuria. *American journal of medical genetics*, 19 (2), S. 359–367.
- Bainton, D. F. (1981): The discovery of lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 91 (3 Pt 2), 66s-76s.
- Banning, A.; Gülec, C.; Rouvinen, J.; Gray, S. J.; Tikkanen, R. (2016): Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. *Scientific reports*, 6, S. 37583.
- Banning, A.; König, J. F.; Gray, S. J.; Tikkanen, R. (2017): Functional Analysis of the Ser149/Thr149 Variants of Human Aspartylglucosaminidase and Optimization of the Coding Sequence for Protein Production. *International journal of molecular sciences*, 18 (4).

- Burton, T. D.; Fedele, A. O.; Xie, J.; Sandeman, L. Y.; Proud, C. G. (2020): The gene for the lysosomal protein LAMP3 is a direct target of the transcription factor ATF4. *The Journal of biological chemistry*, 295 (21), S. 7418–7430.
- Chaturvedi, P.; Zhao, B.; Zimmerman, D. L.; Belmont, A. S. (2018): Stable and reproducible transgene expression independent of proliferative or differentiated state using BAC TG-EMBED. *Gene therapy*, 25 (5), S. 376–391.
- Chong, Z. X.; Yeap, S. K.; Ho, W. Y. (2021): Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*, 9, e11165.
- Chow, Y. T.; Chen, S.; Wang, R.; Liu, C.; Kong, C.-W.; Li, R. A.; Cheng, S. H.; Sun, D. (2016): Single Cell Transfection through Precise Microinjection with Quantitatively Controlled Injection Volumes. *Scientific reports*, 6, S. 24127.
- Ciechanover, A. (2012): Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Neuro-degenerative diseases*, 10 (1-4), S. 7–22.
- Cuppoletti, J.; Aures-Fischer, D.; Sachs, G. (1987): The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 899 (2), S. 276–284.
- Delahunty, C. M.; Ankener, W.; Brainerd, S.; Nickerson, D. A.; Mononen, I. T. (1995): Finnish-type aspartylglucosaminuria detected by oligonucleotide ligation assay. *Clinical chemistry*, 41 (1), S. 59–61.
- Dunder, U.; Valtonen, P.; Kelo, E.; Mononen, I. (2010): Early initiation of enzyme replacement therapy improves metabolic correction in the brain tissue of aspartylglycosaminuria mice. *Journal of inherited metabolic disease*, 33 (5), S. 611–617.
- Duve, C. de; PRESSMAN, B. C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R.; APPELMANS, F. (1955): Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical journal*, 60 (4), S. 604–617.
- Elgundi, Z.; Sifniotis, V.; Reslan, M.; Cruz, E.; Kayser, V. (2017): Laboratory Scale Production and Purification of a Therapeutic Antibody. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (119).

- Fan, J.-Q.; Ishii, S. (2007): Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. *The FEBS journal*, 274 (19), S. 4962–4971.
- Filocamo, M.; Morrone, A. (2011): Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Human genomics*, 5 (3), S. 156–169.
- Fisher, K. J.; Aronson, N. N. (1991): Characterization of the mutation responsible for aspartylglucosaminuria in three Finnish patients. Amino acid substitution Cys163—Ser abolishes the activity of lysosomal glycosylasparaginase and its conversion into subunits. *The Journal of biological chemistry*, 266 (18), S. 12105–12113.
- Fisher, K. J.; Tollersrud, O. K.; Aronson, N. N. (1990): Cloning and sequence analysis of a cDNA for human glycosylasparaginase. *FEBS Letters*, 269 (2), S. 440–444.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36 (1), S. 59–74.
- Grön, K.; Aula, P.; Peltonen, L. (1990): Linkage of aspartylglucosaminuria (AGU) to marker loci on the long arm of chromosome 4. *Human genetics*, 85 (2), S. 233–236.
- Gülec, C. (2017): GEB - Charakterisierung einer neuen Aspartylglukosaminurie-Mutation - Gülec, Christina. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/12492/>, zuletzt geprüft am 20.08.2021.
- Haltia, M.; Palo, J.; Autio, S. (1975): Aspartylglycosaminuria: a generalized storage disease. Morphological and histochemical studies. *Acta neuropathologica*, 31 (3), S. 243–255.
- Harjunen, E. L.; Laine, M.; Tikkanen, R.; Helenius, P. (2020): Detailed profile of cognitive dysfunction in children with aspartylglucosaminuria. *Journal of inherited metabolic disease*, 43 (2), S. 318–325.
- Hietala, M.; Aula, P.; Syvänen, A. C.; Isoniemi, A.; Peltonen, L.; Palotie, A. (1996): DNA-based carrier screening in primary healthcare: screening for aspartylglucosaminuria mutations in maternity health offices. *Clinical chemistry*, 42 (9), S. 1398–1404.
- Hietala, M.; Grön, K.; Syvänen, A. C.; Peltonen, L.; Aula, P. (1993): Prospects of carrier screening of aspartylglucosaminuria in Finland. *European journal of human genetics : EJHG*, 1 (4), S. 296–300.

- Igoucheva, O.; Alexeev, V.; Yoon, K. (2006): Differential cellular responses to exogenous DNA in mammalian cells and its effect on oligonucleotide-directed gene modification. *Gene therapy*, 13 (3), S. 266–275.
- Ikonen, E.; Aula, P.; Grön, K.; Tollersrud, O.; Halila, R.; Manninen, T.; Syvänen, A. C.; Peltonen, L. (1991a): Spectrum of mutations in aspartylglucosaminuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (24), S. 11222–11226.
- Ikonen, E.; Baumann, M.; Grön, K.; Syvänen, A. C.; Enomaa, N.; Halila, R.; Aula, P.; Peltonen, L. (1991b): Aspartylglucosaminuria: cDNA encoding human aspartylglucosaminidase and the missense mutation causing the disease. *The EMBO journal*, 10 (1), S. 51–58.
- Ikonen, E.; Julkunen, I.; Tollersrud, O. K.; Kalkkinen, N.; Peltonen, L. (1993): Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*, 12 (1), S. 295–302.
- Ingram, V. M. (1956): A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*, 178 (4537), S. 792–794.
- Isoniemi, A.; Hietala, M.; Aula, P.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (1995): Identification of a novel mutation causing aspartylglucosaminuria reveals a mutation hotspot region in the aspartylglucosaminidase gene. *Human mutation*, 5 (4), S. 318–326.
- Jeong, S.-J.; Stitham, J.; Evans, T. D.; Zhang, X.; Rodriguez-Velez, A.; Yeh, Y.-S.; Tao, J.; Takabatake, K.; Epelman, S.; Lodhi, I. J.; Schilling, J. D.; DeBosch, B. J.; Diwan, A.; Razani, B. (2021): Trehalose causes low-grade lysosomal stress to activate TFEB and the autophagy-lysosome biogenesis response. *Autophagy*, S. 1–13.
- Jurkat, A. (2019): GEB - Aspartylglukosaminurie: Hitzeschockprotein-Aktivierung als Therapieansatz - Jurkat, Annika. Online verfügbar unter http://geb.uni-giessen.de/geb/frontdoor.php?source_opus=14503&la=de, zuletzt geprüft am 20.08.2021.
- Kaartinen, V.; Mononen, I. (1989): Analysis of aspartylglucosamine at the picomole level by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 490, S. 293–299.

- Kaartinen, V.; Mononen, I. (1990): Assay of aspartylglycosylaminase by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 190 (1), S. 98–101.
- Kaartinen, V.; Williams, J. C.; Tomich, J.; Yates, J. R.; Hood, L. E.; Mononen, I. (1991): Glycosaparaginase from human leukocytes. Inactivation and covalent modification with diazo-oxonorvaline. *The Journal of biological chemistry*, 266 (9), S. 5860–5869.
- Kallinen, J.; Heinonen, S.; Palotie, A.; Mannermaa, A.; Ryyanen, M. (2001): Antenatal gene tests in low-risk pregnancies: molecular screening for aspartylglucosaminuria (AGU) and infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL) in Finland. *Prenatal diagnosis*, 21 (5), S. 409–412.
- Kapahnke, M.; Banning, A.; Tikkanen, R. (2016): Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells*, 5 (4).
- Kaushik, S.; Cuervo, A. M. (2012): Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology*, 22 (8), S. 407–417.
- Kelo, E.; Dunder, U.; Mononen, I. (2005): Massive accumulation of Man2GlcNAc2-Asn in nonneuronal tissues of glycosylasparaginase-deficient mice and its removal by enzyme replacement therapy. *Glycobiology*, 15 (1), S. 79–85.
- Kfir, S.; Ehrlich, M.; Goldshmid, A.; Liu, X.; Kloog, Y.; Henis, Y. I. (2005): Pathway- and expression level-dependent effects of oncogenic N-Ras: p27(Kip1) mislocalization by the Ral-GEF pathway and Erk-mediated interference with Smad signaling. *Molecular and cellular biology*, 25 (18), S. 8239–8250.
- Kim, T. K.; Eberwine, J. H. (2010): Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397 (8), S. 3173–3178.
- Kingma, S. D. K.; Bodamer, O. A.; Wijburg, F. A. (2015): Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 29 (2), S. 145–157.
- Kintaka, R.; Makanae, K.; Moriya, H. (2016): Cellular growth defects triggered by an overload of protein localization processes. *Scientific reports*, 6, S. 31774.
- Laitinen, A.; Hietala, M.; Haworth, J. C.; Schroeder, M. L.; Seargeant, L. E.; Greenberg, C. R.; Aula, P. (1997): Two novel mutations in a Canadian family with

- aspartylglucosaminuria and early outcome post bone marrow transplantation. *Clinical genetics*, 51 (3), S. 174–178.
- Lindblom, N.; Kivinen, S.; Heiskala, H.; Laakso, M.-L.; Kaski, M. (2006): Sleep disturbances in aspartylglucosaminuria (AGU): a questionnaire study. *Journal of inherited metabolic disease*, 29 (5), S. 637–646.
- Liu, Y.; Dunn, G. S.; Aronson, N. N. (1996): Purification, biochemistry and molecular cloning of an insect glycosylasparaginase from *Spodoptera frugiperda*. *Glycobiology*, 6 (5), S. 527–536.
- Liu, Y.; Lehmann, M. (2008): A Genomic Response to the Yeast Transcription Factor GAL4 in *Drosophila*. *Fly*, 2 (2), S. 92–98.
- Lloyd, J. B.; Forster, S. (1986): The lysosome membrane. *Trends in Biochemical Sciences*, 11 (9), S. 365–368.
- Lufino, M. M. P.; Edser, P. A. H.; Wade-Martins, R. (2008): Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16 (9), S. 1525–1538.
- Luzio, J. P.; Hackmann, Y.; Dieckmann, N. M. G.; Griffiths, G. M. (2014): The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6 (9), a016840.
- Masters, J. R. (2002): HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature reviews. Cancer*, 2 (4), S. 315–319.
- McCormack, A. L.; Mononen, I.; Kaartinen, V.; Yates, J. R. (1995): Localization of the disulfide bond involved in post-translational processing of glycosylasparaginase and disrupted by a mutation in the Finnish-type aspartylglycosaminuria. *The Journal of biological chemistry*, 270 (7), S. 3212–3215.
- Mehta, A. (2006): Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. *European journal of internal medicine*, 17 Suppl, S2-5.
- Mehta, A.; Beck, M.; Sunder-Plassmann, G. (Hg.) (2006): *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford.

- Mononen, I.; Fisher, K. J.; Kaartinen, V.; Aronson, N. N. (1993a): Aspartylglycosaminuria: protein chemistry and molecular biology of the most common lysosomal storage disorder of glycoprotein degradation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7 (13), S. 1247–1256.
- Mononen, I.; Heisterkamp, N.; Kaartinen, V.; Williams, J. C.; Yates, J. R.; Griffin, P. R.; Hood, L. E.; Groffen, J. (1991): Aspartylglycosaminuria in the Finnish population: identification of two point mutations in the heavy chain of glycoasparaginase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (7), S. 2941–2945.
- Mononen, I.; Kaartinen, V.; Mononen, T. (1988a): Amniotic fluid glycoasparagines in fetal aspartylglycosaminuria. *Journal of inherited metabolic disease*, 11 (2), S. 194–198.
- Mononen, I.; Kaartinen, V.; Mononen, T. (1988b): Laboratory detection of aspartylglycosaminuria. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, 191, S. 7–11.
- Mononen, I.; Mononen, T.; Ylikangas, P.; Kaartinen, V.; Savolainen, K. (1994): Enzymatic diagnosis of aspartylglycosaminuria by fluorometric assay of glycosylasparaginase in serum, plasma, or lymphocytes. *Clinical chemistry*, 40 (3), S. 385–388.
- Mononen, I. T.; Kaartinen, V. M.; Williams, J. C. (1993b): A fluorometric assay for glycosylasparaginase activity and detection of aspartylglycosaminuria. *Analytical Biochemistry*, 208 (2), S. 372–374.
- Mononen, T.; Parviainen, M.; Penttilä, I.; Mononen, I. (1986): Liquid-chromatographic detection of aspartylglycosaminuria. *Clinical chemistry*, 32 (3), S. 501–502.
- Moriya, H. (2015): Quantitative nature of overexpression experiments. *Molecular Biology of the Cell*, 26 (22), S. 3932–3939.
- Morris, C.; Heisterkamp, N.; Groffen, J.; Williams, J. C.; Mononen, I. (1992): Chromosomal localization of the human glycoasparaginase gene to 4q32-q33. *Human genetics*, 88 (3), S. 295–297.
- Mussche, S.; Devreese, B.; Nagabhushan Kalburgi, S.; Bachaboina, L.; Fox, J. C.; Shih, H.-J.; van Coster, R.; Samulski, R. J.; Gray, S. J. (2013): Restoration of cytoskeleton homeostasis after gigaxonin gene transfer for giant axonal neuropathy. *Human Gene Therapy*, 24 (2), S. 209–219.

- Nejepinska, J.; Malik, R.; Moravec, M.; Svoboda, P. (2012): Deep sequencing reveals complex spurious transcription from transiently transfected plasmids. *PloS one*, 7 (8), e43283.
- Oinonen, C.; Tikkanen, R.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1995): Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nature structural biology*, 2 (12), S. 1102–1108.
- Pagliuca, F. W.; Collins, M. O.; Lichawska, A.; Zegerman, P.; Choudhary, J. S.; Pines, J. (2011): Quantitative proteomics reveals the basis for the biochemical specificity of the cell-cycle machinery. *Molecular cell*, 43 (3), S. 406–417.
- Palo, J. (1967): Prevalence of phenylketonuria and some other metabolic disorders among mentally retarded patients in Finland. *Acta neurologica Scandinavica*, 43 (5), S. 573–579.
- Park, H.; Fisher, K. J.; Aronson, N. N. (1991): Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase. *FEBS Letters*, 288 (1-2), S. 168–172.
- Parkinson-Lawrence, E. J.; Shandala, T.; Prodoehl, M.; Plew, R.; Borlace, G. N.; Brooks, D. A. (2010): Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25 (2), S. 102–115.
- Pastores, G. M.; Torres, P. A.; Zeng, B.-J. (2013): Animal models for lysosomal storage disorders. *Biochemistry. Biokhimiia*, 78 (7), S. 721–725.
- Pelkmans, L. (2012): Cell Biology. Using cell-to-cell variability--a new era in molecular biology. *Science (New York, N.Y.)*, 336 (6080), S. 425–426.
- Peltola, M.; Kyttälä, A.; Heinonen, O.; Rapola, J.; Paunio, T.; Revah, F.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1998): Adenovirus-mediated gene transfer results in decreased lysosomal storage in brain and total correction in liver of aspartylglucosaminuria (AGU) mouse. *Gene therapy*, 5 (10), S. 1314–1321.
- Peltonen, L. (1997): Molecular background of the Finnish disease heritage. *Annals of medicine*, 29 (6), S. 553–556.
- Platt, F. M.; d'Azzo, A.; Davidson, B. L.; Neufeld, E. F.; Tiffit, C. J. (2018): Lysosomal storage diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 4 (1), S. 27.
- Pollitt, R. J.; Jenner, F. A.; Merskey, H. (1968): ASPARTYLGLYCOSAMINURIA. *The Lancet*, 292 (7562), S. 253–255.

- Ran, F. A.; Hsu, P. D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D. A.; Zhang, F. (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8 (11), S. 2281–2308.
- Recillas-Targa, F. (2006): Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. *Molecular Biotechnology*, 34 (3), S. 337–354.
- Rice, A. M.; McLysaght, A. (2017): Dosage sensitivity is a major determinant of human copy number variant pathogenicity. *Nature communications*, 8, S. 14366.
- Riedl, S.; Kaiser, P.; Raup, A.; Synatschke, C.; Jérôme, V.; Freitag, R. (2018): Non-Viral Transfection of Human T Lymphocytes. *Processes*, 6 (10), S. 188.
- Riikonen, A.; Ikonen, E.; Sormunen, R.; Lehto, V. P.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1994): Dissection of the molecular consequences of a double mutation causing a human lysosomal disease. *DNA and cell biology*, 13 (3), S. 257–264.
- Riikonen, A.; Rouvinen, J.; Tikkanen, R.; Julkunen, I.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1996): Primary folding of aspartylglucosaminidase. Significance of disulfide bridges and evidence of early multimerization. *The Journal of biological chemistry*, 271 (35), S. 21340–21344.
- Rorbach, J.; Nicholls, T. J. J.; Minczuk, M. (2011): PDE12 removes mitochondrial RNA poly(A) tails and controls translation in human mitochondria. *Nucleic acids research*, 39 (17), S. 7750–7763.
- Roser, A. E.; Caldi Gomes, L.; Schünemann, J.; Maass, F.; Lingor, P. (2018): Circulating miRNAs as Diagnostic Biomarkers for Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 12, S. 625.
- Saarela, J.; Laine, M.; Oinonen, C.; Schantz, C. von; Jalanko, A.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (2001): Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. *Human molecular genetics*, 10 (9), S. 983–995.
- Saarela, J.; Laine, M.; Tikkanen, R.; Oinonen, C.; Jalanko, A.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1998): Activation and oligomerization of aspartylglucosaminidase. *The Journal of biological chemistry*, 273 (39), S. 25320–25328.

- Saarela, J.; Schantz, C. von; Peltonen, L.; Jalanko, A. (2004): A novel aspartylglucosaminuria mutation affects translocation of aspartylglucosaminidase. *Human mutation*, 24 (4), S. 350–351.
- Saftig, P.; Klumperman, J. (2009): Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10 (9), S. 623–635.
- Schulze, H.; Kolter, T.; Sandhoff, K. (2009): Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochimica et biophysica acta*, 1793 (4), S. 674–683.
- Seltenes Merkmal Swiss - AGU Seltene Krankheit: Aspartylglucosaminurie (2018). Online verfügbar unter <https://raretraitswiss.ch/de/>, zuletzt geprüft am 24.07.2021.
- Settembre, C.; Fraldi, A.; Medina, D. L.; Ballabio, A. (2013): Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14 (5), S. 283–296.
- Sewell, A. C. (1981): Simple laboratory determination of excess oligosacchariduria. *Clinical chemistry*, 27 (2), S. 243–245.
- Shaw, G.; Morse, S.; Ararat, M.; Graham, F. L. (2002): Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16 (8), S. 869–871.
- Sui, L.; Lakshminarasimhan, D.; Pande, S.; Guo, H.-C. (2014): Structural basis of a point mutation that causes the genetic disease aspartylglucosaminuria. *Structure (London, England : 1993)*, 22 (12), S. 1855–1861.
- Syvanen, A.; Ikonen, E.; Manninen, T.; BENGSTROM, M.; SODERLUND, H.; Aula, P.; Peltonen, L. (1992): Convenient and quantitative determination of the frequency of a mutant allele using solid-phase minisequencing: Application to aspartylglucosaminuria in Finland. *Genomics*, 12 (3), S. 590–595.
- Szczesny, R. J.; Kowalska, K.; Klosowska-Kosicka, K.; Chlebowski, A.; Owczarek, E. P.; Warkocki, Z.; Kulinski, T. M.; Adamska, D.; Affek, K.; Jedroszkowiak, A.; Kotrys, A. V.; Tomecki, R.; Krawczyk, P. S.; Borowski, L. S.; Dziembowski, A. (2018): Versatile approach for functional analysis of human proteins and efficient stable cell line generation using FLP-mediated recombination system. *PLoS one*, 13 (3), e0194887.

- Tikkanen, R.; Enomaa, N.; Riikonen, A.; Ikonen, E.; Peltonen, L. (1995): Intracellular sorting of aspartylglucosaminidase: the role of N-linked oligosaccharides and evidence of Man-6-P-independent lysosomal targeting. *DNA and cell biology*, 14 (4), S. 305–312.
- Tikkanen, R.; Peltola, M.; Oinonen, C.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1997): Several cooperating binding sites mediate the interaction of a lysosomal enzyme with phosphotransferase. *The EMBO journal*, 16 (22), S. 6684–6693.
- Tikkanen, R.; Riikonen, A.; Oinonen, C.; Rouvinen, R.; Peltonen, L. (1996): Functional analyses of active site residues of human lysosomal aspartylglucosaminidase: implications for catalytic mechanism and autocatalytic activation. *The EMBO journal*, 15 (12), S. 2954–2960.
- Tokola, A. M.; Åberg, L. E.; Autti, T. H. (2015): Brain MRI findings in aspartylglucosaminuria. *Journal of neuroradiology = Journal de neuroradiologie*, 42 (6), S. 345–357.
- Tomizawa, M.; Shinozaki, F.; Motoyoshi, Y.; Sugiyama, T.; Yamamoto, S.; Sueishi, M. (2013): Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World journal of methodology*, 3 (4), S. 39–44.
- Urnov, F. D.; Miller, J. C.; Lee, Y.-L.; Beausejour, C. M.; Rock, J. M.; Augustus, S.; Jamieson, A. C.; Porteus, M. H.; Gregory, P. D.; Holmes, M. C. (2005): Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435 (7042), S. 646–651.
- Vellodi, A. (2005): Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology*, 128 (4), S. 413–431.
- Virta, S.; Rapola, J.; Jalanko, A.; Laine, M. (2006): Use of nonviral promoters in adenovirus-mediated gene therapy: reduction of lysosomal storage in the aspartylglucosaminuria mouse. *The journal of gene medicine*, 8 (6), S. 699–706.
- Voznyi, Y.; Keulemans, J. L.; Kleijer, W. J.; Aula, P.; Gray, G. R.; van Diggelen, O. P. (1993): Applications of a new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of aspartylglucosaminuria. *Journal of inherited metabolic disease*, 16 (6), S. 929–934.
- Walkley, S. U. (2004): Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. *Seminars in cell & developmental biology*, 15 (4), S. 433–444.

- Wang, X.; Li, S. (2014): Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1846 (1), S. 13–25.
- Ward, R. J.; Alvarez-Curto, E.; Milligan, G. (2011): Using the Flp-In™ T-Rex™ system to regulate GPCR expression. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 746, S. 21–37.
- Wraith, J. E. (2002): Lysosomal disorders. *Seminars in neonatology : SN*, 7 (1), S. 75–83.
- Xia, B.; Asif, G.; Arthur, L.; Pervaiz, M. A.; Li, X.; Liu, R.; Cummings, R. D.; He, M. (2013): Oligosaccharide analysis in urine by maldi-tof mass spectrometry for the diagnosis of lysosomal storage diseases. *Clinical chemistry*, 59 (9), S. 1357–1368.
- Xing, Z.; Kenty, B. M.; Li, Z. J.; Lee, S. S. (2009): Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 103 (4), S. 733–746.
- Xu, H.; Ren, D. (2015): Lysosomal physiology. *Annual review of physiology*, 77, S. 57–80.
- Yamamoto, T.; Shimojima, K.; Matsufuji, M.; Mashima, R.; Sakai, E.; Okuyama, T. (2017): Aspartylglucosaminuria caused by a novel homozygous mutation in the AGA gene was identified by an exome-first approach in a patient from Japan. *Brain & development*, 39 (5), S. 422–425.
- Yamano, S.; Dai, J.; Moursi, A. M. (2010): Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. *Molecular biotechnology*, 46 (3), S. 287–300.
- Yang, J.; Lee, J.; Land, M. A.; Lai, S.; Igoshin, O. A.; St-Pierre, F. (2021): A synthetic circuit for buffering gene dosage variation between individual mammalian cells. *Nature communications*, 12 (1), S. 4132.
- Yao, C. P.; Zhang, Z. X.; Rahmanzadeh, R.; Huettmann, G. (2008): Laser-based gene transfection and gene therapy. *IEEE transactions on nanobioscience*, 7 (2), S. 111–119.
- Ye, Q.; Tian, G.-P.; Cheng, H.-P.; Zhang, X.; Ou, X.; Yu, X.-H.; Tan, R.-Q.; Yang, F.-Y.; Gong, D.; Huang, C.; Pan, Y.-J.; Zhang, J.; Chen, L.-Y.; Zhao, Z.-W.; Xie, W.; Li, L.; Zhang, M.; Xia, X.-D.; Zheng, X.-L.; Tang, C.-K. (2018): MicroRNA-134 Promotes the Development of Atherosclerosis Via the ANGPTL4/LPL Pathway in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 25 (3), S. 244–253.

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

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen für das Ermöglichen und die großartige Unterstützung dieser Doktorarbeit. Ein herzliches Dankeschön möchte ich gerne Dr. Antje Banning aussprechen. Ich danke dir für die gute Betreuung und deiner Hilfe, auf die ich immer zählen konnte.

Ebenso gilt ein lieber Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tikkanen. Durch eure herzliche Art habe ich mich im Labor wohl gefühlt. Insbesondere möchte ich Simone Kegel und Ralf Füllkrug für die geduldige Einführung und die angenehme Stimmung im Labor danken.

Einen großen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen, die mir das Studium ermöglicht hat und mir immer motivierend zur Seite stand. Ihr habt einen großen Teil zum Erfolg meines Studiums und meiner Dissertation beigetragen. Darüber hinaus gilt mein Dank all meinen Freunden, die mich jederzeit unterstützt haben.

Als Dank für ihre bedingungslose Liebe und kontinuierliche Unterstützung ist die vorliegende Dissertation meiner Mutter gewidmet.