

Aspartylglukosaminurie:  
Hitzeschockprotein-Aktivierung als  
Therapieansatz

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

vorgelegt von Jurkat, Annika  
aus Rendsburg

Gießen 2018

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wudy

Tag der Disputation: 12.03.2019

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lysosomale Speicherkrankheiten	1
1.1.1	Aspartylglukosaminurie	2
1.1.2	Aspartylglukosaminidase	4
1.1.3	AGA-Gen und Mutationen	6
1.1.4	AGU-Fin-major Mutation	6
1.1.5	T122K Mutation	7
1.1.6	Therapieansätze	7
1.2	Proteinfaltung und -Struktur	9
1.3	Wirkstoffe	10
1.3.1	Hitzeschockantwort und Hsp70	10
1.3.2	Celastrol	11
1.3.3	Arimoclomol	11
1.4	Ziele der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Chemikalien und Reagenzien	16
2.3	Lösungen und Puffer	19
2.4	SDS-Polyacrylamidgele	21
2.5	Kits	22
2.6	Plasmide	22
2.7	Primer	23
2.8	Bakterienstämme	23
2.9	Humane Zelllinien	24
2.10	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	25
2.10.1	Antikörper	25
2.10.2	Fluoreszenzfarbstoffe	26
2.11	Molekularbiologische Methoden	26
2.11.1	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.11.2	Elektrophorese und Gelextraktion der PCR-Produkte	27
2.11.3	Restriktionsverdau des PCR-Produktes	27
2.11.4	Restriktionsverdau des Vektors	27
2.11.5	Ligation	27
2.11.6	Transformation	28

2.11.7	Mini-Plasmidpräparation	28
2.11.8	Puffer für Mini-Plasmidpräparation ohne Kit	29
2.11.9	Midi-Plasmidpräparation	29
2.11.10	DNA-Konzentrationsmessung	29
2.12	Biochemische Methoden	30
2.12.1	Herstellung von rekombinantem Hsp70	30
2.12.2	Strep-tag-Protein Reinigungspuffer und Säule	31
2.12.3	Twin-Strep-tag-Protein Aufreinigung	31
2.13	Polyacrylamid-Gel	32
2.13.1	Western-Blot	33
2.14	Zellbiologische Methoden	34
2.14.1	Kultivierung von HEK- und Fibroblasten-Zellen	34
2.14.2	Passagieren von HEK- und Fibroblasten-Zellen	34
2.14.3	Transiente Transfektion von HEK-Zellen	34
2.14.4	Behandlung von HEK- und Fibroblasten-Zellen	35
2.14.5	Optimierung der Celastroldosierung	35
2.14.6	Zellysatherstellung aus HEK- und Fibroblasten-Zellen	36
2.14.7	Proteinbestimmung nach Bradford am Plattenphotometer	36
2.14.8	Fluorimetrischer AGA-Aktivitätsassay (Banning et al. 2016)	36
2.14.9	Immunfluoreszenzfärbung	37
2.14.10	Quantifizierung der Fluoreszenz mit Lyotrackerfärbung	37
2.15	Statistische Auswertung und Bildbearbeitung	38
2.15.1	Statistik	38
2.15.2	Elektronische Manipulation der Abbildungen	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Klonierung von Hsp70 in die Plasmide pPR-IBA102, pEXPR-IBA103 und pcDNA3	40
3.2	Hsp70	41
3.2.1	Herstellung von rekombinantem Hsp70	41
3.2.2	Behandlung von Zellen mit Hsp70	43
3.2.3	Transfektion mit Hsp70	44
3.2.4	Immunfluoreszenzfärbung von behandelten Fibroblasten	45
3.3	Celastrol	46
3.3.1	Dosisoptimierung von Celastrol	46
3.3.2	HEK-Behandlung mit Celastrol	48
3.3.3	Fibroblastenbehandlung mit Celastrol	49

3.3.4	Fluoreszenzmessung bei Fibroblasten	49
3.3.5	Immunfluoreszenzfärbung von behandelten Fibroblasten	50
3.4	MG 115	52
3.4.1	Fibroblastenbehandlung mit MG 115	52
3.5	Arimoclomol	53
3.5.1	HEK-Behandlung mit Arimoclomol	53
3.5.2	Fibroblastenbehandlung mit Arimoclomol	54
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung von behandelten Fibroblasten	55
4	Diskussion	57
4.1	Molekulare und pharmakologische Chaperone	57
4.2	AGA-Aktivität in Patientenzellen nach Aktivierung der Hitzeschock-Antwort	58
4.3	Wirkung von Behandlung mit Celastrol und Arimoclomol	58
4.4	Wirkung von Behandlung mit MG 115	62
4.5	Wirkung von Behandlung mit rekombinantem Hsp70	63
4.6	Wirkung von transienter Transfektion mit Hsp70	65
4.7	Fazit	66
4.8	Ausblick	67
5	Zusammenfassung	69
6	Summary	70
7	Abkürzungsverzeichnis	71
8	Abbildungsverzeichnis	73
9	Tabellenverzeichnis	74
10	Literaturverzeichnis	75
11	Erklärung zur Dissertation	82
12	Danksagung	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Lysosomale Speicherkrankheiten

Zur Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten werden ungefähr 60 genetische Erkrankungen gezählt. Die Anzahl der Neuerkrankungen liegt bei einer geschätzten, kombinierten Inzidenz zwischen 1:4.000 und 1:13.000 Lebendgeborenen (Vairo et al. 2017, Meikle et al. 1999, Pinto et al. 2004, Poupetová et al. 2010).

In einigen Gebieten kommen diese Krankheiten deutlich häufiger vor, besonders in Umgebungen mit isolierten Populationen oder bei hoher Konsanguinität (ACOG Committee on Genetics 2004, Langlois et al. 2006). Die klassischen lysosomalen Speicherkrankheiten sind eine Gruppe von autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselstörungen. Nur eine kleine Anzahl wird x-chromosomal vererbt (Cox und Cachón-González 2012). Die meisten bei diesen Erkrankungen betroffenen Gene kodieren lysosomale Enzyme oder Proteine, welche am lysosomalen Abbau oder dem Transport beteiligt sind. Einige kodieren auch für lysosomale Membranproteine (Parenti et al. 2015). Wenn das betroffene Enzym seine Tätigkeit nicht mehr oder nur noch mangelhaft ausführen kann, kommt es zur Akkumulation des nicht abzubauenen Substrates. Bezieht sich das Problem auf ein defektes Membranprotein, kann das Speichermuster komplex sein, welches abhängig von der Funktion des jeweiligen Proteins ist (Ballabio und Gieselmann 2009).

Bei den anomalen Anhäufungen von Makromolekülen kann es sich zum Beispiel um Glykoproteine oder Lipide, wie Glykolipide und Sphingolipide handeln (Ciechanover 2012). Die jeweilige lysosomale Speicherkrankheit zeichnet sich durch das spezifische, nicht abgebaute Substrat aus. In einigen Fällen kommt es auch zur Akkumulation von Sekundärspeichermetaboliten, wodurch sich die benötigte Behandlung deutlich komplexer darstellt (Walkley 2004).

Lysosomale Speicherkrankheiten führen durch die fortschreitende Akkumulation der Makromoleküle und durch zelluläre Fehlfunktion innerhalb verschiedener Gewebetypen zur Auslösung der jeweiligen krankheitsspezifischen, klinischen Symptome (Davidson und Vander Heiden 2017). In ungefähr 70% der lysosomalen Speicherkrankheiten hat die lysosomale Dysfunktion Einfluss auf das zentrale Nervensystem und führt zu progressiven, neurodegenerativen Erkrankungen (Wraith 2002). Außerdem sind periphere Organe und Gewebe betroffen, sodass es bei der Mehrheit der Erkrankungen zu chronischen Folgeerkrankungen kommt (Pastores et al. 2013).

Zum Zeitpunkt der Geburt wirken die Patienten der meisten lysosomalen Speicherkrankheiten gesund. Ausnahmen sind beispielsweise die

Mukopolysaccharidosen, bei denen das Skelett und die extrazelluläre Matrix betroffen sind (Wraith 2013). Je nach Symptomen werden die lysosomalen Speicherkrankheiten durch das Auftreten von viszeralen Erkrankungen, das Zurückbleiben in der Entwicklung (Regier et al. 2016) oder auch durch verhaltensverändernde, psychiatrische Symptome erkannt (Staretz-Chacham et al. 2010).

Sehr häufig werden die Diagnosen allerdings erst spät gestellt, sodass in einer Familie durchaus mehrere Geschwister mit derselben lysosomalen Speicherkrankheit geboren werden (Kingma et al. 2015). Die Gründe für diesen Zustand sind vielfältig. Die Diagnosestellung wird jedoch durch die hauptsächlich allgemeinen Symptome und aufgrund der Seltenheit der Erkrankungen häufig erschwert (Cismondi et al. 2015). Ebenfalls kommt es leicht zur Fehldiagnose, was dazu führt, dass die Krankheit höchstwahrscheinlich unterdiagnostiziert ist (Arvio et al. 1993).

### **1.1.1 Aspartylglukosaminurie (AGU)**

Erstmals wurde 1968 durch den Nachweis von Aspartylglukosamin im Urin Aspartylglukosaminurie bei zwei Geschwistern einer britischen Familie beschrieben (Pollitt et al. 1968). Diese lysosomale Speicherkrankheit tritt hauptsächlich in der finnischen Bevölkerung auf und wird autosomal-rezessiv vererbt (Valkonen et al. 1999, Peltola et al. 1998, Saarela et al. 2004). Die Inzidenz wird mit mindestens 1:18.500 Lebendgeburten in Finnland angegeben (Arvio et al. 1993). Aspartylglukosaminurie entsteht durch den Mangel an Aspartylglukosaminidase (AGA) (EC 3.5.1.26), welcher aufgrund von einer Mutation des AGA-Gens entsteht (Mononen et al. 1991, Haltia et al. 1975). Zum Zeitpunkt der Geburt weisen die an AGU erkrankten Kinder keine krankhaften Veränderungen auf (Arvio et al. 1999). Im Verlauf der Entwicklung treten gehäuft Atemwegsinfektionen und Hernien auf. Motorische Koordination und Sprachvermögen entwickelt sich unzureichend und verzögert (Arvio et al. 1993). Im Durchschnitt kann die klinische Diagnose von AGU im Alter von fünf Jahren gestellt werden. Bis ins Erwachsenenalter verschlechtern sich geistige und körperliche Fähigkeiten sukzessive bis hin zu einer geistigen Behinderung von mittlerem bis schwerem Grad. Die Patienten sind schnell reizbar und viele leiden unter periodischen, epileptischen Anfällen (Arvio et al. 1993). Verschiedene Knochen zeigen Anomalien auf und im Verlauf der Krankheit ist der Verlust von Gehirnzellen darstellbar, sodass die Erkrankung einen charakteristischen MRT-Befund aufweist (Tokola et al. 2015). Ebenfalls treten Bindegewebsdefekte und chronisch entzündliche Arthritis auf (Arvio et al. 1998a). Für die typischen Gesichtszüge sorgen ein kurzer Nasenrücken, ein breites

Gesicht und voluminöse Lippen. Gehäuft treten eine eingeschränkte Mundöffnung und weitere orale Probleme, wie Fehlstellungen der Zähne, eingeschränkte Mundgesundheit, Gingivitis und Karies, sowie auch odontogene Tumoren und Zahnfleischhyperplasien auf (Arvio et al. 1997, Arvio et al. 1998b). Das Erscheinungsbild, die Gesichtszüge und die Körperform, sowie die Persönlichkeit des Patienten sind charakteristisch für diese Erkrankung (Arvio et al. 2004). Die Lebenserwartung der Patienten liegt durchschnittlich zwischen 45 und 50 Jahren (Arvio und Mononen 2016).

Zur Stellung der Diagnose gibt es verschiedene Optionen. Biochemisch besteht die Möglichkeit die Diagnose von AGU über die Untersuchung der Oligosaccharide im Harn der Patienten zu stellen (Xia et al. 2013, Mononen et al. 1988b), sowie die Bestimmung der Aspartylglukosaminidase-Aktivität. Ist der Nachweis von akkumuliertem Aspartylglukosamin erbracht (Kaartinen und Mononen 1989, Mononen et al. 1986), ist eine Messung der AGA-Aktivität durchzuführen. Diese Messung kann im Serum, in Leukozyten oder in Fibroblasten erfolgen (Mononen et al. 1994).

Eine pränatale Nachweismethode dieser Erkrankung kann durch einen Enzymtest in kultivierten Fruchtwasserzellen oder in einer Chorionzottenbiopsie erfolgen (Aula et al. 1984, Aula et al. 1989). Eine Analyse im Fruchtwasser direkt ist ebenfalls möglich, jedoch gilt diese Methode nicht als zuverlässige Diagnose für Aspartylglukosaminurie (Mononen et al. 1988a). In Finnland wird die Diagnose von AGU-Fin-major (Mononen et al. 1991, Fisher et al. 1990, Ikonen et al. 1991b) und AGU-Fin-minor Mutationen (Isoniemi et al. 1995), sowie die Identifizierung von Trägern dieser Mutationen (Delahunty et al. 1995, Hietala et al. 1996) mit DNA-Tests durchgeführt. Auch bei AGU-Patienten außerhalb Finnlands wird mithilfe von DNA-Tests die Diagnose gestellt oder bestätigt (Yamamoto et al. 2017). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung gibt es in vielen Gebieten keinen Zugang zu Screening-Systemen (Yamamoto et al. 2017), wie zum Beispiel MALDI-TOF/ TOF MS, welches in der Lage ist lysosomale Erkrankungen durch den Nachweis von freien Oligosacchariden und auch Aspartylglukosamin im Urin zu diagnostizieren (Xia et al. 2013). Besonders wichtig ist allerdings die Verwendung von DNA-Tests zur genauen Bestimmung der jeweiligen Mutation, da verschiedene Mutationen auch auf potentielle Therapieansätze unterschiedlich reagieren können (Banning et al. 2016).

### 1.1.2 Aspartylglukosaminidase

Das Enzym Aspartylglukosaminidase, auch AGA (EC 3.5.1.26), ist eine lysosomale Glykoasparaginase und zählt zur Familie der N-terminalen, nukleophilen Hydrolasen (Oinonen et al. 1995, Tikkanen et al. 1996). Seine Aufgabe ist die Hydrolysierung der Amidbindung zwischen Asparagin und der Oligosaccharidkette von Glykoproteinen (Makino et al. 1968).

Bei einer fehlenden Aktivität von AGA kommt es zu einer Störung, die durch den mangelhaften Abbau von Glykoproteinen verursacht wird. Der in Glykoproteinen enthaltene Kohlenhydratanteil, welcher über eine N-glykosidische Bindung zwischen der Aminosäure L-Asparagin und dem Monosaccharid N-Acetylglucosamin an den Proteinteil gebunden ist, wird durch Aspartylglukosaminidase gespalten. Der Enzymmangel von AGA führt zur Akkumulation von nicht abgebautem Aspartylglucosamin und anderen Glykokonjugaten, die einen L-Asparaginrest enthalten. Diese Reste häufen sich in Geweben und Körperflüssigkeiten von Patienten an (Mononen et al. 1993).

AGA wird als enzymatisch inaktives Vorläuferpolypeptid synthetisiert. Anschließend erfolgt im endoplasmatischen Retikulum eine Spaltung in zwei Untereinheiten, welche zur autokatalytisch-proteolytischen Aktivierung des Enzymkomplexes führt (Ikonen et al. 1993, Riikonen et al. 1996). Dieser Vorgang wird durch die Dimerisierung von zwei inaktiven Vorläufermolekülen der Aspartylglukosaminidase eingeleitet (Riikonen et al. 1996). Die beiden entstehenden Untereinheiten heißen Pro- $\alpha$ , mit 27 kDa und  $\beta$ -Untereinheit mit 17 kDa. Die Pro- $\alpha$  Untereinheit wird vom C-Terminus her prozessiert und eine reife  $\alpha$ -Untereinheit mit 24 kDa entsteht. Letzterer Vorgang findet in den Lysosomen statt, in welche der aktive Enzymkomplex zuvor verbracht wird (Ikonen et al. 1993). AGA wird durch die Freisetzung der  $\alpha$ -Aminogruppe von Thr206, welche der N-terminale Rest der  $\beta$ -Untereinheit ist, aktiviert. Die OH-Gruppe von Thr206 greift die Carbonylgruppe des Substrates an und eine Enzym-Substrat-Übergangsbinding entsteht (Tikkanen et al. 1996), in der die Carbonylgruppe des Thr257 stabilisiert wird (Oinonen et al. 1995). Unter Addition von Wasser werden das Kohlenhydrat und die Asparaginsäure freigesetzt und im Anschluss die ausgelöste Kettenreaktion beendet (Tikkanen et al. 1996). Für die katalytische Aktivität der Aspartylglukosaminidase sind die Seitenkette und die freie  $\alpha$ -Aminogruppe von Thr206 essentiell (Tikkanen et al. 1996, Saarela et al. 1998).

Das reife AGA-Enzym stellt dann ein Heterotetramer dar, welches jeweils aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei  $\beta$ -Untereinheiten besteht, die heterogen glykosyliert sind. Das aktivierte Enzym enthält zwei katalytische Bereiche auf den gegenüberliegenden Seiten

des Moleküls (Kaartinen et al. 1991) und insgesamt vier intramolekulare Disulfidbrücken, von denen jeweils zwei pro  $\alpha\beta$ -Dimer vorliegen (Riikonen et al. 1996). Die beiden nahezu identischen  $\alpha\beta$ -Heterodimere des Tetramers bilden in ihrem Kern eine  $\alpha\beta\alpha$ -Sandwichstruktur aus. Hierbei liegen  $\beta$ -Ketten antiparallel zwischen  $\alpha$ -Helices. Die  $\beta$ -Kette besitzt ein N-terminales Threonin, welches sich in der tiefen Tasche des trichterförmigen aktiven Zentrums des Moleküls befindet und für die Katalyse essentiell ist (Riikonen et al. 1996, Tikkanen et al. 1996). Die  $\alpha$ -Untereinheiten bilden im oberen Teil des Moleküls C-terminale Loops. Diese werden als AGU-Fin Loops bezeichnet (Oinonen et al. 1995).

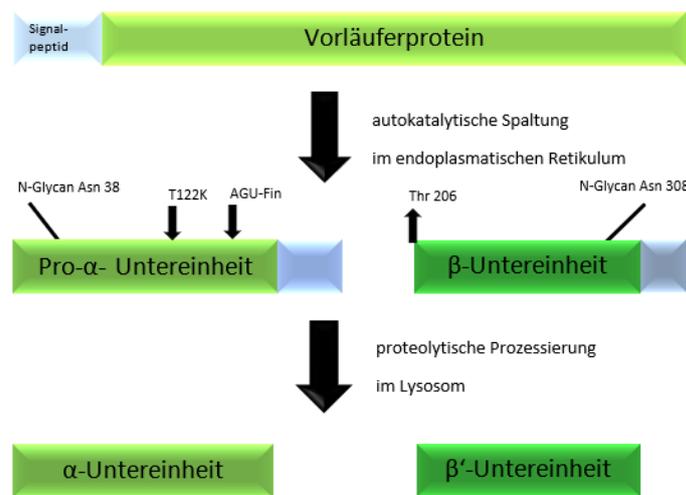


Abbildung 1: „Prozessierung und Aktivierung von Aspartylglucosaminidase (AGA)“ modifiziert nach (Banning et al. 2017): Die Orte der untersuchten Mutationen AGU-Fin-major und T122K sind auf der Pro- $\alpha$ -Untereinheit angezeigt. AGA wird als Vorläufermolekül synthetisiert, von dem das Signalpeptid entfernt wird. Im endoplasmatischen Retikulum werden zwei Vorläufer, die ein Homodimer bilden in zwei Pro- $\alpha$ -Untereinheiten mit 27 kDa und in zwei  $\beta$ -Untereinheiten mit 17 kDa prozessiert. Dieser Vorgang erfolgt durch eine autokatalytische Spaltung zwischen Asp205 und Thr206. Dadurch bildet sich ein Heterotetramer aus zwei  $\alpha$ -Untereinheiten und zwei  $\beta$ '-Untereinheiten. Im Anschluss erfolgt der Transport ins Lysosom und dort die C-terminale Trimmung. Es entstehen die reifen  $\alpha$ -Untereinheiten mit 24 kDa und die  $\beta$ '-Untereinheiten mit 14 kDa. AGA enthält zwei N-Glykosylierungsstellen an Asn38 und Asn308.

### 1.1.3 AGA-Gen und Mutationen

In der Chromosomenregion 4q32-q33 befindet sich das Gen des Enzyms AGA. Es umfasst 10.688 bp (Grön et al. 1990, Morris et al. 1992), wobei die cDNA der Aspartylglukosaminidase 1.041 bp beträgt und 346 Aminosäuren kodiert (Fisher et al. 1990, Ikonen et al. 1991a).

Bei den mehr als 30 bekannten Mutationen des Enzyms AGA handelt es sich um Deletionen, Insertionen, Substitutionen, Missense-, Nonsense- und Splicing-Mutationen. Ebenfalls treten Kombinationen dieser Mutationen auf (Saarela et al. 2001). Viele der AGU-Mutationen sind familienspezifisch, führen jedoch überwiegend zur Einschränkung oder Inaktivierung des AGA-Enzyms. Trotz der unterschiedlichen Arten der Mutationen und ihrer Lokalisation auf dem AGA-Gen, ist der Phänotyp der AGU-Patienten verhältnismäßig übereinstimmend (Ikonen et al. 1991a).

### 1.1.4 AGU-Fin-major Mutation

In der finnischen Population ist eine bestimmte Mutation in 98% der AGU-Allele vorhanden und wird deshalb als AGU-Fin-major bezeichnet (Ikonen et al. 1991b). Die höchste Prävalenz der AGU-Fin-major Mutation liegt in Finnland bei einer Trägerfrequenz von 1:30 bis 1:40 (Aula et al. 1986). Die meisten finnischen Patienten mit dieser Mutation sind homozygot (Ikonen et al. 1991b). Bei AGU-Fin-major handelt es sich um einem Austausch von Cystein163 gegen Serin und einen zusätzlichen Polymorphismus von Arginin161 zu Glutamin (Saarela et al. 2001, Ikonen et al. 1991a). Die Mutation befinden sich im C-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit des AGA-Enzyms (Mononen et al. 1991). Die Missense-Mutation führt zum Verlust einer intramolekularen Disulfidbrücke im AGA-Enzym (Riikonen et al. 1996). Das aktive Zentrum des Enzyms ist im Fall von AGU-Fin-major jedoch nicht direkt betroffen. Der Verlust einer intramolekularen Disulfidbrücke führt zur Beeinflussung der Konformation des AGA-Vorläuferproteins. Es kommt zur Destabilisierung der Enzymstruktur, welche die Spaltung des Vorläuferproteins in Untereinheiten erschwert (Ikonen et al. 1991b, Mononen et al. 1991). Es kann höchstwahrscheinlich davon ausgegangen werden, dass ein lokaler Faltungsdefekt das Hauptproblem bei AGU-Fin-major ist. Dieser führt jedoch weder zu erheblicher Destabilisierung noch zur Degradation des Proteins (Banning et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass AGU-Fin-mutiertes AGA hauptsächlich in Lysosomen vorkommt und nur eine geringe Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum und im trans-Golgi-Netzwerk vorliegt. Da lysosomaler Transport von der Struktur des zu transportierenden Proteins abhängig ist, kann man davon ausgehen,

dass die AGU-Fin-major Mutation die Struktur des AGA-Enzyms nicht schwerwiegend beeinträchtigt. In Patientenfibroblasten mit der AGU-Fin-major Mutation ist jedoch eine signifikant reduzierte Enzymaktivität messbar (Banning et al. 2016).

### 1.1.5 T122K Mutation

Bei der T122K AGA-Mutation erfolgt der Austausch von Threonin122 zu Lysin. Die Mutation befindet sich im Bereich des C-Terminus, der  $\alpha$ -Untereinheit, der Aspartylglukosaminidase. Sie tritt bei zwei männlichen Geschwistern aus den Vereinigten Staaten in heterozygoter Form zusammen mit einer großen genomischen Deletion auf. Die Messungen der AGA-Enzymaktivität der Patientenfibroblasten weist eine signifikante Reduktion auf (Banning et al. 2016). Das Krankheitsbild der Aspartylglukosaminurie zeigt sich bei beiden Brüdern in Form von Sprachverzögerungen, verlangsamten Lernprozessen und reduzierten Aufmerksamkeitsspannen, sowie Einschränkungen der motorischen Funktionen und einem niedrigen Muskeltonus. Zusätzlich treten eine erhöhte Infektanfälligkeit und ebenfalls Allergien und Durchfall auf ([www.raretrait.com](http://www.raretrait.com), 07.12.2017).

Die Mutation befindet sich in der  $\alpha$ -Polypeptidkette von AGA und liegt an der Grenzfläche zwischen zwei  $\alpha\beta$ -Dimeren. Normalerweise ist Threonin122 beim Kontakt mit den Resten der  $\alpha$ -Polypeptidkette und der  $\beta$ -Polypeptidkette der anderen Hälfte des Tetramers beteiligt. Eine Konformationsänderung kann durch den Austausch von Threonin122 zu Lysin hervorgerufen werden, da ein positiv geladenes Lysin im hydrophoben Kern der Dimer-Dimer-Kontaktfläche energetisch ungünstiger ist. Es besteht somit die Vermutung, dass die T122K Mutation Einfluss auf die Verknüpfung der Tetramere hat und dadurch auch auf die Aktivierung des AGA-Enzyms. Auch bei T122K konnte durch Färbung aufgezeigt werden, dass endogenes AGA hauptsächlich in Lysosomen und nur eine geringe Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum und im trans-Golgi-Netzwerk vorliegt, ähnlich wie beim AGU-Fin-Polypeptid (Banning et al. 2016).

### 1.1.6 Therapieansätze

Für die Behandlung von Aspartylglukosaminurie stehen gegenwärtig keinerlei Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Aufgrund eines zwar vorhandenen therapeutischen Effekts der allogenen Knochenmarktransplantation (Autti et al. 1999), die 1990 bei mehreren AGU-Patienten durchgeführt wurde, ist die Therapie wegen

posttranslational auftretenden Komplikationen eingestellt worden (Arvio et al. 2001). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird versucht, eine Enzyersatztherapie (Dunder et al. 2010) und eine Gentherapie (Virta et al. 2006) zu entwickeln. Trotz positiver Effekte beim Einsatz der Enzyersatztherapie an AGU-Mausmodellen (Kaartinen et al. 1996, Jalanko et al. 1998) konnten bisher noch keine klinischen Studien an Patienten durchgeführt werden, da es sehr schwierig ist, ausreichende Mengen an AGA-Enzym herzustellen. Für die Behandlung von Aspartylglukosaminurie stellt die unzureichende Produktion von rekombinantem AGA-Enzym für den Menschen ein erhebliches Problem dar (Kelo et al. 2005, Virta et al. 2006, Dunder et al. 2010). In der Entwicklung einer Gentherapie (Peltola et al. 1998, Virta et al. 2006) wurden in den letzten Jahren Fortschritte durch die Entwicklung von sichereren Vektoren für die Behandlung gemacht (Gray 2013). Eine derartige Therapiemöglichkeit bedarf jedoch weiterhin Zeit, bis sie zur Behandlung von AGU-Patienten eingesetzt werden kann. In den nächsten Jahren scheint keine dieser Therapieoptionen als Behandlungsmöglichkeit für den Menschen zur Verfügung zu stehen (Banning et al. 2016).

Ein vielversprechendes Konzept ist die in den letzten Jahren entstandene Therapie mittels pharmakologischer Chaperone. Dieser therapeutische Ansatz beruht auf der Verwendung von kleinen, chemischen Verbindungen, die jeweils an das Zielprotein binden und die ordnungsgemäße Faltung unterstützen können (Parenti 2009, Boyd et al. 2013). Sie fördern infolgedessen auch die biologische Funktion der Proteine (Arakawa et al. 2006, Fan und Ishii 2007). Die Auswahl der Substanzen, die als pharmakologische Chaperone Anwendung finden, wird aufgrund ihrer Funktion oder ihrer strukturellen Merkmale getroffen (Banning et al. 2016).

In einer präklinischen Studie zeigte Betain als pharmakologisches Chaperon vielversprechende Wirkungen auf Patientenfibroblasten mit den AGU-Mutationen T122K und AGU-Fin-major. Betain (Trimethyl-Glycin) weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Glycin auf. Obwohl der molekulare Wirkmechanismus der verstärkenden Wirkung von Betain auf die AGA-Enzymaktivität nicht ganz klar ist, konnte eine Erhöhung der AGA-Enzymaktivität für die AGU-Fin-major und T122K Mutationen nachgewiesen werden. Ebenfalls trat eine Prozessierung des AGA-Vorläuferproteins in seine Untereinheiten auf, sowie eine Verbesserung der Morphologie der Lysosomen (Banning et al. 2016).

Seit Februar 2018 läuft eine klinische Studie für eine durch Chaperone vermittelte Therapie, in der Betain klinisch an 21 AGU-Fin-major Patienten in Finnland getestet wird (EduraCT Nummer: 2017-000645-48). Das verwendete Betain ist bereits unter dem Namen Cystadane als Medikament für Homocysteinurie zugelassen.

## 1.2 Proteinfaltung und -Struktur

Jedes Protein besitzt eine ganz spezielle dreidimensionale Struktur. Sämtliche zur Faltung nötigen Informationen sind in der Primärstruktur der Aminosäuren in der jeweiligen Polypeptidkette enthalten (Anfinsen 1973). Die endgültige Faltungsstruktur oder Konformation einer Polypeptidkette ist im Allgemeinen diejenige mit der geringsten freien Energie (Eppstein et al. 1963, Huang et al. 2012). Für den Vorgang der Prozessierung und regelrechten Faltung von sezernierten Proteinen und Transmembranproteinen ist das endoplasmatische Retikulum verantwortlich (Gupta et al. 2015). Jedes Protein faltet sich normalerweise nur in einer einzigen stabilen Konformation. Diese Konformation ändert sich jedoch oft etwas, wenn ein Protein mit anderen Molekülen in der Zelle in Wechselwirkung tritt (Goodsell und Olson 2000).

Die molekularen Chaperone sind Proteine, welche die frisch synthetisierten Polypeptidketten während des Faltungsvorgangs vor Zusammenlagerung und Proteinaggregation schützen. Sie binden transient an die hydrophoben Bereiche der neu synthetisierten Polypeptidketten und machen den Faltungsvorgang so zuverlässiger (Wei und Hendershot 1996). Zu dieser spezialisierten Klasse von Proteinen zählen die Gruppen der Hsp60- und Hsp70-Proteine, von denen verschiedene Mitglieder in unterschiedlichen Organellen anzutreffen sind (Feder und Hofmann 1999). Viele dieser molekularen Chaperone gehören zu den Hitzeschockproteinen, da ihre Synthese nach einer Temperaturerhöhung in der Zelle zeitnah stark ansteigt. Mit diesem Rückkopplungssystem kann auf einen eventuellen Anstieg fehlgefalteter Proteine reagiert und deren Rückfaltung unterstützt werden. Hsp60 und Hsp70 weisen beide eine Affinität für hydrophobe Bereiche der noch nicht vollständig gefalteten Proteine auf (Young et al. 2004). Bereits bevor das Protein das Ribosom verlässt, bindet Hsp70 an die kurzen, hydrophoben Abschnitte der Polypeptidkette und bietet somit einen Schutz vor vorzeitiger, fehlerhafter Aggregation. Im Gegensatz zu Hsp70-Proteinen greifen Hsp60-Proteine erst nach Beendigung der Synthese der Proteine in das Faltungsgeschehen ein. Hsp60-Proteine werden auch als Chaperonine bezeichnet. Sie bilden eine fassförmige Struktur aus, welche einen Isolationsraum schafft. Der Isolationsraum bietet verbesserte Faltungsbedingungen und dient als Schutz vor Aggregation. In diese Struktur werden auch fehlgefaltete Proteine eingespeist (Young et al. 2004).

Viele Faltungsintermediate, die während des Faltungsprozesses entstehen, führen ohne die Beteiligung von Chaperonen mit umgebenen Substanzen unerwünschte Interaktionen durch. Die Qualitätskontrolle des endoplasmatischen Retikulums unterstützt die Faltung und Modifikation der sezernierten Proteine und der

Membranproteine durch assoziierte Degradation oder Autophagie (Araki und Nagata 2011). Wird durch die Störungen der Funktion des endoplasmatischen Retikulums Stress erzeugt, werden fehlgefaltete Proteine, welche sich im Lumen befinden, akkumuliert. Der Vorgang dient der Wiederherstellung der Homöostase, die insbesondere durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Herstellung von Chaperonen erfolgt. Ist es der Zelle nicht möglich die Homöostase wieder herzustellen, wird die Apoptose eingeleitet (Gupta et al. 2015).

Wenn das Überwachungssystem des endoplasmatischen Retikulums nicht richtig gefaltete oder aggregierte Proteine erkennt, werden sie auch zum Proteasom transportiert. Zuvor werden alle diese Proteine mit Ubiquitin markiert (Kulkarni et al. 2011, Fu und Gao 2014). Das Proteasom ist eine im Zytosol vorkommende kompartimentierte Protease. Sie bildet einen Hohlzylinder, welcher aus vielen Proteinuntereinheiten besteht. Zum Schutz der Zelle liegen die separierten aktiven Zentren im Inneren des Zylinders. Die Aufgabe dieses Apparates ist der zeitnahe, absichtliche Abbau anomaler Proteine (Voges et al. 1999). Im Proteasom bleibt das abzubauen Substrat so lange gebunden, bis es vollständig in kleine Peptide zerlegt worden ist (Moore und Steitz 2005).

## **1.3 Wirkstoffe**

### **1.3.1 Hitzeschockantwort und Hsp70**

Die Hitzeschockantwort ist ein Mechanismus, welcher durch die Produktion von Hitzeschockproteinen die Zelle vor verschiedenen Stressfaktoren schützt. Dieser Prozess ermöglicht es der Zelle, die Proteinhomöostase aufrecht zu erhalten. Hsp70 ist ein Chaperon, das an der zellulären Proteinhomöostase und der Verhinderung von Proteinfehlfaltung und Proteinaggregation beteiligt ist (Hartl und Hayer-Hartl 2002). Hsp70 lagert sich an hydrophobe Aminosäuren während der Proteinsynthese und unterstützt dadurch das Erreichen der korrekten Konformation (Feder und Hofmann 1999).

Die Hsp70-Proteine zählen zu einer der am stärksten konservierten Proteinfamilien in der Evolution. In allen Eukaryoten sind mehrere Hsp70 kodierende Gene vorhanden und im Menschen gibt es einige Varianten von Hsp70. Durch Stress induzierbar sind hauptsächlich Hsp70-1 (HspA1A) und Hsp70-2 (HspA1B), die zusammen als Hsp70 bezeichnet werden (Daugaard et al. 2007).

Wird die Zelle zellulärem Stress, ausgelöst durch Hitze, Schwermetalle oder UV-Strahlung ausgesetzt, wird der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) aktiviert. Bei diesem Vorgang lagern sich drei identische HSF1-Moleküle zusammen an die DNA und es bildet sich eine stabile DNA-HSF1-Verbindung. Dieser Prozess sorgt für die vermehrte Bildung von Hitzeschockproteinen durch die Aktivierung ihrer Transkription (Neudegger et al. 2016). Eine Auslösung von HSF1 und somit die Hochregulierung der Transkription der natürlichen Chaperone Hsp70 und Hsp90 kann bei der Behandlung mit den Proteasomregulatoren MG132 oder Celastrol beobachtet werden. Diese unterstützen dann wiederum die Faltung der Proteine, welche sich im endoplasmatischen Retikulum und im Zytosol ansammeln (O'Leary und Igdoura 2012).

### 1.3.2 Celastrol

*Tripterygium wilfordii* gehört zur Familie der Celastraceae und ist in Südchina heimisch. Aus dieser Pflanze wurde eine Verbindung der Triterpene isoliert und als Celastrol bezeichnet (Allison et al. 2001). Celastrol (3-Hydroxy-24-nor-2-oxo-1(10),3,5,7-friedelatetraen-29-oic acid) ist ein Chinonmethid-Triterpen, ein kleines, bioaktives Molekül mit entzündungshemmender und antitumorale Wirkung (Yang et al. 2006). Es zeigt eine zytoprotektive Wirkung und ist in der Lage, die Hitzeschockantwort des Menschen zu aktivieren. Durch seine spezifische Struktur kann Celastrol den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 aktivieren (Westerheide et al. 2004). Celastrol kann durch eine Wechselwirkung mit der Thiolgruppe von Cysteinen innerhalb des Proteasoms als Proteasomenregulator wirken und den Abbau von mutierten Enzymen bei bestimmten lysosomalen Speicherkrankheiten verhindern (Mu et al. 2008a), (Salminen et al. 2010). Zusätzlich schützt Celastrol die Zellen vor der Akkumulationen der Substrate und sorgt für die Verringerung der Amyloidplaquebildung im Gehirn von Alzheimer-Mausmodellen und in Zelllinien (Paris et al. 2010).

### 1.3.3 Arimoclomol

Arimoclomol wird auch als BRX-345 bezeichnet und ist ein Analogon von Bimoclomol. Arimoclomol hat jedoch eine längere Halbwertszeit als Bimoclomol und wird im Körper besser aufgenommen (Parfitt et al. 2014). Es ist ein Hydroximinsäurederivat und wirkt als Hitzeschock-Koinduktor (Kieran et al. 2004). Arimoclomol führt zur Verbesserung des Überlebens von Motoneuronen, sowohl beim SODG93A-Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose (Kieran et al. 2004, Kalmar et al. 2008), als auch bei einem Mausmodell

der spinalen bulbären Muskelatrophie, einer Trinukleotid-Repeat-Störung (Malik et al. 2013).

Es wurde gezeigt, dass Arimoclomol die Aktivierung von HSF1 verlängert und verstärkt (Kieran et al. 2004, Harqitai et al. 2003), was zu einer Hochregulation von Hsp70 und Hsp90 führt (Kieran et al. 2004, Kalmar et al. 2008). Der HSF1-Aktivator Arimoclomol gilt als sicher in der Anwendung und ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Cudkowicz et al. 2008). Arimoclomol kann jedoch nur bei Zellen die bereits unter Stress stehen die Hitzeschock-Antwort induzieren, da es kein Aktivator, sondern ein Ko-Induzierer ist (Kalmar et al. 2008).

Bei der Arimoclomolbehandlung von Fibroblasten der Patienten mit Niemann-Pick-Erkrankung des Typs C1, konnte eine signifikante Reduktion der lysosomalen Ansammlungen von unverestertem Cholesterin nachgewiesen werden. Eine Verringerung der lysosomalen Akkumulation in Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick-Erkrankung A und metachromatischer Leukodystrophie konnte bei einer Behandlung mit Arimoclomol in ähnlichem Maße beobachtet werden (Kirkegaard et al. 2016). Die Langzeitverabreichung von Arimoclomol konnte bei signifikanter Besserung des Krankheitsphänotyps bei Mäusen mit spinaler und bulbärer Muskelatrophie ohne nennenswerte Nebenwirkungen gut vertragen werden (Malik et al. 2013).

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

Durch die beiden hier untersuchten Mutationen AGU-Fin-major und T122K wird nur ein lokaler Faltungsfehler im AGA-Vorläuferenzym induziert. Man könnte daher davon ausgehen, dass eine Korrektur dieser Faltungsfehler möglich ist. Zur Vermeidung und Korrektur von Fehlfaltungen und Aggregationen von Proteinen werden im Körper molekulare Chaperone verwendet, die als Therapieansatz in Frage kämen.

Die Substanzen Celastrol, MG 115 und Arimoclomol, sowie das Hitzeschockprotein Hsp70, welche die Hitzeschock-Antwort auslösen und Proteinfaltung verbessern können, sind bei der Behandlung von einigen lysosomalen Speicherkrankheiten aussichtsreich.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die obigen Substanzen Einfluss auf die Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym in seine Untereinheiten, sowie eine Auswirkung auf die Aktivität der Aspartylglukosaminidase haben. Ebenfalls sollte ein eventuell vorhandener Effekt der Substanzen auf die krankhaft veränderten Lysosomen durch bildgebende Verfahren überprüft werden. Zu diesem Zweck sollen Patientenfibroblasten mit den Mutationen AGU-Fin-major und T122K, sowie stabil

transfizierte HEK293T-Zellen in Bezug auf das Verhalten der AGA-Enzymaktivität und die Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym unter Einfluss der Substanzen untersucht werden. Zusätzlich soll durch Immunfluoreszenzfärbung ein eventueller Effekt auf die Morphologie der Lysosomen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Gefäße

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese Kammer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Bakterienschüttler, KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Cellstar® Plastikröhrchen 15ml, 50ml	greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen, Durchmesser 15 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Entwickler Maschine, Curix 60	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Filterpapier Protran BA 83	Whatman, Dassel, Deutschland
Glaskolben	Schott-AG, Mainz, Deutschland
Heizblock, HLC	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Inkubator, Sanyo	EWALD, Innovationstechnik GmbH, München, Deutschland
Laser-Scanning Mikroskop 710 Meta	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar, Deutschland
Mikrotestplatte 96 Well F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Moticam 1.000 (1.3 MP Live Resolution)	Motic, Wetzlar, Deutschland
Multipipette, elektr., HandyStep®	Brand, Wertheim, Deutschland
Nitrozellulose-Transfermembran	Whatman, Dassel, Deutschland
Objekträger	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Opi-Platte™-96 Well, schwarz	PerkinElmer, Zaventem, Belgien
Parafilm	Bemis, Wisconsin, Vereinigte Staaten
Pasteurpipetten, Glas	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Petrischale, Glas, 10 cm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland

Polystyrolküvetten, 10x4x45 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, 0,5; 1,5; 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm, Super RX-N	FUJIFILM, Düsseldorf, Deutschland
Schwenktisch, WS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
PCR System 2700, Gene Amp	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
PCR-Gerät T personal Kombi	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Rundbodenröhrchen, 14 ml	FALCON, Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
SDS-Gel Gießkammer	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Spannungsquelle, Elektrophoresis power supply, EPS 301	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer, BioPhotometer Plus	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, Deutschland
Sterilbank, Herasafe KS	Thermo Scientific, St.Leon-Rot, Deutschland
Tecan infinite M200	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Ultraschallgerät, Sonoplus	Bandelin electronics, Berlin, Deutschland
Vortex VELP	VELP Scientifica Srl, Usmate, Italien
Waage Toledo, PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Wasserbad, LAUDA	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Western-Blotsystem, Criterion Blotter	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflasche T 25, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 6; 12; 24 Well, Standard F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Zellkulturschale 100, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale 60, Cell +	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge, Micro 22 R	Hettich Zentrifugen, Kirchlingern, Deutschland
Zentrifuge, Universal 32 R	Hettich Zentrifugen, Kirchlingern, Deutschland

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
ImmunoPure HABA, 2-(4'-Hydroxyphenylazo) –Benzoessäure	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS, Ammoniumpersulfat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Arimoclomol	Carbosynth Ltd. Berkshire, Vereinigtes Königreich
Bradford Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau, Na-Salz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA, Bovine Serum Albumine	PAA, Cölbe, Deutschland
Celastrol	Selleckchem.com, Houston, Vereinigte Staaten
Coomassie Brillant blau G250	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Cumarinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
Digitonin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's medium, high glucose	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
DMSO, Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNA-Marker	NEB GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
DTT, Dithiothreitol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Electrolytic buffer E <sub>2</sub>	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fluormount™ Aqueous Mountag	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS, Fetales Kälberserum	gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
IPTG, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
L-Aspartic acid β-(7-amido-4-methylcoumarin), ASP-AMC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MACSfectin™ Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MEM NEAA (100x), Minimum Essential Medium, Non- Essential Amino Acids	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MG 115	APExBio, Houston, Vereinigte Staaten
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Pyruvat 100 mM (100x)	gibco® Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Optimem, Gluta MAX	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
PBS, Phosphat gepufferte Salzlösung	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Penicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepstatin A	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PFA, Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF, Phenylmethansulfonylfluorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin, 0,01% Lösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Proteinmarker	BioRad Laboratories Inc, München, Deutschland
Rapid-Phosphatase	Roche, Mannheim, Deutschland
Resuspension Puffer R	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Rotiphorese, Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS, Natriumdodecylsulfat	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich Deutschland
Sterilium classic pure	Dode, Hamburg, Deutschland
TEMED, N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan-Blau-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zeocin	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösungen/ Puffer	Zusammensetzung	
Blockierungspuffer	5%	Milchpulver TBST
DMEM ++	500 ml 10% 1%	DMEM FCS Penicillin
DMEM +++++	500 ml 10% 1% 1% 1%	DMEM FCS MEM NEAA Natrium Pyruvat Penicillin
ECL-Lösung, verstärkte Chemielumineszenz-Lösung	440 µl, 0,2 mM 1 ml, 1,25 mM 100 mM	Cumarinsäure Luminol Tris-HCl, pH 8,5
Entfärber, Coomassiegel	7,5% 7,5%	Essigsäure Ethanol, verg.
Glycerol-Stock Puffer	65% 0,1 M 25 mM	Glycerol Magnesiumsulfat Tris-HCl, pH 8
Gelelektrophorese Laufpuffer Lämmli	192 mM 0,1% 25 mM	Glycin SDS Tris-Base
LB-Agar	15 g	Agar Pulver

	1 l	LB Medium
LB (Luria/ Miller) Medium	20 g 1 l	LB Brühe dest. Wasser
Lysepuffer	2 mM 150 mM 1% 50 mM	EDTA Natriumchlorid NP-40 Tris, pH 7,5
Mcllvain's Phosphat-Citrat-Puffer pH 4,5	76,4 ml 18,16 ml, 0,5 M 5,46 ml, 1 M	dest. Wasser Natriumdihydrogen phosphat Zitronensäure
Mcllvain's Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,5	68,7 ml 28,4 ml, 0,5 M 2,9 ml, 1 M	dest. Wasser Natriumdihydrogen phosphat Zitronensäure
PBS, Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4	150 mM 20 mM	Natriumchlorid Natriumdihydrogen phosphat
Ponceau Färbelösung	5% 1%	Essigsäure Ponceau S
Proteinladepuffer, 4x	0,1% 100 mM 10% 2% 50 mM	Bromphenolblau DTT Glycerin SDS Tris-HCl, pH 6,8
SOC-Medium	40 mM	Glucose LB-Medium
Stripping Puffer, alkalisch	0,1 M	Natriumhydroxid
Stripping Puffer, sauer	0,2 M	Glycin, pH 2,5
TBST Tris gepufferte Salzlösung + Tween 20	150 mM 10 mM 0,05%	Natriumchlorid Tris-HCl, pH 7,4 Tween 20
Transferpuffer, 1x	192 mM 10%	Glycin Methanol

	25 mM	Tris-Base
Tris-Acetat-EDTA Puffer, TAE	1 mM	EDTA
	40 mM	Tris, pH 8

## 2.4 SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Art	Zusammensetzung	
Sammelgel: 1 mm, 4%	2,55 ml	Acrylamid 30%
	0,075 ml	APS 10%
	11,7 ml	dest. Wasser
	0,075 ml	SDS 20%
	0,0225 ml	TEMED
	0,624 ml	Tris pH 6,8 (3 M)
Trenngel: 1 mm, 10%	13,4 ml	Acrylamid 30%
	0,4 ml	APS 10%
	21 ml	dest. Wasser
	0,2 ml	SDS 20%
	0,064 ml	TEMED
	5 ml	Tris pH 8,8 (3 M)
Trenngel: 1 mm, 15%	20,09 ml	Acrylamid 30%
	0,4 ml	APS
	14,25 ml	dest. Wasser
	0,2 ml	SDS 20%
	0,064 ml	TEMED
	5 ml	Tris pH 8,8 (3 M)

## 2.5 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® Gel and PCR Clean- up	Macherey-Nagel GmbH &Co. KG Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH &Co. KG Düren, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH &Co. KG Düren, Deutschland

## 2.6 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Konstrukt	Resistenz	Restriktionsenzyme	Ursprung
pcDNA3	Ampicillin/ Neomycin	BamHI, XhoI	Invitrogen, Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
pEXPR-IBA102	Ampicillin	EcoRI, BamHI	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
pEXPR-IBA103	Ampicillin	XbaI, BamHI	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland

## 2.7 Primer

Die folgenden Primer sind alle von der Firma Sigma-Aldrich aus Taufkirchen in Deutschland bezogen worden.

Tabelle 7: Verwendete Primer mit jeweiliger Sequenz

Primer	Sequenz (5'-3'), (Schnittstelle hervorgehoben)
Hsp70 pcDNA3 BamHI fwd	CTAT <b>AGGATCC</b> ATGGCCAAAGCCGCGGCG ATCG
Hsp70 pExpr-IBA103 BamHI no stop	CTAT <b>AGGATCC</b> ATCTACCTCCTCAATGGTG GGG
Hsp70 pPR-IBA102 BamHI rev	CTAT <b>AGGATCC</b> CTAATCTACCTCCTCAATG GTG
Hsp70 pPR-IBA102 EcoRI fwd	CTAT <b>GAATTC</b> GGCCAAAGCCGCGGCGAT CGGCA
Hsp70 pExpr-IBA103 XbaI ATG fwd	CTATAT <b>CTAGA</b> ATGGCCAAAGCCGCGGCG ATCG
Hsp70 pcDNA3 XhoI rev	CTATA <b>CTCGAG</b> CTAATCTACCTCCTCAATG GTG

## 2.8 Bakterienstämme

Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Verwendung	Quelle
E. coli XL-1 blue	DNA-Amplifikation	Agilent/ Stratagene, La Jolla, Vereinigte Staaten
E. coli Rosetta™ (DE3)	Proteinexpression	Novagen, Darmstadt, Deutschland

## 2.9 Humane Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Informationen	Quelle
Fibroblasten: Wildtyp	immortalisierte, humane Hautfibroblasten	von Dr. Steven Gray, University of North Carolina zur Verfügung gestellt, (Banning et al. 2016)
Patientenfibroblasten: AGU-Fin-major	AGU-Fin-major Mutation beinhaltende Zellen	von Corriell, Institute for Medical Research, in Camden, Vereinigte Staaten, (Banning et al. 2016)
Patientenfibroblasten: T122K	T122K-Mutation beinhaltende Zellen	von Dr. Steven Gray, University of North Carolina zur Verfügung gestellt, (Banning et al. 2016)
HEK293T-AGA-Opti, Human Embryonic Kidney	immortalisierte, humane, embryonale Nierenzellen, Überexpression von codonoptimiertem AGA	(Banning et al. 2016)
HEK293T Klon 20	HEK293T ohne AGA- Expression (mit CRISPR/ Cas9 generiert)	(Kapahnke et al. 2016)
HEK293T AGU-Fin- major	HEK293T Klon 20 mit stabiler Expression von AGU-Fin-major	von AG Tikkanen zur Verfügung gestellt
HEK293T T122K	HEK293T Klon 20 mit stabiler Expression von T122K	von AG Tikkanen zur Verfügung gestellt

## 2.10 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

### 2.10.1 Antikörper

Tabelle 10: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

WB= Western Blot, IF= Immunfluoreszenz

Primärantikörper:				
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller/ Referenz
AGA	Kaninchen	1:5.000	/	(Tikkanen et al. 1995)
Anti-GAPDH Antibody (6C5) ab 8245	Maus	1:10.000	/	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
HSP70/ HSC70 (W27): sc-24	Maus	1:10.000	/	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Strep-Tag® II Monoclonal Antibody (71590-3)	Maus	1:2.000	/	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lamp-3 (MX- 49.129.5): sc- 5275	Maus	/	1:150	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Sekundärantikörper				
Bezeichnung	Wirt	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller
Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse	Esel anti Maus	/	1:300	invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Polyclonal Goat Anti- Rabbit Immunglobuli- ns/ HRP	Ziege anti Kaninchen	1:10.000	/	Dako, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunglobuli- ns/ HRP	Ziege anti Maus	1:10.000	/	Dako, Hamburg, Deutschland

## 2.10.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 11: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
DAPI	1:1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
LysoTracker® Red DND-99 1 mM Solution in DMSO	1:400	invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

## 2.11 Molekularbiologische Methoden

### 2.11.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Zweck der Amplifikation von Hsp 70 durch PCR wurde bereits vorher die aus HeLa-Zellen isolierte RNA in stabile doppelsträngige cDNA umgeschrieben und als Matrize zur Verfügung gestellt.

Die Denaturierung der Template-DNA durch Erhitzung auf 98°C erfolgte für 30 Sekunden. In 45 folgenden Zyklen wurde jeweils bei 98°C 10 Sekunden denaturiert, bei 60°C für 20 Sekunden hybridisiert und bei 72°C für jeweils 60 Sekunden elongiert.

Der verwendete Ansatz beinhaltete 13,3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 0,5 µl cDNA, 0,4 µl dNTPs (0,2 mM) (Roth), 4 µl 5xQ5-Puffer, 0,6 µl DMSO, 0,2 µl Q5® HiFi DNA Polymerase (NEB GmbH), sowie jeweils 0,5 µl Primer fwd (final 0,5 µM) und 0,5 µl Primer rev (0,5 µM).

### **2.11.2 Elektrophorese und Gelextraktion der PCR-Produkte**

Bei der elektrophoretischen Größenaufftrennung fand ein 1%iges Agarosegel mit TAE-Puffer und Ethidiumbromid (1:10.000) Anwendung. Die PCR-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt.

Mit dem Gel und PCR Clean-up Kit von NucleoSpin wurde die Extraktion und Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte in 20 µl NE-Puffer.

### **2.11.3 Restriktionsverdau des PCR-Produktes**

Das gereinigte PCR-Produkt wurde für einen Restriktionsverdau wie folgt eingesetzt: 15 µl gereinigtes PCR Produkt, 2 µl Cutsmart 10x Puffer (NEB GmbH), 0,2 µl BSA, je 0,5 µl Restriktionsenzyme (20 U/ul) (Eco RI und Bam HI, Xba I und Bam HI, Bam HI und Xho I) und mit 1,8 µl Wasser auf 20 µl Gesamtansatz aufgefüllt.

Über Nacht wurde der Ansatz bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das verdaute PCR-Produkt mit dem Gel und PCR Clean-up Kit von NucleoSpin aufgereinigt und in 10 µl Elutionspuffer aufgenommen.

### **2.11.4 Restriktionsverdau des Vektors**

2,5 µl des jeweiligen Vektors (pPR-IBA102, pEXPR-IBA103 und pcDNA3) (2,5 µg) wurden mit 2 µl Cutsmart 10x Puffer, 0,2 µl BSA, jeweils 0,5µl Restriktionsenzyme (20 U/ul), und mit 14,3 µl destilliertem Wasser verdaut, bei 37°C über Nacht inkubiert und im Anschluss mit Gel und PCR Clean-up Kit NucleoSpin aufgereinigt.

Für pPR-IBA102 fanden die Restriktionsenzyme Eco RI und Bam HI, für pEXPR-IBA103 Xba I und Bam HI und für pcDNA3 Bam HI und Xho I Anwendung.

### **2.11.5 Ligation**

Zur Verknüpfung von aufgereinigten PCR-Fragmenten und dem jeweiligen Plasmid wurden 1 µl Vektor (ca. 100 ng), 7 µl PCR-Produkt, 1 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB GmbH) verwendet. Das Gemisch ligierte 12 Stunden bei 16°C.

### 2.11.6 Transformation

100 µl kompetente E. coli XL-1 blue wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes 30 Minuten auf Eis gemischt. Darauf folgte für eine Minute ein Hitzeschock bei 42°C und im Anschluss wurde der Ansatz direkt für zwei Minuten auf Eis wieder abgekühlt. Nach der Zugabe von 500 µl SOC-Medium schüttelte die Zellsuspension in einem Eppendorfgefäß für 1 Stunde bei 37°C, damit sich die Bakterien wieder erholen konnten. Ausplattiert wurde jeweils auf zwei selektiven LB-Agarplatten mit Ampicillin, auf einer Platte 100 µl und auf einer weiteren die restliche Zellsuspension. Über Nacht erfolgte die Inkubation bei 37°C.

Zur Herstellung von rekombinantem Hsp70 mit Strep-tag wurde die Transformation in E. coli Rosetta (DE3) mit 2 µl Plasmid aus der Plasmidpräparation durchgeführt. Jegliche weiteren Schritte glichen denen des obigen Vorgehens.

### 2.11.7 Mini-Plasmidpräparation

Von den selektiven LB-Agarplatten wurden Einzelkolonien gepickt und in ein Rundbodenröhrchen mit 5 ml LB-Medium und Ampicillin (250 µg/ml) gefüllt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und 5x g im Schüttler.

Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und dazu zu Beginn je 2 ml der Bakteriensuspension in jeweils ein 2 ml Eppendorfgefäß gefüllt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 19.000x g wurden die Überstände verworfen und die entstandenen Pellets in jeweils 100 µl Resuspensionspuffer: P1 durch vortexen resuspendiert und 100 µl Lysepuffer: P2 hinzugefügt. Fünfmaliges sanftes Mischen schloss sich an. Es folgte die Zugabe von 100 µl Neutralisationspuffer: P3 und ein weiteres fünfmaliges sanftes Mischen. Das Gemisch wurde erneut bei 19.000x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die mit jeweils 200 µl 75%igem Isopropanol versetzten Überstände zentrifugierten in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 19.000x g für 10 Minuten.

200 µl 75%iges Ethanol wurden mit dem entstandenen Pellet bei 19.000x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Pellets trockneten nach Entfernung des Überstandes für 15 Minuten bei Raumtemperatur in den Eppendorfgefäßen. Sie wurden anschließend in 50 µl DEPC-Wasser gevortext und somit gelöst.

Danach erfolgte eine Restriktionsspaltung zur Kontrolle. Je 5 µl der jeweiligen Minipräparation inkubierten mit 0,2 µl Restriktionsenzym in 10 µl Ansätzen für eine Stunde bei 37°C. Um die positiven Klone zu ermitteln, wurden die Ansätze mit 6x Ladepuffer auf ein Agarosegel geladen. Von den verbleibenden Bakterienkulturen von jeweils zwei positiven Klonen wurden neue Übernachtskulturen angeimpft und einer

weiteren Plasmidpräparation mit dem Kit NucleoSpin Plasmid nach Anleitung des Herstellers unterzogen. Die DNA-Konzentrationsmessung wurde wie unter Punkt 2.11.10 beschrieben durchgeführt. Das Produkt wurde zur Bestätigung bei eurofins Genomics Germany sequenziert.

### 2.11.8 Puffer für Mini-Plasmidpräparation ohne Kit

Tabelle 1: Verwendete Puffer bei der Mini-Plasmidpräparation ohne Kit

Resuspensionspuffer: P1	10 mM 100 µg/ml 50 mM	EDTA RNAse A Tris
Lysepuffer: P2	200 mM 1%	Natriumhydroxid SDS
Neutralisationspuffer: P3	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5

### 2.11.9 Midi-Plasmidpräparation

In einem Erlenmeyerkolben wurden 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (250 µg/ml) versetzt und 4 ml der Bakteriensuspension aus dem Rundbodenröhrchen mit dem korrekten Sequenzierungsergebnis hinzugegeben. Über Nacht schüttelten die Kolben bei 37°C und 5x g. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung des Plasmids mit dem Kit NucleoBond Xtra Midi EF nach dem Kit beiliegender Anleitung. Die Herstellung von Glycerolstocks schloss sich an.

### 2.11.10 DNA-Konzentrationsmessung

Die Messung der doppelsträngigen DNA erfolgte auf der TECAN Nano Quant plate im TECAN. Zur Messung wurden 2µl DEPC-Wasser zum Nullabgleich verwendet und im Anschluss die Probe des reinen DNA-Plasmids bei 260 nm in Duplikaten gemessen.

## 2.12 Biochemische Methoden

### 2.12.1 Herstellung von rekombinantem Hsp70

#### 2.12.1.1 Induktion

Nach der Transformation der E. coli Rosetta wurde die Suspension auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und Einzelkolonien in einem Rundbodenröhrchen über Nacht bei 37°C in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (250 µg/ml) inkubiert. 4 ml der Kultur wurden am nächsten Tag in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml LB-Medium und Ampicillin überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Alle 30 Minuten wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Bei einem Wert von 0,4-0,6 war die aktive Teilungsphase erreicht.

1 ml Bakteriensuspension wurde entnommen und bei 4°C im Eppendorfgefäß gelagert. Die Induktion der restlichen Bakterienkultur erfolgte mit IPTG (1 mM) direkt in das LB-Medium und verblieb über Nacht bei 20°C im Schüttler. Am Folgetag kam es erneut zur Entnahme von 1 ml induzierter Bakteriensuspension. Jeweils 30 µl der Suspension vor und nach der IPTG-Induktion wurden mit 125 µl 2x red. Ladepuffer versetzt und auf einem 10%igen Polyacrylamidgel zur Kontrolle des Erfolgs der Induktion laufen gelassen. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassiefärbelösung gefärbt. Das Polyacrylamidgel wurde zu diesem Zweck 30 Minuten in einer Petrischale in Coomassiefärbelösung geschwenkt, über Nacht in Entfärberlösung bei Raumtemperatur gelagert und im Anschluss gescannt. Die restlichen Bakteriensuspensionen wurden bei 4°C und 100x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Bakterienpellets bei -20°C eingefroren.

#### 2.12.1.2 Prinzip der Aufreinigung eines Twin-Strep-tag-Proteins

Der Vorteil vom synthetischen Peptid Twin-Strep-tag ist, dass das System Reinigung und Nachweis von Proteinen durch die Affinitätschromatographie ermöglicht. Ein besonderer Vorteil des Twin-Strep-tags ist seine inerte Eigenschaft und die geringe Größe. Es besteht zweimal aus der Aminosäurenabfolge Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys. Durch diese Sequenzen zeigt es eine intrinsische Affinität zu Strep-Tactin. Dieses spezielle Streptavidin ist N-terminal am rekombinanten Protein fusioniert und hat eine sehr hohe Affinität zu Biotin.

Markierte Proteine können über die Säule behutsam aus dem Bakterienlysat isoliert werden. Das System eignet sich somit sehr gut für die Herstellung von funktionellen Proteinen. Die Strep-Tactin Superflow Säule enthält das Strep-Tactin, welches in ihr fixiert ist. An ihm bindet das markierte Protein spezifisch und bei den anschließenden

Waschschritten werden die anderen Proteine entfernt. Die anschließende Zugabe von Desthiobiotin eluiert das noch vorhandene am Strep-Tactin fixierte Protein durch Konkurrenz.

Um die Säule mehrfach verwenden zu können, wird Desthiobiotin durch Zugabe einer Lösung mit HABA entfernt. HABA wird im Anschluss dann durch den Puffer W herausgewaschen und die Säule ist erneut verwendbar.

### 2.12.2 Strep-tag-Protein Reinigungspuffer und Säule

Tabelle 2: Verwendete Substanzen und Säule zur Strep-tag-Proteinaufreinigung

Pufferart	Zusammensetzung
Puffer E	2,5 mM Desthiobiotin 1 mM EDTA 150 mM Natriumchlorid 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Puffer R	1 mM EDTA 1 mM HABA 150 mM Natriumchlorid 100 mM Tris-HCL, pH 8,0
Puffer W	1 mM EDTA 150 mM Natriumchlorid 100 mM Tris-HCl pH
Säulenbezeichnung	Hersteller
Strep-Tactin Superflow 1 ml bed volume	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland

### 2.12.3 Twin-Strep-tag-Protein Aufreinigung

Das gefrorene Pellet der Bakterien mit Twin-Strep-tag-Proteinexpression wurde auf Eis mit 2 ml Puffer W, Aprotinin (1,5 µM), Leupeptin (23 µM), Pepstatin A (1,5 µM) und PMSF (1 mM) versetzt, resuspendiert und mit Ultraschall jeweils 10 Sekunden bei 85% Amplitude (Sonoplus, Bandelin) behandelt. Im Anschluss wurde Lysozym (0,2 mg/ml)

hinzugefügt und das Gemisch bei Raumtemperatur für 20 Minuten auf einem Schüttler bewegt. Einer erneuten Lagerung des Gemisches auf Eis für 30 Minuten, schloss sich eine weitere Ultraschallbehandlung an. Vor der Zentrifugation bei 24.000x g bei 4°C für 30 Minuten wurden 50 µl entnommen. Der Überstand wurde auf die Spezialsäule Strep-Tactin Superflow (IBA GmbH) gegeben, welche zuvor durch die Zugabe von 2 ml Puffer W äquilibrierte.

Der Durchfluss wurde in zwei Eppendorfgläsern aufgefangen. Diesem Vorgang schloss sich eine fünfmalige Waschung der Säule mit jeweils 1 ml Puffer W an. Jeder Waschschrift wurde separat in einem Eppendorfglas aufgefangen. Anschließend eluierte das Twin-Strep-tag-Protein durch die sechsmalige Zugabe von 0,5 ml Puffer E in die Säule. Auch hierbei wurde jede Fraktion separat in jeweils einem Eppendorfglas gesammelt. Die Regeneration der Säule erfolgte durch den dreimaligen Durchlauf mit 5 ml Puffer R. Zur Lagerung der Säule bei 4°C wurde Puffer R durch Puffer W ausgetauscht und die Deckel mit Parafilm gesichert. Von Überstand, Durchfluss 1+2, Waschschrift 1-3 und Elution 1-6 wurden jeweils 30 µl mit 10 µl 4x Ladepuffer versetzt. Dem Pellet, welches die in dem Puffer unlöslichen Bestandteile enthielt und aus den 50 µl entnommenem Bakteriengemisch hergestellt wurde, wurden 40 µl H<sub>2</sub>O und 20 µl 4x Ladepuffer hinzugefügt. Nach fünfminütigem Kochen bei 95°C konnten 30 µl einer jeden Probe auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen werden. Durch die Coomassiefärbung erkannte man die Elutionsfraktionen, die das rekombinante Hsp70 (rHsp70) enthielten. Über eine Proteinmessung nach Bradford wurde der Gehalt des rHsp70-Proteins in den Elutionsfraktionen bestimmt und dieses stand dann für weitere Versuche zur Verfügung.

### **2.13 Polyacrylamid-Gel**

Zur Anwendung kamen 1 mm dicke Polyacrylamidgele mit 4%igen Sammelgelen. Trenngele waren 10%ig für die anschließende Coomassiefärbung und 15%ig für den anschließenden Western Blot.

Die Auftrennung erfolgte im Lämmli-Puffer bei 220 V für ungefähr 1,5 Stunden und bei 15 mA pro Gel im Sammelgel, sowie bei 20 mA pro Gel im Trenngel. Im Abstand von einem Zentimeter zum Ende des Gels wurde der Vorgang beendet.

Die zu verwendenden Proben wurden alle mit destilliertem Wasser auf eine gleiche Proteinkonzentration verdünnt. Zusätzlich kochten die Proben bei 94°C nach der Beimengung von 4x Ladepuffer für fünf Minuten.

## **2.13.1 Western-Blot**

### **2.13.1.1 Transfer**

Dieser Vorgang fand in einer Blotkammer, die mit Blotsalz gefüllt war, statt. In der Haltevorrichtung wurde das Polyacrylamidgel mit einer Nitrozellulosemembran zwischen Filterpapier und Schwämmen fixiert. Die im 15%igen Polyacrylamidgel nach der Größe in Banden aufgetrennten Proteine wurden beim Transfer auf die Nitrozellulosemembran übertragen und spiegelten die Banden exakt wieder. Der Transfer lief bei 220 V und 400 mA für 1,5 Stunden ab. Durch die anschließende temporäre Färbung mit Ponceau S Farbstoff konnten die auf der Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine sichtbar gemacht werden. Dieser Vorgang diente der Kontrolle.

### **2.13.1.2 Immundetektion**

Durch 5%iges Milchpulver in TBST wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Die Inkubationszeit betrug hierbei 30 Minuten auf einem Schwenktisch. Nachfolgend wirkte der spezifische, primäre Antikörper über Nacht bei 4°C ein. Am nächsten Tag folgte auf die anschließenden drei 10-minütigen Waschschriffe mit TBST die einstündige Einwirkzeit von einem passenden sekundären Antikörper. An diesen Schritt schlossen sich wieder drei 10-minütige Waschschriffe mit TBST an.

Auf die getrocknete Membran wirkte für zwei Minuten 1 ml ECL-Lösung mit 1 µl 10%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein. Die im Anschluss getrocknete Membran wurde in einer Röntgenkassette fixiert. Je nach Signalstärke wurde der Röntgenfilm eine Sekunde bis 30 Minuten auf der Membran belassen und im Anschluss entwickelt.

### **2.13.1.3 Strippen**

Nitrozellulosemembranen konnten auch mehrfach immundetektiert werden. Die bereits gebundenen Antikörper mussten jedoch vor einer weiteren Immundetektion durch den Vorgang des Strippens denaturiert und entfernt werden. Die Membran wurde jeweils für fünf Minuten in 0,1 M NaOH und in destilliertem Wasser gewaschen. Wenn der neue primäre Antikörper den gleichen sekundären Antikörper erforderte, konnte das Strippen durch vorheriges Inkubieren mit 0,2 M Glycinlösung intensiviert werden. Im Anschluss konnten durch das 30-minütige Einwirken mit 5%igem Milchpulver in TBST erneut die unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden und eine weitere Immundetektion der Membran war ermöglicht.

## **2.14 Zellbiologische Methoden**

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

Die eingesetzten Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sie wuchsen in Zellkulturflaschen mit 5 ml DMEM.

Die humanen Fibroblasten befanden sich in DMEM++++, welchem 10% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin, sowie je 1% MEM NEAA (100x) und Natrium Pyruvat (100 mM) zugesetzt wurde. Im Unterschied zu den Fibroblasten erhielten die HEK-Zellen nur DMEM ++, ein Medium ohne zusätzliche Gabe von Aminosäuren und Natrium Pyruvat. Die HEK-Zellen wuchsen jedoch unter Selektionsdruck durch die Zugabe von Zeocin (100 µg/ml), ausgenommen HEK-Klon 20.

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

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium entfernt und im Anschluss erfolgte ein Waschgang mit 2 ml PBS. Unter Zugabe von 500 µl Trypsinlösung + EDTA inkubierten die Zellen für drei Minuten bei 37°C. Dieser Vorgang sorgte für die Ablösung der Zellen vom Gefäßboden durch den Verdau der Zell-Zell-Kontakte und der Zell-Matrix-Verbindungen durch die enthaltenen Peptidasen. Zur Blockade der Wirkung wurden der Zellsuspension 2 ml FCS-haltiges DMEM hinzugefügt. Nach der Resuspendierung standen die Zellen zur Aussaat für Versuche oder die Erhaltungskultur zur Verfügung. Bei diesem Vorgang wurde für die HEK-Zellen das Medium DMEM++ und für die Fibroblasten das Medium DMEM++++ verwendet.

### **2.14.3 Transiente Transfektion von HEK-Zellen**

Bei der transienten Transfektion der HEK-Zellen kam MACSfectin zur Anwendung. Die Zellen wurden am Vortag in 12-Well-Platten so ausgesät, dass eine ausreichende Konfluenz von mindestens 80% am Transfektionstag gewährleistet wurde. Die Herstellung des Transfektionsansatzes erfolgte in zwei Gefäßen. 100 µl Optimem-Medium und 500 ng Plasmid, sowie 100 µl Optimem-Medium und 2 µl MACSfectin wurden vorerst separat kombiniert und anschließend gemischt. Das komplette Transfektionsgemisch inkubierte bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Im Anschluss wurden jeweils 200 µl des Transfektionsgemisches pro Well für 24 Stunden auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen

beziehungsweise die Zellen gegebenenfalls auf 6-Well-Platten umgesetzt. Am darauffolgenden Tag standen die transient transfizierten Zellen für weiterführende Versuche zur Verfügung.

#### 2.14.4 Behandlung von HEK- und Fibroblasten-Zellen

Die Zellen wurden immer am Vortag der Behandlung in 6-Well-Platten ausgesät und bei 37°C inkubiert, so dass sie eine ausreichende Konfluenz von mindestens 80% am Verwendungstag erreicht hatten. Zur Behandlung durch die jeweilige Substanz erfolgte die Gabe direkt in das jeweilige DMEM Medium. Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Lysatherstellung, wie unter Punkt 2.14.6 beschrieben, vorgenommen.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Substanzen und Konzentrationen bei angegebenen Zellarten in den durchgeführten Versuchen

Substanz	Konzentration	Zellart
Arimoclomol	50 µM	Fibroblasten
Arimoclomol	50 µM	HEK-Zellen
Celastrol	250 nM	Fibroblasten
Celastrol	1 µM	HEK-Zellen
Hsp70	300 nM	Fibroblasten
MG 115	0,6 µM	Fibroblasten

#### 2.14.5 Optimierung der Celastroldosierung

Zur Bestimmung der zu verwendenden Celastrolmenge für die Fibroblastenbehandlung wurde eine Dosisreihe durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Kultur der verwendeten Fibroblasten aus Wildtyp-Fibroblasten und den Patientenzellen Agu-Fin-major und T122K in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zugabe von Celastrol in den Konzentrationen von 1 µM, 500 nM, 250 nM und 100 nM erfolgte nach 24 Stunden. Der Zustand der Zellen wurden vor der Behandlung dokumentiert. Eine Kontrollaufnahme der unterschiedlich behandelten Fibroblasten erfolgte jeweils nach 17 Stunden und teilweise nach 23 Stunden. Die Aufnahmen wurden mit der Moticam 1.000 in Kombination mit dem verwendeten Mikroskop aufgenommen.

### **2.14.6 Zelllysatherstellung aus HEK- und Fibroblasten-Zellen**

Die Zellernte fand immer auf Eis statt. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und diese mit je 2 ml PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS gab man eine ausreichend große Menge Lysepuffer mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) (1:100) direkt auf die Zellen für einen Schwenkvorgang für 15 Minuten. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von den Platten gelöst und im Puffer in ein Eppendorfgefäß überführt. Während der nächsten 15 Minuten auf Eis wurden die Proben mehrmals gevortext. Nach dem anschließenden 10 sekündigen Ultraschallen bei 95% Amplitude ruhten die Zellen für 10 Minuten erneut auf Eis und zentrifugierten dann 10 Minuten bei 31.000x g bei +4°C. Nach der Zentrifugation wurde das Lysat vom Pellet getrennt, indem der Überstand in neue Eppendorfgefäße gefüllt wurde. Die Lysate standen darauffolgend für sich anschließende Versuche zur Verfügung.

### **2.14.7 Proteinbestimmung nach Bradford am Plattenphotometer**

Vor der Proteinmessung wurden die Zellen wie oben beschrieben lysiert. Die Messung erfolgte in einer transparenten 96-Well-Platte im Mikrotiterplatten-Reader in Triplikaten der jeweiligen Proben und Standards. Der Ansatz bestand aus 10 µl verdünntem Zelllysate und 200 µl Biorad-Reagenz, welches 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt wurde. Die Messung erfolgte bei 595 nm. Die Standardreihe enthielt folgende Konzentrationen Albumin 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.

Bei den Fibroblasten-Lysaten war die verwendete Verdünnung immer 1:10. Bei den HEK-Lysaten lag die Verdünnung zwischen 1:20 bis 1:50, je nach Proteingehalt. Verdünnt wurde in destilliertem Wasser.

### **2.14.8 Fluorimetrischer AGA-Aktivitätsassay (Banning et al. 2016)**

Vor der Aktivitätsmessung wurden die Zellen wie oben unter 2.14.6 beschrieben lysiert. Die Messung erfolgte in einer schwarzen 96-Well-Platte im Mikrotiterplatten-Reader in Triplikaten der jeweiligen Probe. Der Ansatz bestand aus 10 µl Zelllysate und 20 µl 50 µM Asp-AMC in McIlvain's Puffer (pH 6,5). Diese Gemische wurden 24 h bei 37°C in kleinen Eppendorfgefäßen inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl McIlvain's Puffer (pH 4,5) abgestoppt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt dann im Mikrotiterplatten-Reader mit einer Exzitation von 355 nm und Emission von 460 nm.

Anschließend wurde die AGA-Aktivität in  $\mu\text{mol}$  umgesetzt Substrat pro g Protein errechnet. Zur Quantifizierung wurde eine Standardreihe mitgemessen. Die Standardreihe enthielt folgende Konzentrationen AMC in McIlvain's Phosphat-Citrat-Puffer pH 6,5: 1, 2, 5 und 10  $\mu\text{M}$ . Ebenfalls wurden die Messungen mit Proben ohne Zelllysat normalisiert.

### 2.14.9 Immunfluoreszenzfärbung

Auf einer 12-Well-Platte wurden HEK- und Fibroblasten-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Um einen besseren Halt zu gewährleisten, wurden die Deckgläschen der HEK-Zellen zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Am Tag nach der Aussaat erfolgte die Behandlung mit einem Wirkstoff. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 30 Minuten mit 5  $\mu\text{M}$  LysoTracker in 250  $\mu\text{l}$  Medium bei 37°C inkubiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde jedes Well mit 500  $\mu\text{l}$  4%igem Paraformaldehyd gefüllt. Die Einwirkzeit betrug hier 10 Minuten ebenfalls bei 37°C im Inkubator. Drei Waschzyklen mit PBS schlossen sich an. Die Deckgläschen wurden kurz in destilliertes Wasser getaucht. Zum Eindecken der Deckgläschen wurde Fluoromount™ Aqueous Mountag mit Dapi 1:1.000 versetzt auf einen Objektträger geträufelt und das Deckgläschen mit den Zellen auf der Unterseite auf den Tropfen gelegt. Eine Lagerung fand bei 4°C statt.

Fibroblasten wurden auch direkt nach dem Waschen mit PBS wie oben beschrieben mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wirkte auf jedes Deckgläschen 30  $\mu\text{l}$  1%iges BSA mit Digitonin (1:1.000) für 10 Minuten ein. Im Anschluss wirkte der primäre Antikörper Lamp 3 (1:150) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen ein. Folgend wurden drei Waschschrte mit PBS vollzogen und der sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse (1:300) wirkte für eine Stunde auf die Zellen ein. Das Eindecken erfolgte wie oben beschrieben im Anschluss.

### 2.14.10 Quantifizierung der Fluoreszenz mit LysoTrackerfärbung

AGU-Fin-major Patientenzellen und Wildtyp-Fibroblasten wurden 72 Stunden vor der Behandlung in 24-Well-Platten mit DMEM +++++ ausgesät. Die Behandlung erfolgte für 24 Stunden mit 250  $\mu\text{M}$  Celastrol in das Medium. Am Tag nach der Behandlung wurden die Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  LysoTracker in 250  $\mu\text{l}$  Medium für 30 Minuten bei 37°C im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenz

der Zellen konnte in 250 µl PBS mit dem Mikrotiterplatten-Reader mit einer Exzitation von 540 und Emission von 600 nm gemessen werden. Die Zellen erhielten im Anschluss einem Tropfen Trypsin und wurden nach Ablösung im Inkubator bei 37°C mit 100 µl DMEM +++++ gestoppt. Der Inhalt des Wells zentrifugierte in einem Eppendorfgefäß bei 100x g für zwei Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 µl PBS und 20 µl Trypan-Blau-Lösung resuspendiert. Das Zählen der Zellen in der Suspension erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop.

Zur Kontrolle wurden die Zellen unterschiedlich behandelt. Einige Zellen wurden nicht mit Celastrol behandelt. Jeweils ein Teil der behandelte und ein Teil der nicht-behandelten Zellen wurde mit Lyotracker gefärbt, der andere Teil wurde nicht gefärbt. Zusätzlich wurden auch Wells ohne Zellen auf die gleiche Weise der Mischung von DMEM +++++ und Lyotracker ausgesetzt, wie die zu färbenden Zellen. In den zellfreien Wells stand über die gesamte Wachstumsdauer der Zellen ebenfalls DMEM +++++ als Negativkontrolle.

Zur Ermittlung der Fluoreszenz der Zellen wurden die gemessenen Werte pro 1.000 Zellen gerechnet. Von dem Wert der Zellen, welche mit Lyotracker behandelt wurden, wurde jeweils die Eigenfluoreszenz der Zellen ohne Lyotracker und der Wert des leeren, mit Lyotracker versetzten Wells subtrahiert. Aus sämtlichen Endwerten wurde der Mittelwert mit Standardabweichung zum Vergleich in einem Diagramm aufgetragen.

## **2.15 Statistische Auswertung und Bildbearbeitung**

### **2.15.1 Statistik**

Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen sind jeweils in den mit Microsoft Excel (Washington, Vereinigte Staaten) hergestellten Darstellungen enthalten. Die statistische Analyse wurden mit der GraphPad Prism® 5.04 Software (Kalifornien, Vereinigte Staaten) durchgeführt. Zur Auswertung wurden 1-way-und 2-way Varianzanalysen (ANOVA) sowie der Student's t-Test angewendet. Die Werte von  $p < 0,05$  gelten als signifikant (\*), die Werte von  $p < 0,01$  als sehr signifikant (\*\*). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### **2.15.2 Elektronische Manipulation der Abbildungen**

Die dargestellten Abbildungen wurden jeweils komplett durch Kontrast- oder Helligkeitseinstellungen angepasst. Sonstige andere Manipulationen wurden nicht durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung von Hsp70 in die Plasmide pPR-IBA102, pEXPR-IBA103 und pcDNA3

Um die Wirkung von Hsp70 auf die Prozessierung von AGA in den Patientenzellen zu untersuchen, wurde Hsp70 in die verschiedenen Plasmide pPR-IBA102, pEXPR-IBA103 und pcDNA3 kloniert. Die benötigte cDNA war im Vorhinein schon aus RNA von HeLa-Zellen synthetisiert worden und stand zur Verfügung. Die cDNA wurde durch PCR mit Hilfe der spezifischen, in Tabelle angegebenen Primern amplifiziert und mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt.

Durch den Restriktionsverdau wurden die positiv klonierten Plasmide aufgefunden und die 1. und 3. Probe von pPR-IBA102, die 1. und 2. Probe von pcDNA3 und die 2. und 6. Probe von pEXPR-IBA103 zum Sequenzieren geschickt. In der Abbildung 2 zeigen die positiven Konstrukte zwei Banden auf, die Bande des jeweiligen Vektors und zusätzlich die Bande des Inserts Hsp70 bei etwa 2.2 kb. Das Auftreten einer einzelnen Bande wies auf das Fehlschlagen der Klonierung dieser Probe hin. Nach der anschließenden Sequenzierung konnten die positiv bestätigten Konstrukte in den durchgeführten Versuchen Anwendung finden.

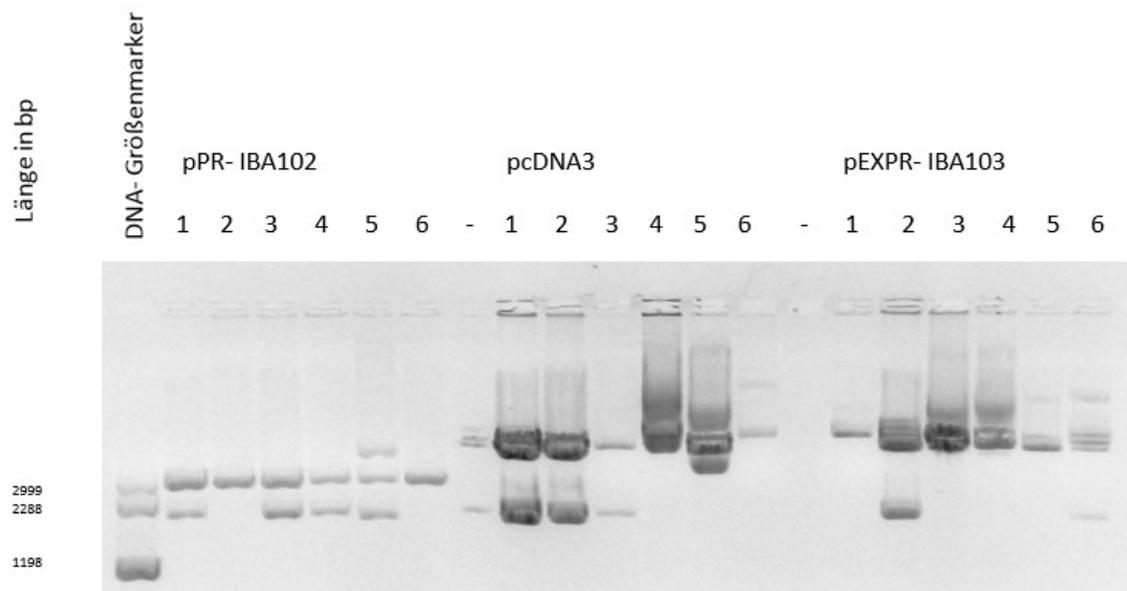


Abbildung 2: Agarosegelelektrophorese der Restriktionsspaltung von den Vektoren pPR-IBA102, pcDNA3, pEXPR-IBA103 mit jeweils sechs Proben pro Konstrukt: Bei 2939 bp (Basenpaaren) ist der Vektor pPR-IBA102, bei 5518 bp ist der Vektor pEXPR-IBA103 und bei 5446 bp ist der Vektor

pcDNA3 zu erkennen. Das jeweilige Insert Hsp70 ist bei den positiven Konstrukten bei etwa 2200 bp zu sehen.

## **3.2 Hsp70**

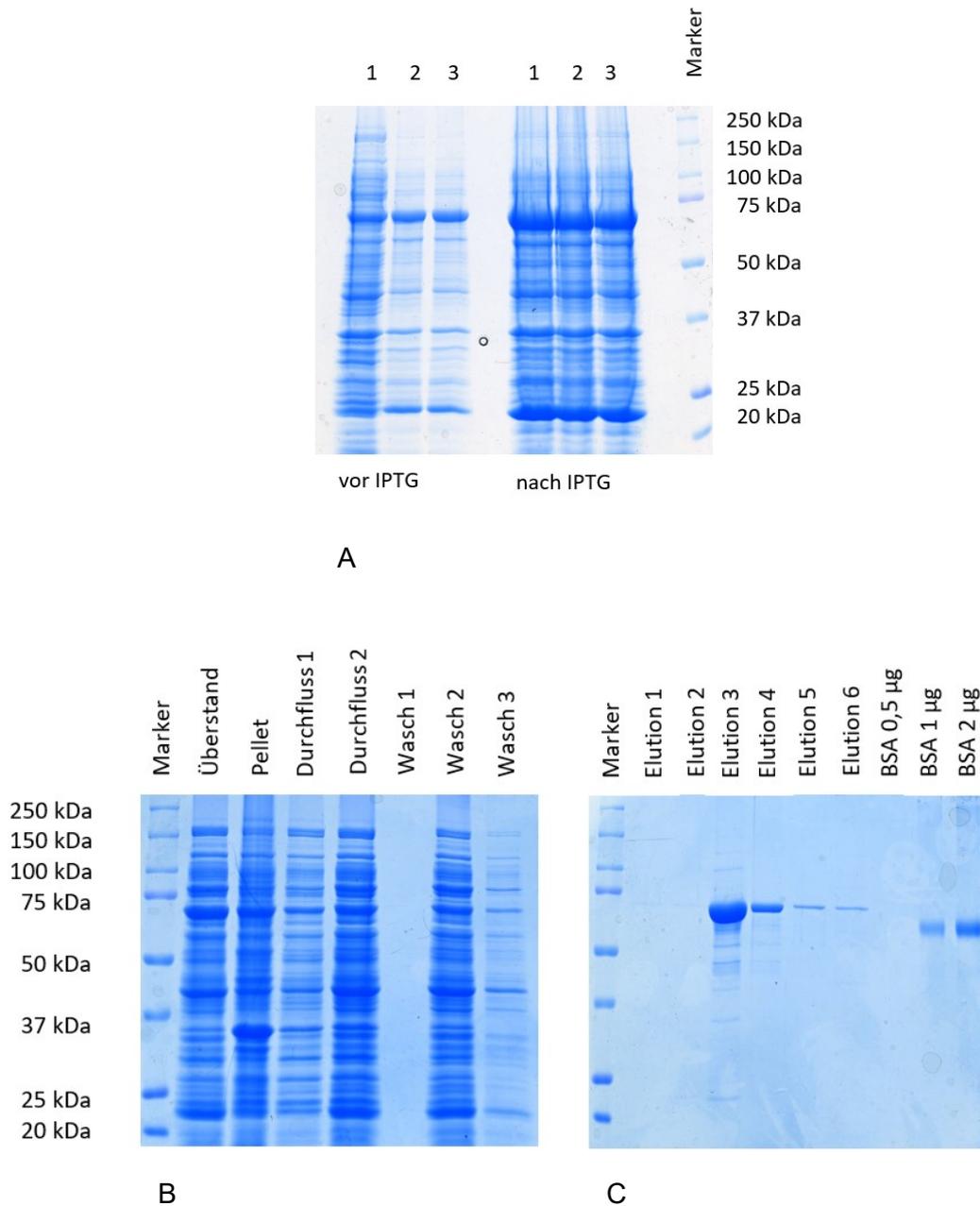
### **3.2.1 Herstellung von rekombinantem Hsp70**

Zur Hsp70-Behandlung der Zellen wurde neben dem durch Klonierung in Plasmiden eingesetzten Hsp70 auch rekombinantes Hsp70 verwendet.

Nach Transformation der E. coli Rosetta mit pPR-IBA102 Hsp70 wurden drei Kolonien gepickt und eine Übernachtskultur angeimpft. Bei der sich anschließenden Induktion der Bakteriensuspension mit IPTG wurde der Erfolg der Induktion mit einem coomassiegefärbten Polyacrylamidgel nachgewiesen. In Abbildung 3 A ist auf Höhe von 73 kDa eine deutliche Verstärkung der Banden nach IPTG-Induktion im Gegensatz zu den drei vor der IPTG-Induktion entnommenen Proben sichtbar. Der Nachweis der erfolgreichen Induktion wurde somit erbracht.

Durch den Vorteil des synthetischen Peptids Twin-Strep-tag, war die Proteinaufreinigung durch die Spezialsäule Strep-Tactin Superflow möglich. Sämtliche Fraktionen wurden jeweils separat in Eppendorfgefäßen aufbewahrt und ebenfalls separat auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses Vorgehen diente der Kontrolle, ob die Bindung durch das Twin-Strep-tag an der Säule auch erfolgreich war. Durch Coomassiefärbung wurden die Elutionsfraktionen, die das rekombinante Hsp70 enthielten, sichtbar. In den Elutionsfraktionen drei bis sechs stellt sich durch das Vorhandensein von Banden auf der Höhe von ungefähr 73 kDa das Vorliegen von Hsp70 dar (Abbildung 3 C). Durch Bestimmung der Konzentration in den Proteinlösungen drei und vier wurde der Proteingehalt bestimmt. Ebenfalls aufgezeigt sind die Nachweise der einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung (Abbildung 3 B).

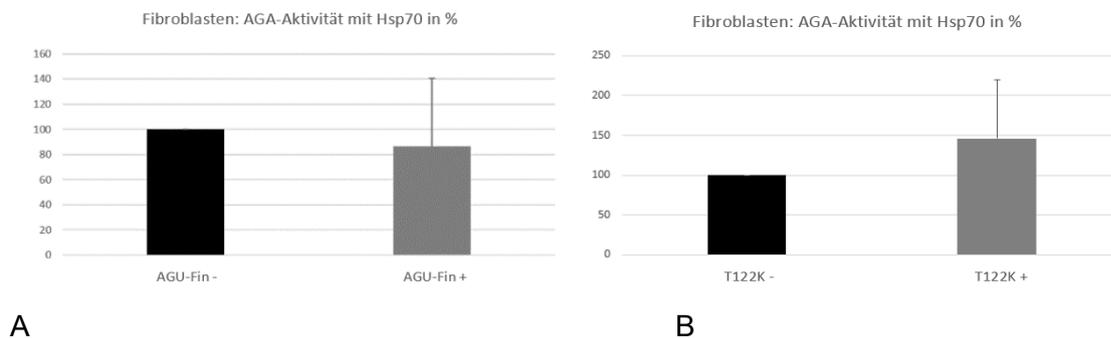
Zum optischen Vergleich wurde Bovines Serumalbumin (BSA) zur Proteinbestimmung aufgetragen. Zur genauen Ermittlung der rekombinanten Hsp70 Menge kam jedoch die Proteinmessung nach Bradford zur Anwendung.



**Abbildung 3: Polyacrylamidgele mit Coomassiefärbung:** (A) Polyacrylamidgel mit Coomassiefärbung Proben vor und nach IPTG-Induktion: Der Größenstandard wird als Marker bezeichnet. Drei Proben vor und nach Induktion mit IPTG sind nacheinander aufgetragen. Das Protein Hsp70 Twin-Strep-tag ist bei 73 kDa sichtbar. Nach der Induktion sind diese Banden deutlich verstärkt. (B) Polyacrylamidgel mit Coomassiefärbung der Hsp70 Twin-Strep-tag Proteinaufreinigung: Das Protein Hsp70 Twin-Strep-tag erscheint bei 73 kDa. Weitere vorhandene Proteine aus *E. Coli* sind ober- und unterhalb der Hsp70- Bande zu sehen. (C) Die Elutionsfraktionen drei bis sechs weisen durch die Banden bei 73 kDa das rekombinante Hsp70 Protein aus. BSA wurde in den letzten drei Spuren mit 0,5 µg, 1 µg und 2 µg zum optischen Vergleich aufgetragen.

### 3.2.2 Behandlung von Zellen mit Hsp70

Das Hitzeschockprotein Hsp70, ein Chaperon, unterstützt Proteine bei der Faltung durch Anlagerung an hydrophobe Aminosäuren bei noch nicht oder inkorrekt gefalteten Proteinen. Durch diese Anlagerung wird eine falsche Faltung vermieden, das Erreichen der korrekten Konformation unterstützt und ein vorzeitiger Abbau verhindert (Feder und Hofmann 1999). Durch das Vorhandensein von ausreichend Hsp70 ist eine ausreichende Anlagerung an hydrophobe Aminosäuren als Schutz des AGA-Vorläuferenzym vor fehlerhafter Aggregation denkbar. Die Wirkung des Hitzeschockproteins Hsp70 wurde untersucht, indem Patientenfibroblasten mit den Mutationen AGU-Fin-major und T122K kultiviert und mit Hsp70 behandelt wurden. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe direkt in das Medium und konnte bei den T122K Patientenfibroblasten eine Steigerung um fast die Hälfte der unbehandelten AGA-Aktivität in den Messungen erzeugen (Abbildung 4). Bei den AGU-Fin-major Patientenzellen kam es durch die Behandlung zu einer leichten Reduktion der gemessenen AGA-Aktivität.

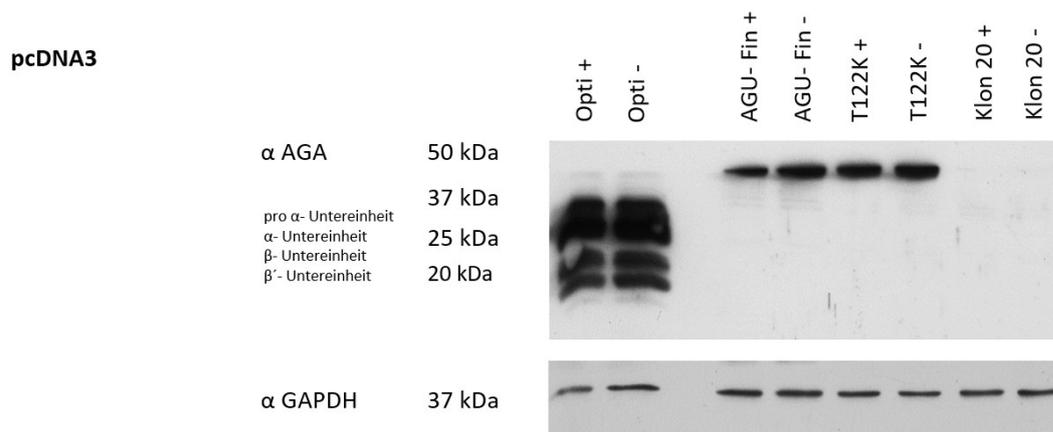


**Abbildung 4: AGA-Aktivität bei Fibroblasten nach rHsp70-Behandlung in %:** unstimuliert (-), mit 300 nM rekombinantem Hsp70 behandelt (+), (A) Diagramm AGU-Fin (AGU-Fin-major). Die Zellen weisen nach der Behandlung eine verminderte AGA-Aktivität in der Messung auf. (B) Diagramm T122K Patientenfibroblasten. Bei diesen Patientenzellen kam es nach der Behandlung zu einer Steigerung der AGA-Aktivität. Um die AGA-Aktivitätsmessungen durchführen zu können, wurden die jeweiligen Patientenzellen im Vorfeld für 24 Stunden mit rHsp70 behandelt und im Anschluss zu Zelllysaten verarbeitet. Dieses Lysat war dann Bestandteil des Ansatzes für den jeweiligen fluorimetrischen AGA-Aktivitätsassay. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei separat durchgeführten Experimenten.

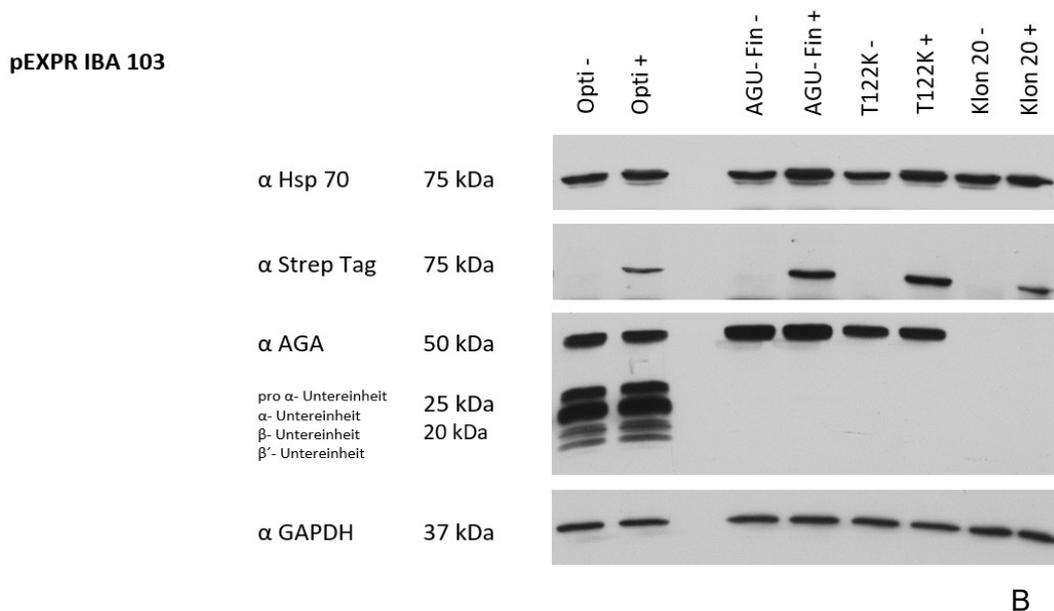
### 3.2.3 Transfektion mit Hsp70

Da es keinen Nachweis gab, wieviel Hsp70 in die Zellen aufgenommen worden war, wurde ebenfalls die transiente Transfektion mit Hsp70 durchgeführt. Die transiente Transfektion der Fibroblasten mit Hsp70 war durch das Prinzip der magnetischen Transfektion (MaTra-A) und durch Elektroporation (Neon) nicht ausreichend erfolgreich. Diese Patientenfibroblasten ermöglichten zwar eine Aktivitätsmessung des endogenen AGAs, jedoch war ein Nachweis von endogenem AGA im Western Blot aufgrund der vermutlich zu geringen Effizienz der Transfektion nicht möglich.

Aus diesem Grund wurden die Transfektionen mit Hsp70-Konstrukten zusätzlich in HEK-Zellen, einem besser zu transfizierenden Zellmodell, durchgeführt. Diese Zellen stellen jedoch ein künstliches System dar, weil das AGA stabil in sie hinein transfiziert wurde. Zusätzlich weisen sie eine Überexpression von T122K und AGU-Fin-major auf. Die transiente Transfektion der HEK-Zellen wurde mit MACSfectin erfolgreich durchgeführt und war im Western Blot bei pcDNA3 sichtbar (Abbildung 5 A) und bei Hsp70-pEXPR-IBA103 (Abbildung 5 B) durch das Vorhandensein von Strep-tag nachweisbar. Die Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym war jedoch auch hier nicht auszulösen. Der spezielle Strep-tag Antikörper zeigte im Gegenteil zum Hsp70 Antikörper den transfizierten Anteil von Hsp70 in der Zelle an. Der Hsp70 Antikörper war möglicherweise nicht ausreichend spezifisch.



A



**Abbildung 5: Western Blot von HEK-Zellen nach Transfektion:** Western Blot von HEK-Zellen, Opti (HEK293T-AGA-Opti), Klon 20, AGU-Fin (AGU-Fin-major) und T122K) nach Transfektion mit (A) pcDNA3 (+) / (B) pEXPR-IBA103 (+) und jeweils Leervektor pcDNA3 (-). Nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt. Nach der Bradford-Proteinbestimmung wurden gleiche Proteinmengen in den Proben in allen Spuren aufgetragen. Der Klon 20 dient als Negativkontrolle und der GAPDH-Nachweis bei 37 kDa als Ladekontrolle. (A) Die Wildtypzellen weisen, stimuliert und auch unstimuliert, mit dem AGA-Antikörper Banden der Prozessierung des AGA-Enzyms im Bereich von 37-20 kDa auf. Bei den im Vorfeld stabil transfizierten HEK-Zellen mit AGU-Fin-major und T122K Mutation sind nur Banden des Vorläuferenzym sichtbar, jedoch keine Prozessierung. (B) Gleiches trifft auch hier zu. Zusätzlich wird der Strep-tag Antikörper verwendet, da Hsp70 in pEXPR-IBA103 im Gegensatz zu pcDNA3 mit einem Strep-tag markiert ist. Dieser Antikörper erbringt auch gleich den Nachweis, dass die Transfektion der HEK-Zellen erfolgreich ist. Die Banden sind bei 75 kDa jeweils bei den transfizierten Zellen sichtbar.

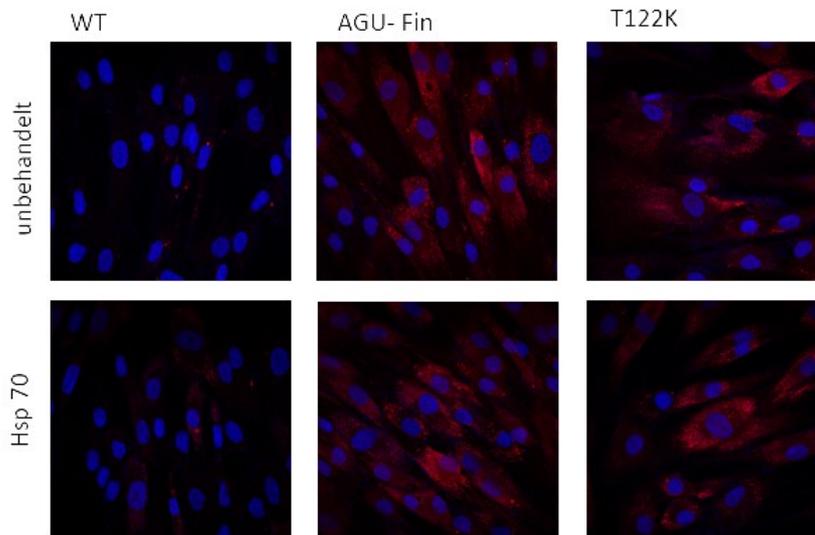
### 3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung von behandelten Fibroblasten

Nachdem eine Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym und die Verstärkung dessen Aktivität durch Hsp70 nicht zu beobachten waren, wurden Fibroblasten einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Die Fibroblasten wurden mit Hsp70 behandelt (Abbildung 6). Die behandelten Wildtyp-Fibroblasten wiesen eine leicht verstärkte Fluoreszenz auf, als die unbehandelten Zellen. Beide Patientenfibroblasten AGU-Fin-

major und auch T122K zeigten keine Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen.

Abbildung 1: Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen in Fibroblasten nach rHsp70 Behandlung:

Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen (rot) in Fibroblasten mit LysoTracker® Red DND-99 und DAPI-Färbung der Zellkerne (blau) bei Hsp70 Behandlung: Wildtyp (WT), AGU-Fin (AGU-Fin-major) und T122K Patientenzellen. Sämtliche Fibro-



blastentypen zeigen keine Veränderung unter der Behandlung mit Hsp70 im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit Hsp70 erfolgte für 24 Stunden bei 37°C im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit LysoTracker bei 37°C inkubiert und zur Fixierung der Zellen kam Paraformaldehyd 10 Minuten zur Anwendung. Zum Eindecken der Deckgläschen wurde Fluoromount™ Aqueous Mountag mit DAPI verwendet. Eine Lagerung fand bei 4°C statt.

### 3.3 Celastrol

#### 3.3.1 Dosisoptimierung von Celastrol

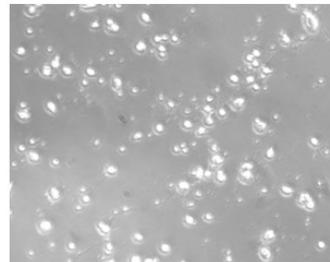
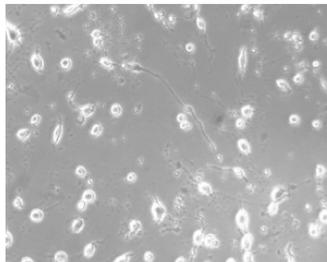
Celastrol ist ein proteasomaler Regulator (Mu et al. 2008b) und schützt die Zelle vor der Aggregation von Proteinen (Paris et al. 2010). Während der Anwesenheit von Celastrol werden die Hitzeschockreaktion und der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF1 aktiviert (Westerheide et al. 2004). Celastrol könnte einerseits die Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym durch seinen Einfluss auf Hitzeschockproteine erhöhen und andererseits die Akkumulation in den Lysosomen reduzieren. Die Patientenfibroblasten wurden zur Untersuchung der Wirkung von Celastrol mit diesem behandelt. Die publizierte Dosisangabe für Fibroblasten mit 0,8 µM Celastrol (Mu et al. 2008a) war für die verwendeten Fibroblasten tödlich. Die im Anschluss durchgeführte Dosisoptimierung für Fibroblasten wies eine passende Dosierung von 250 nM auf (Abbildung 7). Die Zellen

wurden vor der Behandlung mit Celestrol dokumentiert und dann mit verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Die weiteren Dokumentationen erfolgten nach 17 und teilweise 23 Stunden Einwirkzeit.

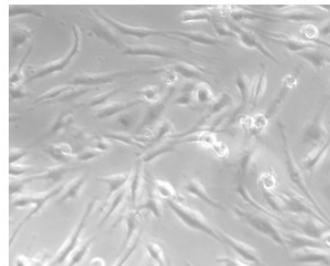
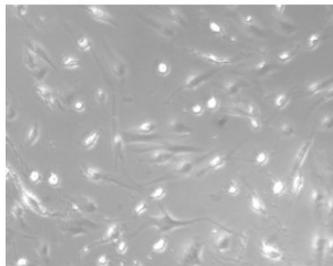
vor  
Celestrolgabe



1  $\mu$ M  
17 Std., 23 Std.



500 nM  
17 Std., 23 Std.



250 nM  
17 Std., 23 Std.

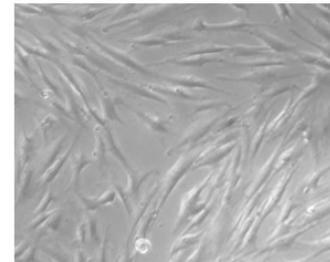
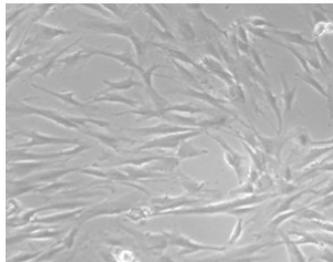


Abbildung 7: Fibroblasten Dosisreihe nach Celestrolbehandlung: Dokumentation der Einwirkung von Celestrol auf ein Fibroblastengemisch aus Wildtyp-Fibroblasten, AGU-Fin-major und T122K Patientenzellen. Die Zellen sind vor der Behandlung mit Celestrol dokumentiert und dann mit den Konzentrationen von 1  $\mu$ M, 500 nM, 250 nM und 100 nM Celestrol behandelt worden. Nach 17 und 23 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Zellzustand mit der Moticam 1.000 dokumentiert. Bei 100 nM und 250 nM Celestrol überleben die meisten Fibroblasten. Bei höheren Dosen ist die Sterberate der Zellen beträchtlich.

### 3.3.2 HEK-Behandlung mit Celastrol

Die Behandlung von HEK-Zellen mit Celastrol wurde bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , die direkt in das Medium gegeben wurde, durchgeführt. Die Darstellung im Western Blot war nur mit den AGA-überexprimierenden HEK-Zellen realisierbar, bei aufgetragenen Proben der Fibroblasten war das Signal zu schwach. Die Darstellung der Fibroblasten war vermutlich aufgrund der geringen endogenen AGA-Produktion nicht möglich.

Die Abbildung 8 zeigt den Western Blot der HEK-Zellen nach einer 48 stündigen Behandlung mit Celastrol. Bei den Zellen zeigte die Bande bei 50 kDa das AGA-Vorläuferprotein. Wäre eine Prozessierung durch die Behandlung induziert worden, müsste diese im Verlauf unter dieser Bande durch weitere Banden bewiesen werden.

Der primäre Antikörper gegen Hsp70 zeigte bei behandelten, genauso wie bei unbehandelten Zellen keinen erkennbaren Unterschied in der Bandenstärke, somit war der Gehalt von Hsp70 nach der Behandlung einiger Zellen mit Celastrol in allen Zellen gleich. Der HEK293T Klon 20 ohne AGA-Expression diente als Negativkontrolle. Bei beiden Spuren des Klon 20 wurden somit keine Banden des Vorläuferenzym von AGA sichtbar.

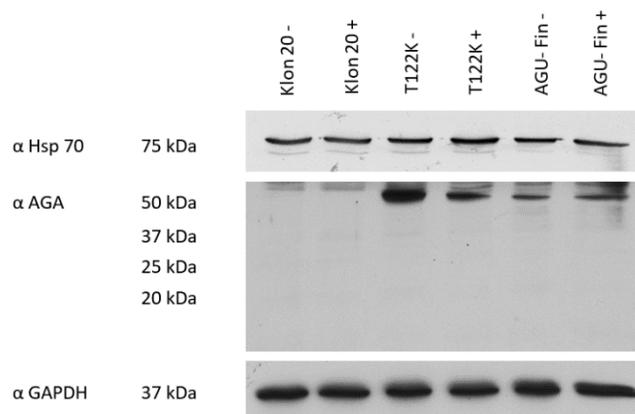


Abbildung 8: Western Blot bei HEK-Zellen nach Celastrolbehandlung: Klon 20, AGU-Fin (AGU-Fin-major) und T122K nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  Celastrol (+) und unstimuliert (-). Nach der 24 stündigen Celastrolbehandlung, wurden Zelllysate hergestellt und nach der Proteinbestimmung gleiche Proteinmengen aufgetragen. Klon 20 diente als Negativkontrolle und weist keine AGA-Banden auf. Bei den weiteren Proben wurde ausschließlich das AGA-Vorläuferenzym bei 50 kDa detektiert, jedoch ist keine Prozessierung vorhanden. Der GAPDH-Nachweis bei 37 kDa dient als Ladekontrolle. Bei 75 kDa werden die Banden des Hsp70 mit dem anti-Hsp70-Antikörper sichtbar.

### 3.3.3 Fibroblastenbehandlung mit Celastrol

Um die Wirkung von Celastrol auf die AGA-Aktivität der Patientenzellen zu untersuchen, wurde die AGA-Aktivität mit dem Mikrotiterplatten-Reader bei behandelten und unbehandelten Zellen gemessen. Bei der AGA-Aktivitätsmessung der Fibroblasten ließ sich eine relative Steigerung bei den Patientenzellen mit der AGU-Fin-major Mutation im Verhältnis zu den selbigen unbehandelten Zellen aufzeigen (Abbildung 9 A). Bei den Patientenzellen mit der T122K-Mutation war eine deutliche Reduktion erkennbar, jedoch fiel ein Versuch stark aus dem Rahmen und zeigte einen deutlichen Anstieg im Gegensatz zu den anderen drei Versuchen auf (Abbildung 9 B).

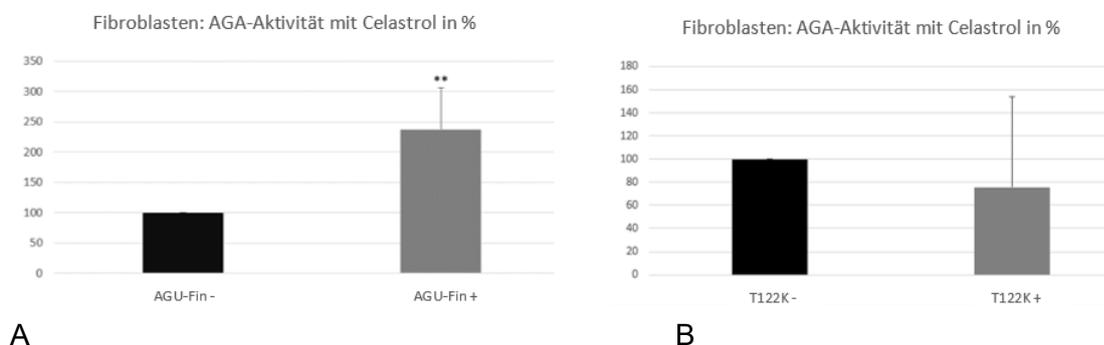


Abbildung 9: AGA-Aktivitätsmessung bei Fibroblasten nach Celastrolbehandlung: unstimuliert (-), mit 250 nM Celastrol stimuliert (+), (A) Diagramm AGU-Fin (AGU-Fin-major), die behandelten Zellen weisen eine deutlich höhere Enzymaktivität auf, als die unbehandelten AGU-Fin-major Patientenzellen. (B) Diagramm T122K Patientenfibroblasten, bei den behandelten Zellen zeigte sich ein Rückgang der AGA-Enzymaktivität. Nach einer 24 stündigen Inkubation mit Celastrol wurden Zelllysate hergestellt und die AGA-Aktivität gemessen. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung der Proben im Mikrotiterplatten-Reader. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier separat durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des t-Tests (\*\*,  $p < 0,01$ ).

### 3.3.4 Fluoreszenzmessung bei Fibroblasten

Obwohl sich im Western Blot bei mit Celastrol behandelten HEK-Zellen keine Prozessierung aufzeigen ließ, wies eine erhöhte AGA-Aktivität der AGU-Fin-major Fibroblasten darauf hin, dass Celastrol auf AGU-Fin-major wirkte. Die durch die LysoTrackerfärbung erzeugte Fluoreszenz der Lysosomen wurde durch die Fluoreszenzmessung im Mikrotiterplatten-Reader quantifiziert. Die Messungen in

Abbildung 10 wiesen eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz der Patientenzellen mit der AGU-Fin-major Mutation bei Celastrolbehandlung auf. Da das Lysotrackersignal der AGU-Fin-major Patientenzellen von vornherein eine höhere Fluoreszenz hat, war das auch so zu erwarten. Diese wurde auch bei Immunfluoreszenzfärbungen mit LysoTracker und anti-Lamp 3 mit Celastrol behandelten Fibroblasten sichtbar. Die Intensität der gefärbten Lysosomen wurde deutlich stärker, auch wenn durch die Behandlung der Eindruck entstand, dass diese sich vesikulär zu ordnen schienen und weniger diffus waren.

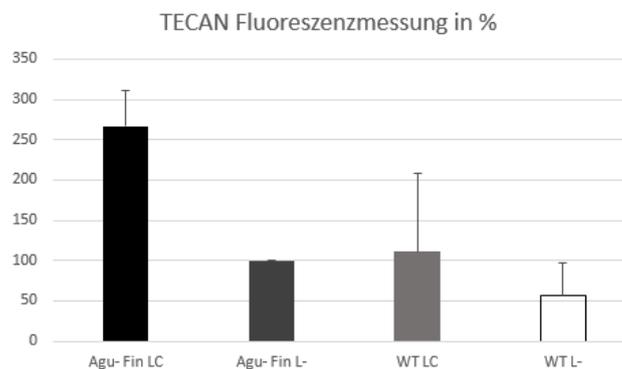


Abbildung 10: Mikrotiterplatten-Reader-Fluoreszenzmessung von Fibroblasten nach Celastrol- und LysoTrackerbehandlung: Wildtyp (WT) und AGU-Fin (AGU-Fin-major) Patientenzellen nach Celastrol- und LysoTrackerbehandlung, ausschließlich mit LysoTracker behandelte Zellen (L-), mit Celastrol und LysoTracker behandelte Zellen (LC). Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei separat durchgeführten Experimenten. Die Fluoreszenz der AGU-Fin-major Patientenzellen, die ausschließlich mit LysoTracker behandelt wurden, wurde auf 100% gesetzt. Die Fluoreszenz der mit Celastrol behandelten AGU-Fin-major Patientenzellen weist eine höhere Intensität auf, als die unbehandelten Zellen. Die Fluoreszenz der Wildtypzellen verdoppelt sich nach Behandlung mit Celastrol. Um die Messung durchführen zu können, wurde ein Teil der Zellen 24 Stunden mit Celastrol stimuliert und bei 37°C inkubiert. Die jeweilige LysoTrackerfärbung erfolgte für 30 Minuten vor der Messung. Im Anschluss wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

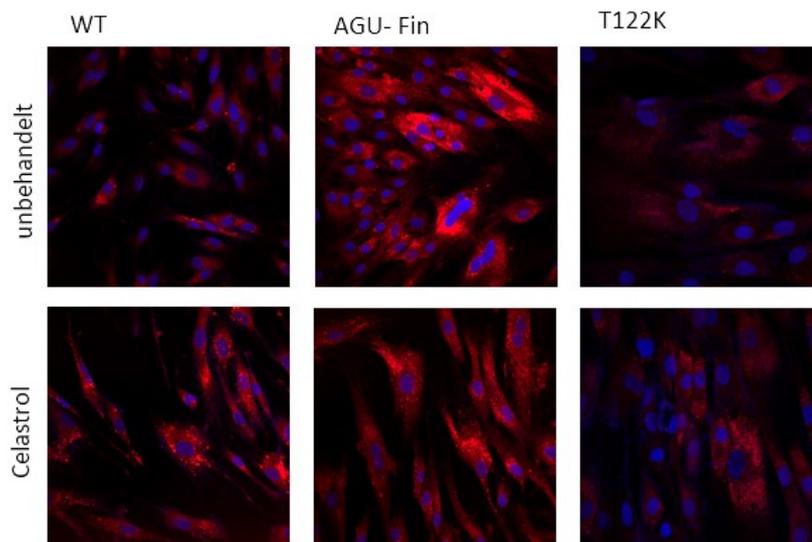
### 3.3.5 Immunfluoreszenzfärbung von behandelten Fibroblasten

Nachdem eine Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym und die Verstärkung dessen Aktivität durch Celastrol nur teilweise und in verhaltenem Maße zu beobachten war, wurden Fibroblasten einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Bei den AGU-Fin-major Patientenzellen, hatte die Behandlung mit Celastrol eine verstärkende Wirkung

auf die AGA-Aktivität. Zusätzlich machte es den Anschein, dass sich die diffuse, unstrukturierte LysoTrackerfärbung der Lysosomen in Abbildung 11, bei den unbehandelten Kontrollzellen, durch den Einfluss von Celastrol leicht vesikulär ordnete. Verstärkt fluoreszierende Vesikel traten auch bei den mit Celastrol behandelten Wildtypzellen auf. Diese Zellen wiesen allerdings eine verstärkte Fluoreszenz, im Gegensatz zu den unbehandelten Wildtypzellen, auf. Eine Veränderung der Fluoreszenzfärbung der T122K Patientenzellen ließ sich unter Celastroleinwirkung nicht erkennen. Die Markierung mit einem Antikörper gegen Lamp 3 (Abbildung 12) wies eine leichte Reduktion der Fluoreszenz der Lysosomen der AGU-Fin-major Patientenzellen auf. Eine vesikuläre Struktur ließ sich nicht erkennen. Die Wildtyp-Fibroblasten stellen sich bei dieser Färbung in behandeltem und unbehandeltem Zustand sehr ähnlich dar.

Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen in Fibroblasten nach Celastrolbehandlung:

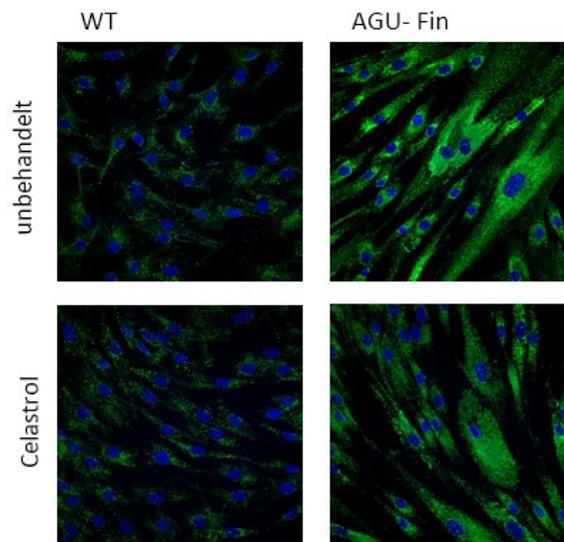
Immunfluoreszenz-färbung der Lysosomen (rot) in Fibroblasten mit LysoTracker® Red DND-99 und DAPI-Färbung der Zellkerne (blau) bei Wildtyp (WT), AGU-Fin (AGU-Fin-major) und T122K Patientenzellen. Wildtypzellen weisen nach der Behandlung



mit Celastrol eine veränderte und vermehrte Anordnung der Fluoreszenz auf. Die unbehandelten AGU-Fin-major Patientenzellen fluoreszieren diffus und großflächig. Die Fluoreszenz erscheint nach Celastrolbehandlung vesikulär geordneter und weniger diffus. Behandelte und unbehandelte T122K Patientenzellen weisen nahezu keine Unterschiede in der Intensität und Verteilung der Fluoreszenz auf. Die Celastrolbehandlung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C im Inkubator. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit LysoTracker inkubiert und zur Fixierung kam Paraformaldehyd 10 Minuten zur Anwendung. Die Deckgläschen wurden mit Fluoromount Aqueous Mountag mit DAPI eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen in Fibroblasten nach Celastrolbehandlung:

Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen (grün) in Fibroblasten mit anti-Lamp 3 in Kombination mit Alexa Fluor® 488 donkey anti- mouse und DAPI-Färbung der Zellkerne (blau) bei Celastrolbehandlung: Wildtyp (WT), AGU-Fin (AGU-Fin-major) Patientenzellen. Die Wildtypzellen weisen unter dieser Färbung keinen Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen auf. Die Fluoreszenz der Lysosomen der AGU-Fin-major Patientenzellen weist eine leichte Reduktion auf. Nach einer 24 stündigen



Behandlung mit Celastrol bei 37°C im Inkubator wurde zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen BSA mit Digitonin für 10 Minuten verwendet. Der primäre Antikörper Lamp 3 und im Anschluss der sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 488 donkey anti- mouse wirkten jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen ein. Eindecken erfolgte mit Fluoromount Aqueous Moutag und DAPI. Eine Lagerung fand lichtgeschützt bei 4°C statt.

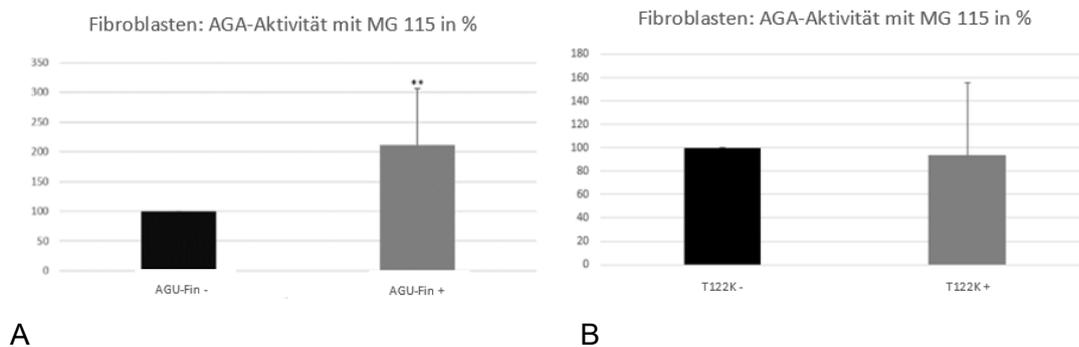
### 3.4 MG 115

#### 3.4.1 Fibroblastenbehandlung mit MG 115

Fehlerhaft gefaltete Proteine werden in der Zelle am Proteasom gebunden und in kleine Peptide zerlegt. Dieser Vorgang dient dem Schutz, da die falsch gefalteten Proteine möglicherweise gefährlich sind und zum Beispiel ER-Stress verursachen können (Alberts et al. 2011).

MG 115 ist ein Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl-L-Leucine-L-Norvalinal, ein potenter und reversibler Proteasominhibitor. Durch MG 115 werden die Chymotrypsin-artigen und Caspase-artigen Aktivitäten im Proteasom inhibiert. Resultierend aus der Behandlung mit MG 115 kommt es zur Hemmung des Proteasoms. Durch MG 115 kann durch eine reduzierte Abnahme oder ein Anstieg des Proteinspiegels auf einen Proteasom-vermittelten Proteinabbau geschlossen werden (Lee und Goldberg 1998). Durch die Hemmung werden fehlgefaltete oder aggregierte Proteine nicht mehr sofort abgebaut. Die Proteine erhalten demzufolge eine erneute Möglichkeit und mehr Zeit sich doch noch richtig zu falten (Imamura et al. 1998).

Die Behandlung der Fibroblasten mit MG 115 erfolgte ebenfalls direkt in das Medium. Nach der Einwirkzeit wurden Zelllysate hergestellt und diese zur AGA-Aktivitätsmessung verwendet. Diese wies eine deutliche Steigerung bei den AGU-Fin-major Patientenzellen nach Behandlung auf (Abbildung 13 A), bei den T122K-Patientenzellen waren die Ergebnisse bis auf einen starken Ausreißer niedriger als im Vergleich zu den unbehandelten Patientenzellen (Abbildung 13 B).



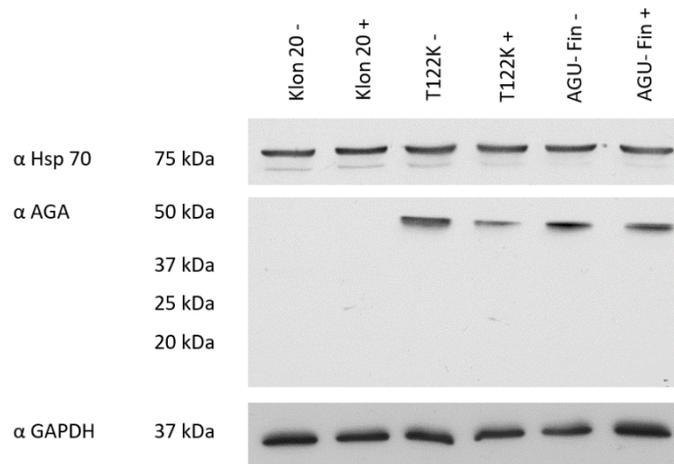
**Abbildung 13: AGA-Aktivität bei Fibroblasten nach MG 115-Behandlung in %:** unstimuliert (-), mit 0,6  $\mu$ M MG 115 stimuliert (+), (A) Diagramm AGU- Fin (AGU-Fin-major), die behandelten Zellen weisen eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität auf. (B) Diagramm T122K Patientenfibroblasten. Bei diesen Patientenzellen reduziert sich die gemessene AGA-Enzymaktivität leicht. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens vier separat durchgeführten Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des t-Tests (\*\*,  $p < 0,01$ ). Die Zelllysate wurden nach einer 24 stündigen Einwirkzeit von MG 115 hergestellt. Das Lysat wurde als Bestandteil in den Ansatz für die fluorimetrische AGA-Aktivitätsmessung gegeben und für 24 Stunden bei 37°C vor der Messung inkubiert.

## 3.5 Arimoclomol

### 3.5.1 HEK-Behandlung mit Arimoclomol

Arimoclomol ist eine kleine Molekülverbindung, welche mit der Hitzeschockreaktion interagiert, diese verstärkt (Lindquist 1986) und auch als Mitaktivator der Hsp-Expression gilt (Vígh et al. 1997). Durch die geförderte Wirkung des Hsp70 entsteht die Möglichkeit, dass AGA-Vorläuferenzyme einen verlängerten Zeitraum zur Verfügung haben, um sich korrekt zu falten und daher vermehrt exprimiert und auch prozessiert werden. 50  $\mu$ M Arimoclomol wurden den Fibroblasten und den HEK-Zellen zur Behandlung ins Medium gegeben. Um die Prozessierung von AGA in HEK-Zellen nachzuweisen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Das AGA-Vorläuferenzym war mit

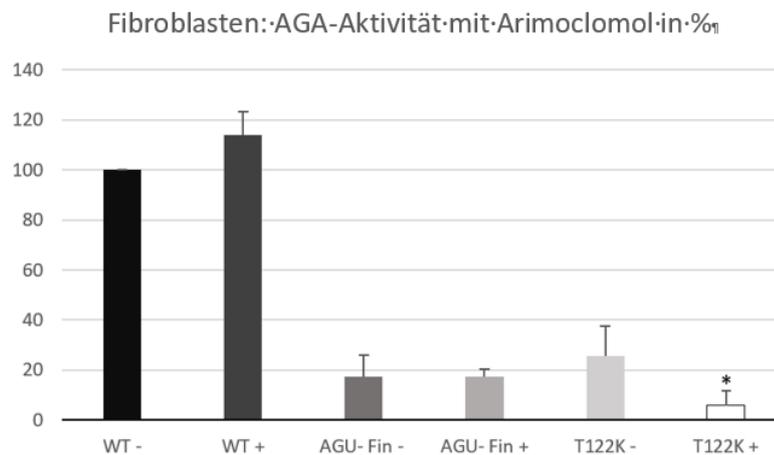
dem AGA-Antikörper alleinig nachweisbar. Die Behandlung der HEK-Zellen mit Arimoclomol erzeugte im Western Blot jedoch keine nachweisbare Prozessierung unterhalb der AGA-Vorläuferbanden. In den Spuren der Klon 20 Proben fehlte die AGA-Vorläuferenzymbande, da diese Zellen einem Knockout für dieses Gen unterzogen wurden und als Negativkontrolle dienten. Der Hsp70-Nachweis bei 75 kDa zeigte bei behandelten und unbehandelten Proben keinen Unterschied (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Western Blot HEK-Zellen nach Arimoclomolbehandlung:** Klon 20, AGU-Fin (AGU-Fin-major) und T122K nach Behandlung mit 50  $\mu$ M Arimoclomol (+) und unstimuliert (-), bei 75 kDa wird Hsp70 mit dem gleichnamigen Antikörper in sämtlichen Proben nachgewiesen. Bei 50 kDa wird der Vorläufer des AGA-Enzyms sichtbar, ausgenommen bei den Klon 20 Spuren, die wieder als Negativkontrolle dienen. Der gleichmäßige GAPDH-Nachweis bei 37 kDa dient als Ladekontrolle, wobei auch hier die Proteinmenge aus dem Lysat nach Bradford gemessen und in allen Proben die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Das Zelllysate wurde aus den 24 Stunden mit Arimoclomol unbehandelten Zellen hergestellt.

### 3.5.2 Fibroblastenbehandlung mit Arimoclomol

Bei der Behandlung der Fibroblasten mit Arimoclomol war eine Aktivitätssteigerung bei den Wildtyp-Fibroblasten nachweisbar. Eine Steigerung der AGA-Aktivität war bei den Patientenfibroblasten jedoch nicht ersichtlich. Die Zugabe von Arimoclomol führte bei den T122K Patientenzellen sogar zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen AGA-Aktivität. Bei den AGU-Fin-major Patientenzellen waren die Werte der AGA-Aktivität ebenfalls reduziert (Abbildung 15).



**Abbildung 153:** AGA-Aktivität bei Fibroblasten nach Arimoclomolbehandlung in %: unstimuliert (-), mit 50  $\mu$ M Arimoclomol stimuliert (+), WT (Wildtyp), Agu-Fin (Agu-Fin-major) und T122K Patientenfibroblasten auf die unbehandelten Wildtypzellen bezogen. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von vier separat durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels der 2-Way-Varianzanalyse (ANOVA), (\*,  $p < 0,05$ ). Der behandelte Wildtyp weist eine leichte Steigerung der Enzymaktivität auf. Die Patientenzellen mit der AGU-Fin-major Mutation weisen nach der Behandlung eine geringe Reduktion der Enzymaktivität auf. Bei den T122K Patientenzellen fällt die nachgewiesene AGA-Enzymaktivität nach Arimoclomoleinwirkung stark ab. Das benötigte Zelllysate wurde nach einer 24 stündigen Einwirkzeit von Arimoclomol im Vorfeld hergestellt. Es wurde als Bestandteil in den Ansatz für die fluorimetrische AGA-Aktivitätsmessung gegeben und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung von behandelten Fibroblasten

Durch die Behandlung mit Arimoclomol wurde keine Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym oder eine Verstärkung der AGA-Aktivität nachgewiesen. Um unter dem Einfluss von Arimoclomol eventuell auftretende Veränderungen der Ablagerungen in den Lysosomen beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. In Abbildung 16 waren bei den mit Arimoclomol behandelten Fibroblasten in keinem Fall Unterschiede zu den unbehandelten Zellen sichtbar.

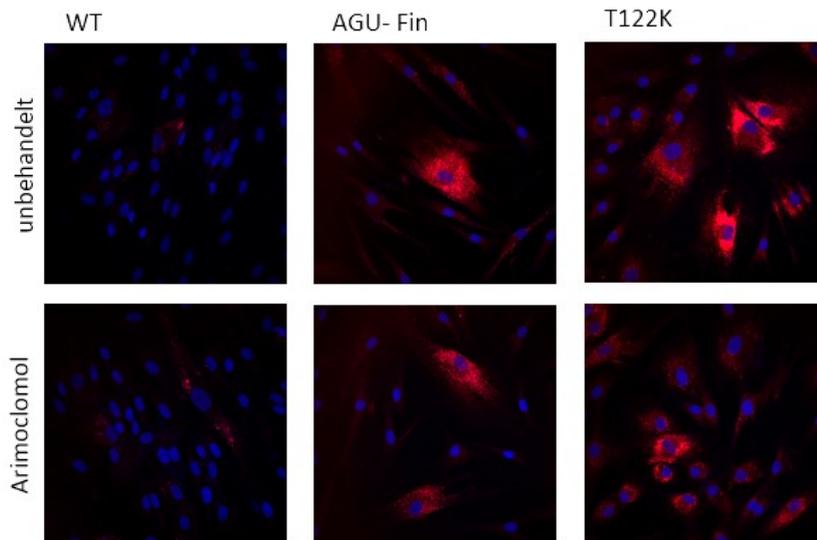


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen von Fibroblasten nach Arimoclomolbehandlung: Immunfluoreszenz-färbung der Lysosomen (rot) in Fibroblasten mit LysoTracker Red DND- 99 und DAPI-Färbung der Zellkerne (blau) bei Arimoclomolbehandlung: Wildtyp (WT), AGU-Fin (AGU-Fin-major) und T122K Patientenzellen. Die Fibroblastentypen zeigen keine Veränderung unter der Behandlung mit Arimoclomol im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen. Die Arimoclomolbehandlung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C im Inkubator. Anschließend erfolgte eine 30- minütige Inkubation bei 37°C mit LysoTracker. Zur Fixierung wirkte Paraformaldehyd 10 Minuten auf die Zellen ein. Die Deckgläschen wurden mit Fluoromount Aqueous Mountag und DAPI eingedeckt und bei 4°C gelagert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Molekulare und pharmakologische Chaperone

Molekulare Chaperone unterstützen Proteine während ihres Faltungsvorgangs (Wei und Hendershot 1996). Durch eine transiente Bindung werden Fehlfaltungen und Aggregationen vermieden oder wieder korrigiert. Zu diesen molekularen Chaperonen gehören Chaperonine und Hsp70 (Young et al. 2004). Bei den pharmakologischen Chaperonen wiederum handelt es sich um kleine chemische Verbindungen, die sich spezifisch an Proteine binden und den Faltungsvorgang unterstützen können (Parenti et al. 2015, Arakawa et al. 2006). Einigen Substanzen, die vermutlich wie pharmakologische Chaperone wirken, ist es auch möglich, das mutierte AGA-Vorläuferenzym bei der Spaltung in seine Untereinheiten, bei der autokatalytischen Aktivierung zu unterstützen oder einen Einfluss auf lysosomale Aggregationen zu nehmen (Banning et al. 2016). Eventuelle pharmakologische Chaperone weisen in Bezug auf ihre Zielenzyme zumeist Ähnlichkeiten in der chemischen Struktur zu den Substraten oder Inhibitoren auf (Parenti et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde wiederum an der Wirkung von molekularen Chaperonen, insbesondere Hsp70, in Patientenfibroblasten gearbeitet, während in vorher durchgeführten Studien die Wirkung von pharmakologischen Chaperonen analysiert wurde (Banning et al. 2016). Es wurden zum Beispiel die Eigenschaften von Glycin und Betain (Trimethylglycin) untersucht, welche beide im Stoffwechsel des Menschen Anwendung finden (Craig 2004). Glycin kann als echtes pharmakologisches Chaperon für AGA angesehen werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung von AGA durch die fördernde Wirkung von Glycin auf die Faltung der mutierten Enzyme erzeugt wird (Banning et al. 2016). Getestet wurde Glycin bei den AGA-Mutationen AGU-Fin-major und T122K (Banning et al. 2016), die auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Aufgrund der Struktur des AGA-Vorläufers wird vermutet, dass Betain im aktiven Zentrum des AGA-Enzyms binden kann. Bisher wurde jedoch kein experimenteller Beweis dafür erbracht. Die beobachteten Auswirkungen von Betain deuten allerdings eher auf eine indirekte Wirkungsweise hin und nicht darauf, dass Betain nur als pharmakologisches Chaperon wirkt. Glycin führt zur Prozessierung des mutierten AGA-Vorläuferenzym in die Untereinheiten und verbessert die Morphologie der Lysosomen in T122K-Zellen signifikant (Banning et al. 2016). Die Betainbehandlung von Patientenfibroblasten mit den Mutationen AGU-Fin-major und T122K hatte einen deutlichen Anstieg der AGA-Aktivität zufolge. Bei einem direkten Einfluss von Betain auf

rekombinantes T122K-Protein war die AGA-Aktivität jedoch verhalten verstärkt (Banning et al. 2016).

#### 4.2 AGA-Aktivität in Patientenzellen nach Aktivierung der Hitzeschock-Antwort

Durch Banning et al. wurde gezeigt, dass eine Stabilisierung der Faltung zur erhöhten Prozessierung und Aktivität führte (Banning et al. 2016). Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich AGA-Proteine mit AGU-Fin-major oder T122K-Mutation durch Auslösen der zellulären Hitzeschock-Antwort oder durch Gabe des Hitzeschockproteins Hsp70 aufgrund einer besseren Faltung aktivieren lassen. Tabelle 15 fasst die Ergebnisse zusammen, die nachfolgend diskutiert werden.

Wirkstoffe	WT	AGU-Fin-major	T122K
Arimoclomol	(↑)	↔	↓
Celastrol	-	↑	↓
MG 115	-	↑	↓
rHsp70	-	↓	↑
Betain (Banning et al. 2016)	(↑)	↑	↑
Glycin (Banning et al. 2016)	(↑)	↑	↑

Tabelle 15: AGA-Aktivität in Fibroblasten nach Behandlung: ↑ Anstieg, ↓ Reduktion und ↔ unveränderte AGA-Aktivität nach Behandlung der Patientenfibroblasten, (↑) Anstieg der AGA-Aktivität in Wildtypzellen und - keine Veränderung der AGA-Aktivität nach Behandlung mit dem jeweils angegebenen Wirkstoffs.

#### 4.3 Wirkung von Behandlung mit Celastrol und Arimoclomol

Bei Celastrol handelt es sich um ein kleines, bioaktives Molekül, welches zu den Chinonmethid-Triterpenen zählt. Es zeigt zytoprotektive Wirkung und ist in der Lage, die Hitzeschockantwort des Menschen zu aktivieren. Celastrol kann den Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 durch seine spezifische Struktur aktivieren (Westerheide et al. 2004). Durch diesen Prozess wird auch die vermehrte Transkription von Hsp70 reguliert, welches dann unterstützenden Einfluss auf die Proteinfaltung hat. Celastrol wirkt somit nicht direkt auf die Spaltung des AGA-Vorläuferenzym in seine Untereinheiten, im

Unterschied zu den pharmakologischen Chaperonen. Celastrol wirkt zudem als Proteasomenregulator und kann durch Inhibition des Proteasoms den Abbau von mutierten Enzymen reduzieren (Mu et al. 2008a, Salminen et al. 2010). Darüber hinaus führt Celastrol zur Verringerung der Amyloidplaquebildung im Gehirn von Alzheimer-Mausmodellen, sowie Zelllinien und schützt die Zellen vor Aggregation der Substrate (Paris et al. 2010). Im Übrigen hat Celastrol eine entzündungshemmende und antitumorale Wirkung (Yang et al. 2006).

Arimoclomol ist ein Hydroximinsäurederivat und wirkt als Hitzeschock-Koinduktor (Kieran et al. 2004). Es ist ein Analogon von Bimoclomol, hat allerdings eine längere Halbwertszeit und wird im Körper besser aufgenommen (Parfitt et al. 2014). Wie auch Celastrol wirkt sich Arimoclomol positiv auf HSF1 auf. Arimoclomol kann die Aktivierung von HSF1 verlängern und verstärken (Kieran et al. 2004, Harqitai et al. 2003), was zu einer Hochregulierung von Hsp70 führt (Kieran et al. 2004, Kalmar et al. 2008). Arimoclomol ist als Ko-Aktivator jedoch nur bei Zellen, die bereits unter Stress stehen in der Lage, die Hitzeschock-Antwort zu induzieren. Eine *de novo* Aktivierung ist durch Arimoclomol jedoch nicht möglich (Kalmar et al. 2008), ebenso wie die direkte Auslösung der Prozessierung oder Aktivierung des AGA-Vorläuferenzym durch Arimoclomol nicht direkt beeinflusst wird. Der HSF1-Aktivator Arimoclomol gilt als sicher in der Anwendung und ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Cudkowicz et al. 2008). Zusätzlich führt Arimoclomol zur Verbesserung des Überlebens von Motoneuronen sowohl beim SODG93A-Mausmodell der amyotrophen Lateralsklerose (Kieran et al. 2004, Kalmar et al. 2008), als auch bei einem Mausmodell der spinalen bulbären Muskelatrophie, einer Trinukleotid-Repeat-Störung (Malik et al. 2013). Bei der Behandlung von Fibroblasten der Patienten mit Niemann-Pick-Erkrankung des Typs C1 mit Arimoclomol, konnte eine signifikante Reduktion der lysosomal gespeicherten Ansammlungen von unverestertem Cholesterin nachgewiesen werden. Eine Verringerung der lysosomalen Akkumulation in Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick-Erkrankung Typ A und metachromatische Leukodystrophie, konnte bei einer Behandlung mit Arimoclomol in ähnlichem Maße beobachtet werden (Kirkegaard et al. 2016).

Es ist bekannt, dass Celastrol durch seine spezifische Struktur in der Lage ist, HSF 1 in einer Form, die der des Hitzestresses ähnlich ist, zu überführen und dadurch zu aktivieren (Westerheide et al. 2004). In der Literatur wurde für Celastrol eine Dosis von 0,8  $\mu\text{M}$  in Versuchen mit Patientenfibroblasten angegeben (Mu et al. 2008a). Für die in diesen Versuchen verwendeten Fibroblasten war die Dosierung jedoch tödlich. Nach der Durchführung einer Dosisreihe wurden die Versuche mit einer Celastroldosis von

250 nM an Fibroblasten des Wildtyps und mit den Mutationen AGU-Fin-major und T122K durchgeführt.

Durch die Untersuchung der AGA-Prozessierung in unbehandelten, AGA-transfizierten HEK-Zellen mittels Western Blot konnte weder in den Zellen mit AGU-Fin-major Mutation, noch in den mit T122K-Mutation eine Prozessierung nachgewiesen werden. Einzig der Nachweis des AGA-Vorläuferenzym bei 50 kDa war möglich. Trotz der nicht nachzuweisenden Prozessierung in den HEK-Zellen konnte eine AGA-Aktivitätssteigerung in den Patientenfibroblasten nach Behandlung mit Celastrol nachgewiesen werden. Ein direkter Nachweis einer eventuellen Prozessierung in den AGU-Fin-major Patientenfibroblasten konnte aufgrund der vermutlich zu geringen Proteinmenge nicht erbracht werden. Das gleiche traf auch auf die T122K Patientenfibroblasten zu. Auch nach der Behandlung der HEK-Zellen mit Celastrol oder Arimoclomol konnte keine nachweisbare Prozessierung ausgelöst werden. Im Western Blot ist die Bande des AGA-Vorläuferenzym ebenfalls alleinig sichtbar. Trotz der signifikanten, verzögernden Wirkungen von Arimoclomol auf das Fortschreiten der Symptome in ALS-Mäusen (Kieran et al. 2004) und auch die nachgewiesene Reduktion von lysosomalen Aggregationen in Patientenfibroblasten (Kirkegaard et al. 2016), liegt es somit nahe, dass Arimoclomol nicht in der Lage ist, in transfizierten HEK-Zellen mit den getesteten AGU-Mutationen die Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym nachweislich auszulösen. Für die Western Blot Versuche wurde hier der gleiche AGA-Antikörper verwendet, der die Prozessierung von AGA in den Opti-HEK-Zellen nachwies. Diese Zellen überexprimieren codonoptimiertes AGA und somit ist definitiv ein Nachweis zu erbringen. Ein Nachweis-Problem mit dem AGA-Antikörper ist demzufolge auszuschließen.

In den Patientenzellen mit der AGU-Fin-major Mutation konnte eine signifikante Steigerung der AGA-Enzymaktivität nach Celastrolbehandlung aufgezeigt werden. Anders war es bei den Patientenfibroblasten mit der T122K Mutation. Dort ließ sich nach Behandlung mit Celastrol eine auffällige Reduktion der AGA-Enzymaktivität nachweisen. Bei diesen Zellen war in einem Versuch ein stark aus dem Rahmen fallender Anstieg der AGA-Enzymaktivität im Gegensatz zu den anderen drei Versuchen nachzuweisen. Die Mehrheit der Versuche zeigte jedoch einen starken Abwärtstrend der Enzymaktivität, infolgedessen kann der einmalige Anstieg auch durch einen Fehler im Ablauf des Versuchs entstanden sein. Bei den mit Arimoclomol behandelten Patientenfibroblasten kann eine AGA-Aktivitätssteigerung in den AGU-Fin-major Patientenfibroblasten nicht nachgewiesen werden. Bei den T122K Patientenfibroblasten war sogar eine signifikante Reduktion der AGA-Aktivität nachweisbar. In den Wildtyp-Fibroblasten hingegen lässt sich der Nachweis einer Aktivitätssteigerung durch Behandlung mit Arimoclomol

erbringen. Die Wirkung von Arimoclomol in Wildtyp-Fibroblasten zeigt somit zwar, dass eine Veränderung in Fibroblasten mit der angewendeten Dosierung nachweisbar ist, jedoch scheint ein Effekt in den Patientenfibroblasten in den hier untersuchten Mutationen nicht auszulösen zu sein.

Zur Untersuchung der Auswirkung von Celastrol auf die Aggregation in den Lysosomen wurde die Fluoreszenz der Lysosomen in den behandelten und unbehandelten Fibroblasten gemessen. Die Zellen wurden nach Behandlung mit LysoTracker im Mikrotiterplatten-Reader quantifiziert. Die Patientenzellen mit der AGU-Fin-major Mutation wiesen eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz auf. Das LysoTrackersignal der AGU-Fin-major Patientenzellen hatte von vornherein eine höhere Fluoreszenz und somit war diese Erhöhung auch zu erwarten. Ein dazu passendes Bild ergab sich auch bei der Immunfluoreszenzfärbungen mit LysoTracker bei den mit Celastrol behandelten Fibroblasten. Es entstand der Eindruck, dass sich die diffuse Verteilung in den Lysosomen, die sich zuvor in den unbehandelten AGU-Fin-major Fibroblasten gezeigt hatte, vesikulär zu ordnen schien und die Intensität der Ansammlungen deutlich verstärkt war. Celastrol zeigte jedoch auch in den behandelten Wildtypzellen eine Wirkung. Im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypzellen erhöhte sich die Fluoreszenz in Intensität und Verteilung in ähnlicher Weise, wie es auch bei den mit Hsp70 behandelten Wildtypzellen auftrat.

Die Verwendung des spezifischeren Antikörpers anti-Lamp 3 zeigte eine geringfügige Reduktion der Fluoreszenz der Lysosomen in den AGU-Fin-major Patientenzellen auf. Eine vesikuläre Struktur wie bei den mit LysoTracker gefärbten AGU-Fin-major Patientenzellen war nicht aufzeigbar. Die mit anti-Lamp 3 gefärbten Wildtypzellen zeigen im Gegensatz zu denen, die mit LysoTracker gefärbt waren, keinen sichtbaren Unterschied auf (Abbildung 11 und 12). Der Unterschied zwischen der LysoTrackerfärbung und der anti-Lamp 3 Färbung kann sich eventuell durch die Morphologie der erkrankten und durch die Aggregationen veränderten Lysosomen erklären lassen. Durch die Immunfluoreszenzfärbung mit LysoTracker konnten in den T122K Patientenzellen nach der Behandlung mit Celastrol keine Veränderungen nachgewiesen werden. Immunfluoreszenzfärbungen der Fibroblasten unter dem Einfluss von Arimoclomol zeigen keine Veränderung der Aggregationen in den Lysosomen, im Verhältnis zu den unstimulierten Zellen auf (Abbildungen 11 und 16). Ausschließlich die Behandlung der AGU-Fin-major Patientenfibroblasten mit Celastrol konnte überhaupt eine signifikante Erhöhung der AGA-Enzymaktivität und eine Veränderung der Morphologie in den Lysosomen auslösen. Bei der T122K Mutation konnte kein steigender Effekt nachgewiesen werden, so wie es bei sämtlichen anderen Versuchen mit Celastrol und Arimoclomol bei Patientenfibroblasten und HEK-Zellen der

Fall war. Einzig die Behandlung von Wildtyp-Fibroblasten mit Arimoclolomol konnte eine kleine Steigerung der AGA-Enzymaktivität erzeugen.

#### **4.4 Wirkung von Behandlung mit MG 115**

Genauso wie Celastrol hat auch MG 115 eine Wirkung auf Proteasomen. MG 115 ist ein potenter, reversibler, pharmakologischer Inhibitor des Proteasoms. Durch MG 115 werden die Chymotrypsin-artigen und Caspase-artigen Aktivitäten im Proteasom inhibiert. Als pharmakologisches Chaperon wirkt MG 115 ebenfalls nicht. Aus der Behandlung mit MG 115 resultiert eine Hemmung des Proteasoms. Wird bei der Anwendung von MG 115 eine reduzierte Abnahme oder ein Anstieg des Proteinspiegels erreicht, ist ein Hinweis auf Proteasom-vermittelten Abbau gegeben (Lee und Goldberg 1998). Durch diesen Vorgang werden demzufolge auch fehlgefaltete oder aggregierte Proteine nicht mehr sofort abgebaut. Die Proteine erhalten eine erneute Möglichkeit sich durch mehr Zeit doch noch richtig zu falten (Imamura et al. 1998, O'Leary und Igdoura 2012).

Die beiden Proteasominhibitoren MG 115 (Z-Leu-Leu-Nva-H) und MG 132 (Z-Leu-Leu-Leu-H) werden in den Versuchen bei lysosomalen Speichererkrankungen verwendet, um ihre mögliche Wirkung auf die proteasomalen Aktivitäten der Zelle zu untersuchen (O'Leary und Igdoura 2012). Es konnte bei der Behandlung mit diesen Proteasominhibitoren bereits eine Verhinderung des beschleunigten Abbaus bei mutierten Rezeptoren in COS-7-Zellen nachgewiesen werden (Imamura et al. 1998).

Die Untersuchung der Änderung der AGA-Aktivität zeigte in diesen Versuchen nach einer Behandlung der AGU-Fin-major Patientenfibroblasten mit MG 115 eine deutliche Erhöhung der AGA-Aktivität. Durch eine reduzierte Abnahme oder einen Anstieg des Proteinspiegels, basierend auf der Behandlung mit MG 115 kann auf einen Proteasom-vermittelten Proteinabbau geschlossen werden (Lee und Goldberg 1998). Durch die Hemmung des Proteasoms besteht für fehlgefaltete oder aggregierte Proteine die Möglichkeit durch mehr Zeit eine Korrekturfaltung zu durchlaufen und nicht sofort abgebaut zu werden (Imamura et al. 1998). AGA kann in diesem Fall durch die erhöhte Chance auf eine korrekte Faltung dann doch noch in den aktiven Zustand gelangen und die AGA-Aktivität steigern. Eine Aktivitätssteigerung bei den T122K Patientenzellen durch MG 115 ist jedoch nicht konstant vorhanden. Die Ergebnisse der Enzymaktivität sind allerdings bis auf einen starken Ausreißer reduzierter als im Vergleich zu den unstimulierten Patientenzellen, somit kann der Anstieg auch durch einen Fehler im Ablauf des Versuchs entstanden sein.

#### 4.5 Wirkung von Behandlung mit rekombinantem Hsp70

In dieser Arbeit wurde Hsp70 als rekombinantes oder überexprimiertes Protein zur Behandlung der Zellen verwendet. Hsp70 ist Teil der Hitzeschock-Antwort (Hartl und Hayer-Hartl 2002). Höchstwahrscheinlich kann davon ausgegangen werden, dass bei den beiden hier untersuchten AGU-Mutationen ein lokaler Faltungsdefekt das Hauptproblem darstellt (Banning et al. 2016). Da Hsp70 in der Lage ist, die korrekte Proteinfaltung zu stabilisieren und Proteinefehlfaltung sowie Proteinaggregation zu verhindern, wurde es in den Versuchen verwendet (Hartl und Hayer-Hartl 2002). Hsp70 lagert sich an hydrophobe Aminosäuren und vermeidet eine anomale Faltung der Proteine (Feder und Hofmann 1999). Zusätzlich schützt Hsp70 zelluläre Proteine vor der Denaturierung und sorgt für einen zeitnahen Abbau funktionsunfähiger Proteine über das Proteasom (Neef et al. 2011). Die vermehrte Transkription von Hsp70 wird durch zellulären Stress über HSF1 aktiviert (Neudegger et al. 2016) und es wird zu den molekularen Chaperonen gezählt. Rekombinantes Hsp70 wird nicht als pharmakologisches Chaperon angesehen, da es nicht spezifisch ist, sondern an vielen Proteinen bindet. Das rekombinante Hsp70 erhöht zwar die vorhandene Menge an Hsp70 im Körper, hatte jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf die Proteinfaltung.

Bei der Behandlung der Patientenfibroblasten mit der Mutation T122K mit rekombinantem Hsp70 wurde eine Steigerung der AGA-Aktivität um die Hälfte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen. Im Unterschied dazu konnte bei den Patientenfibroblasten mit der Mutation AGU-Fin-major eine leichte Reduktion der gemessenen AGA-Aktivitäten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Diese unterschiedliche Auswirkung des rekombinanten Hsp70 könnte durch die unterschiedlichen Mutationen zu Stande kommen. Die beiden untersuchten Mutationen AGU-Fin-major und T122K befinden sich zwar im C-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit des AGA-Enzyms (Mononen et al. 1991, Banning et al. 2016), jedoch haben sie unterschiedliche Auswirkungen auf hydrophobe Bereiche des AGA-Vorläuferenzym. Beim Austausch von Cystein163 zu Serin und Arginin161 zu Glutamin, die die AGU-Fin-major Mutation ausmachen (Saarela et al. 2001, Ikonen et al. 1991a), führt der Verlust einer intramolekularen Disulfidbrücke zur Beeinflussung der Konformation des AGA-Vorläuferproteins, welcher die Enzymstruktur destabilisiert und die Spaltung in die Untereinheiten erschwert (Riikonen et al. 1996, Ikonen et al. 1991b, Mononen et al. 1991). Die Substitution von Threonin122 zu Lysin hat ihre Auswirkungen an der Grenzfläche zwischen zwei  $\alpha\beta$ -Dimeren. Der hydrophobe Kontakt zwischen den Hälften des Tetramers wird durch das positiv geladene Lysin energetisch ungünstiger und dadurch eine Konformationsänderung hervorgerufen (Banning et al. 2016).

Hsp70, welches sich an die hydrophoben Bereiche der entstehenden Proteine anlagert, um so die Fehlfaltung oder Aggregation zu verhindern (Feder und Hofmann 1999), könnte dies wahrscheinlich auch bei den AGA-Vorläuferenzymen machen. Diese könnte jedoch unterschiedlich auf die beiden Mutationen wirken, zum Beispiel indem es in einem ungünstigen Fall die Dimerisierung der AGA-Vorläufer verhindert, in anderem Fall fördert.

In dieser Arbeit wurden Fibroblasten von AGU-Patienten mit der Mutation AGU-Fin-major und T122K mit rekombinantem Hsp70 behandelt. Dies wurde genauso durchgeführt, wie es zuvor in anderen Studien mit Patientenfibroblasten mit Faber-Syndrom und Niemann-Pick-Erkrankung des Typs C1 erfolgt war. Die Auswertungen der Daten aus mehreren Mausmodellen zeigt, dass rekombinantes Hsp70 eine Reduktion des Speicherlevels der lysosomalen Aggregationen, eine Verbesserung der motorischen Funktionen und eine Verlängerung der Lebensdauer auslöst (Kirkegaard et al. 2016), alles Verbesserungen, welche für die AGU-Patienten ebenfalls wünschenswert wären. Bei den im Anschluss durchgeführten Versuchen mit Immunfluoreszenzfärbung konnten keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen in Bezug auf die lysosomalen Aggregationen aufgezeigt werden. Der Nachweis bei Patientenfibroblasten mit Faber-Syndrom und Niemann-Pick-Erkrankung des Typs C1 bezog sich allerdings auf die Fähigkeit von Hsp70 Sphingolipid-abbauende Enzyme zu stabilisieren und somit die lysosomalen Aggregationen zu reduzieren (Kirkegaard et al. 2016). Im Fall der Aspartylglukosaminurie handelt es sich bei den lysosomalen Aggregationen jedoch um Glykoasparagine.

Die Aktivierung des AGA-Enzyms scheint durch rekombinantes Hsp70 nicht als erhöhte Prozessierung nachweisbar zu sein. Zudem wäre es auch möglich, dass zusätzliches Hsp70 den Ablauf der Hitzeschock-Antwort in den Zellen beeinträchtigen könnte und somit die erwünschte Faltungsunterstützung nicht ausreichend leisten kann. Bei den Wildtyp-Fibroblasten konnte nach der Behandlung und Färbung mit Lysotracker eine leicht verstärkte Fluoreszenz der Lysosomen im Gegensatz zu den unbehandelten Wildtypzellen aufgezeigt werden. Diese Veränderung spricht wiederum dafür, dass Einwirkzeit und Dosis zumindest bei den Wildtyp-Fibroblasten ausreichend bemessen war, um eine Veränderung hervorzurufen. In diesem Fall könnte die verstärkte Fluoreszenz bei den Wildtypzellen auf eine Beeinträchtigung im lysosomalen Abbau hindeuten. Es wäre allerdings auch möglich, dass die erhöhte Immunfluoreszenz durch andere Änderungen in den Lysosomen hervorgerufen wird, wobei die molekularen Wirkmechanismen diesbezüglich unbekannt sind.

Problematisch ist auch, dass in den hier durchgeführten Versuchen kein Nachweis erbracht wurde, wieviel rHsp70 bei der Behandlung über das Medium in die jeweiligen

Zellen aufgenommen werden konnte. Die Aufnahme von rekombinantem Hsp70 ist allerdings in Patientenfibroblasten nachweislich möglich. Nach einer rHsp70-Behandlung konnte das endozytierte, fluoreszierend markierte rHsp70 in Fibroblasten von Patienten mit lysosomalen Speicherkrankheiten nachgewiesen werden (Kirkegaard et al. 2016). Das Verfahren wurde an U-2-OS-Osteosarkomzellen getestet. Die Zellen wurden in Fluorochrom-markiertem rHsp70 (rHsp70-AF488) inkubiert. Der Nachweis der Aufnahme von rHsp70 und seine spezifische Kolo-kalisierung mit spät endosomalen und lysosomalen Markern, sowie der Bindung an die lysosomale Membran war durch konfokale Aufnahmen möglich (Kirkegaard et al. 2010). Dies zeigt, dass rHSP70 grundsätzlich in die Zellen aus dem Medium aufgenommen werden kann.

Trotz der Fähigkeit der Fibroblasten das rekombinante Hsp70 aus dem Medium aufzunehmen, konnte in keinem der durchgeführten Versuche eine signifikante Erhöhung der AGA-Enzymaktivität nachgewiesen werden.

#### **4.6 Wirkung von transienter Transfektion mit Hsp70**

Im Anschluss wurde Hsp70 transient in HEK-Zellen transfiziert. Bei diesem Verfahren konnte im Western Blot der Beweis erbracht werden, dass nach diesem Vorgehen eine vergleichbare Menge Hsp70 in den Zellen vorhanden war. Bei den mit pEXPR-IBA103 transfizierten Zellen konnte die exprimierte Menge des Hsp70 durch die Verwendung eines Strep-tag Antikörpers und das Vorhandensein des Twin-Strep-tag im Hsp70 als vergleichbar nachgewiesen werden. Unvorteilhafterweise war der Nachweis durch den Western Blot nur bei Verwendung der MACSfectin-transfizierten HEK-Zellen möglich. Die transiente Transfektion mit Hsp70 durch MaTra-A (magnetische Transfektion) und Neon (Elektroporation) war bei den Patientenfibroblasten nicht ausreichend erfolgreich, da die Transfektionsrate zu gering war. Für einen Nachweis im Western Blot war die Menge des endogenen AGAs nicht ausreichend, was durch den zu geringen Proteingehalt in den Fibroblasten, aber auch durch den AGA-Antikörper zu erklären wäre, der das endogene AGA nicht ausreichend gut erkennt. Der Nachteil der Verwendung der HEK-Zellen ist, dass es sich hierbei um ein künstliches System handelt, weil AGA stabil in diese Zellen hinein transfiziert wurde, sowie eine Überexpression von T122K und AGU-Fin-major vorliegt.

Behandelt und auch unbehandelt weisen die HEK-Zellen, die Wildtyp-AGA hochgradig exprimieren, unter Verwendung des AGA-Antikörpers die Bande des AGA-Vorläuferenzym bei ca. 50 kDa auf. Die Banden der Prozessierung des AGA-Enzyms im Bereich von 20-37 kDa werden zusätzlich nachgewiesen. Bei denen im Vorfeld stabil

transfizierten HEK-Zellen mit AGU-Fin-major und T122K Mutation sind nur Banden des Vorläuferenzym, jedoch keine der Prozessierungen nachweisbar. Die Banden bei 75 kDa weisen keinen Intensitätsunterschied zwischen den transfizierten und nicht transfizierten Spuren auf (Abbildung 5). Da bei den mit Strep-tag markierten Proben allerdings eine deutliche Bande im Western Blot sichtbar ist, ist es unwahrscheinlich, dass die Transfektion nicht ausreichend erfolgreich war oder dass die Menge des transfizierten Hsp70 im Verhältnis zum endogenen AGA nicht ins Gewicht fällt. Der Hsp70 Antikörper ist somit vermutlich nicht ausreichend spezifisch.

Das Hauptziel der Transfektion mit Hsp70, der Nachweis der Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym im Western Blot, war weder in den Patientenfibroblasten noch in den HEK-Zellen erfolgreich.

#### **4.7 Fazit**

Die verfolgten Ziele in der Behandlung von AGU sind die Erhöhung der Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym und eine AGA-Aktivitätssteigerung, um einen vermehrten Abbau von Aspartylglukosaminen zu ermöglichen.

Die untersuchten Substanzen, welche als potentielle Wirkstoffe für die Therapie von Aspartylglukosaminurie Anwendung finden könnten, zeigen in keinem der hier an Patientenfibroblasten durchgeführten Versuche einen ausreichenden Wirkungsgrad, der eine erfolgreiche Behandlung von Patienten vermuten lässt.

Im Vergleich der hier verwendeten Substanzen mit Betain und Glycin, welche in anderen Versuchen zur Anwendung kamen (Banning et al. 2016), konnte die Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym in die Untereinheiten dort ausgelöst werden. Die AGA-Aktivität wurde soweit erhöht, dass die Intensität der LysoTrackerfärbung in den Lysosomen der Patientenzellen mit den Mutationen AGU-Fin-major und T122K signifikant reduziert war (Banning et al. 2016).

Keiner der in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe konnte eine derart vergleichbare und vielversprechende AGA-Aktivierung oder Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym bei den beiden Mutationen auslösen, wie es bei den pharmakologischen Chaperonen Betain und Glycin der Fall ist. Insgesamt betrachtet scheint eine Aktivierung der Hitzeschock-Antwort durch die hier verwendeten Wirkstoffe, bei den Mutationen AGU-Fin-major und T122K der Aspartylglukosaminurie nicht effektiv auszulösen zu sein. Eine therapeutische Verwendung lässt nach den hier durchgeführten Versuchen keinen ausreichenden Nutzen für die Patienten vermuten.

## 4.8 Ausblick

Aspartylglukosaminurie ist eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die hauptsächlich in der finnischen Bevölkerung auftritt. Viele der weltweit auftretenden AGU-Mutationen sind jedoch familienspezifisch. Sie führen überwiegend zur Einschränkung oder Inaktivierung des AGA-Enzyms, welche die Erkrankung durch den Mangel von Aspartylglukosaminidase auslösen. Das wesentliche Problem ist die Behinderung der autokatalytischen Prozessierung des AGA-Vorläuferenzym. Eine Fehlfaltung ist nicht hauptsächlich für eine Destabilisierung oder vollständige Beeinträchtigung der Proteinstabilität verantwortlich. Chaperon-vermittelte Therapieansätze sind bei der Suche nach Therapiemöglichkeiten für lysosomale Speicherkrankheiten vielversprechend. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Wirkstoffe Celastrol, MG 115 und Arimoclolol, sowie des Hitzeschockproteins Hsp70 dargelegt. Hierbei ist eine AGA-Aktivitätssteigerung durch Celastrol und MG 115 bei der Mutation AGU-Fin-major und eine AGA-Aktivitätssteigerung durch Hsp70 bei T122K nachzuweisen. In dieser Arbeit sind nur zwei der vielen AGA-Mutationen untersucht worden. Um einen eventuell zur Linderung der Symptome ausreichenden Effekt der hier verwendeten Wirkstoffe auf andere Mutationen zu untersuchen, können als weitere Schritte die Fibroblasten dieser Patienten ebenfalls ähnlichen Versuchen unterzogen werden und mit Western Blot, AGA-Aktivitätsmessung, Immunfluoreszenzfärbung und quantitativer Immunfluoreszenzmessung eventuelle Auswirkungen nachgewiesen werden. Genauso können weitere pharmakologische Chaperone in den Versuchen zum Einsatz kommen und für die jeweiligen Mutationen Prozessierung und Aktivierung der AGA-Vorläuferenzyme steigern. Auch stellt die Identifizierung von weiteren möglichen pharmakologischen Chaperonen einen Ansatz dar. Ebenfalls könnte die Verwendung von Hsp70 noch spezifiziert werden. In dieser Arbeit wurde für die verwendete Menge keine Dosisreihe angefertigt, sondern die Menge aus einer anderen Veröffentlichung übernommen. Durch Versuche mit verschiedenen Konzentrationen bei Behandlung und Transfektion könnte ein Wirkungsoptimum genauer bestimmt werden. Im Übrigen könnte auch die Optimierung der Einwirkzeit bei den Behandlungen der Zellen eine effizientere Wirkung erzielen. Zudem könnte der Nachweis erbracht werden, wieviel und ob rekombinantes Hsp70 bei der Behandlung aus dem Medium in die Zellen gelangt. In dieser Arbeit wurde nur der Nachweis erbracht, dass die Transfektion mit Hsp70 erfolgreich war, jedoch nicht die Behandlung. Des Weiteren könnte auch die Auswirkung von Wirkstoffen, die zwar keinen Einfluss auf die Prozessierung oder die Aktivierung des AGA-Enzyms, aber möglicherweise auf die Reduktion der Aggregationen in den Lysosomen haben, untersucht werden. Dieses wäre dann zum Beispiel durch

Immunfluoreszenzfärbungen nachweisbar. Zusätzlich könnte in der Enzyersatztherapie, die positive Effekte beim Einsatz in Mausmodellen gezeigt hat, die Steigerung der Menge von aktivem AGA-Enzym vorangetrieben werden. Besonders, weil bei dieser Therapie auch durch Injektion des AGA-Enzyms ins Gehirn die Blut-Hirn-Schranke überwunden wird. Zukünftig sollte auch in der Gentherapie ein weiterer Fortschritt zu erwarten sein, nachdem in den letzten Jahren sichere Vektoren in diesem Gebiet zur Verfügung stehen.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Aspartylglukosaminurie handelt es sich um eine lysosomale Speicherkrankheit. Die Mutationen AGU-Fin-major und T122K führen zu einer reduzierten Prozessierung und Aktivität der Aspartylglukosaminidase. Durch die eingeschränkte Aktivität dieses Enzyms kommt es zur Akkumulation von Aspartylglukosamin in den Lysosomen. Die Patienten werden symptomfrei geboren und im Verlauf ihres Lebens treten dann progressiv geistige und physische Einschränkungen auf. Das betroffene Enzym, die Aspartylglukosaminidase wird standardmäßig als enzymatisch inaktives Vorläuferpeptid synthetisiert und im endoplasmatischen Retikulum autokatalytisch gespalten. Das aktive Enzym bildet ein Tetramer, welches anschließend im Lysosom getrimmt wird.

Die in dieser Arbeit untersuchte Mutation AGU-Fin-major entsteht durch einen Austausch von Cystein163 gegen Serin und Arginin161 gegen Glutamin. Die Mutation T122K wird durch den Austausch von Threonin122 gegen Lysin ausgelöst. Diese beiden Mutationen erzeugen AGA-Vorläuferenzyme, jedoch findet kaum Prozessierung in deren Untereinheiten statt.

Diese Arbeit hatte das Ziel herauszufinden, ob bestimmte Substanzen Einfluss auf die Prozessierung des Vorläuferenzym oder die Aktivität von AGA in Patientenfibroblasten haben. Zur Anwendung kamen rekombinantes Hsp70, Celastrol, Arimocloamol und MG 115, welche die Hitzeschock-Antwort auf unterschiedliche Weise aktivieren. Es sollte untersucht werden, inwieweit das AGA-Vorläuferenzym durch die Behandlung vermehrt in seine Untereinheiten prozessiert wird und somit die Bildung des aktiven Enzyms gefördert wurde. Eine erhöhte Prozessierung konnte in keinem der Versuche nachgewiesen werden.

Die AGA-Aktivität dagegen konnte durch Celastrol und MG 115 bei den AGU-Fin-major Patientenfibroblasten signifikant gesteigert werden. Celastrol hat bei den AGU-Fin-major Patientenfibroblasten zudem zu einer Veränderung der Lysosomenmorphologie geführt. Unter Arimocloamol wurde die AGA-Aktivität von Patientenfibroblasten mit T122K Mutation überraschenderweise signifikant gesenkt. Die Behandlung von T122K Patientenzellen mit Hsp70 führte dagegen zu einer 50%igen AGA-Aktivitätssteigerung. Der Wirkungsgrad der hier an AGU-Patientenfibroblasten getesteten Substanzen, weist darauf hin, dass sie sich als mögliche Therapeutika zur Behandlung von Patienten mit Aspartylglukosaminurie als nicht ausreichend effektiv und sehr abhängig von der Art der Mutation erweisen.

## 6 Summary

Aspartylglucosaminuria (AGU) is a lysosomal storage disease. The mutations AGU-Fin-major and T122K result in a reduced processing and activity of aspartylglucosaminidase. Limited activity of this enzyme leads to accumulation of aspartylglucosamine and other glycoasparagines in lysosomes. Patients are born symptom-free, but progressive mental retardation and physical decline occur throughout their lives. The affected enzyme aspartylglucosaminidase is synthesized as an enzymatically inactive precursor peptide which is further cleaved autocatalytically in the endoplasmic reticulum. The active enzyme forms a tetramer, which is later on trimmed in the lysosome.

The first mutation studied in this work, AGU-Fin-major, results from an exchange of cysteine163 to serine and arginine161 to glutamine. The second mutation, T122K, is an exchange of threonine122 to lysine. Each of these mutations generate AGA precursor enzymes whose processing in the subunits barely takes place.

The aim of this study was to characterize the effects of certain substances on the processing of the AGA precursor or on the enzyme activity of AGA in AGU patient fibroblasts. Hsp70, Celastrol, Arimoclomol and MG 115, which activate the heat shock response in different ways, were used. The focus was laid on to what extent the AGA precursor enzyme is converted to its subunits by the treatment and if the formation of the active enzyme is promoted. An enhanced processing was not detected in any of the experiments. However, AGA activity was significantly increased by treatment with Celastrol and MG115 in AGU-Fin-major patient fibroblasts. Treatment with Celastrol also has changed the lysosomal morphology in these fibroblasts. When treated with Arimoclomol, AGA activity of patient fibroblasts with T122K mutation was significantly reduced. Treatment of T122K patient cells with Hsp70 resulted in a 50% increase of AGA activity.

The substances tested in AGU patient fibroblasts seem not to be effective enough to be used as potential therapeutics for treatment of patients with AGU. However, the effect of the tested substances clearly depend on which kind of AGU mutation is present.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AGA	Aspartylglukosaminidase
AGU	Aspartylglukosaminurie
AGU-Fin-major	AGA-Doppelmuation
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
ASP-AMC	L-Aspartic acid $\beta$ -(7- amido-4-methyl- coumarin)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BRX-345	Arimoclomol
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotheritol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
fwd	forward
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s <sup>2</sup>
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase
HABA	2-(4'-Hydroxyphenylazo) –Benzoessäure
HCl	Salzsäure
HEK/ HEK293T	humane, embryonale Nierenzellen
HeLa	Henrietta Lacks, Zervixkarzinom-Zellen
HRP	Meerrettichperoxidase
HSF1	Hitzeschock Transkriptionsfaktor 1

Hsp	Hitzeschockprotein
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
MEM	Minimum Essential Medium
MG 115	Proteasominhibitor: (Z-Leu-Leu-Nva-H)
MG 132	Proteasominhibitor: (Z-Leu-Leu-Leu-H)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NaOH	Natriumhydroxid
N-Terminus	Amino-Terminus
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rHsp70	rekombinantes Hsp70
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SODG93A	transgenes Mausmodell
T122K	AGA-Mutation
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	„Prozessierung und Aktivierung von Aspartylglucosaminidase (AGA)“ modifiziert nach (Banning et al. 2017):	5
Abbildung 2:	Agarosegelelektrophorese der Restriktionsspaltung von den Vektoren pPR-IBA102, pcDNA3, pEXPR-IBA103 mit jeweils sechs Proben pro Konstrukt:	40
Abbildung 3:	Polyacrylamidgele mit Coomassiefärbung:	42
Abbildung 4:	AGA-Aktivität bei Fibroblasten nach rHsp70- Behandlung in %:	43
Abbildung 5:	Western Blot von HEK-Zellen nach Transfektion:	45
Abbildung 6:	Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen in Fibroblasten nach rHsp70 Behandlung:	46
Abbildung 7:	Fibroblasten Dosisreihe nach Celastrolbehandlung:	47
Abbildung 8:	Western Blot bei HEK-Zellen nach Celastrolbehandlung:	48
Abbildung 9:	AGA-Aktivitätsmessung bei Fibroblasten nach Celatrolbehandlung:	49
Abbildung 10:	Mikrotiterplatten-Reader-Fluoreszenzmessung von Fibroblasten nach Celastrol- und Lysotrackerbehandlung:	50
Abbildung 11:	Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen in Fibroblasten nach Celastrolbehandlung:	51
Abbildung 12:	Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen in Fibroblasten nach Celastrolbehandlung:	52
Abbildung 13:	AGA-Aktivität bei Fibroblasten nach MG 115-Behandlung in %:	53
Abbildung 14:	Western Blot HEK-Zellen nach Arimoclomolbehandlung:	54
Abbildung 15:	AGA-Aktivität bei Fibroblasten nach Arimoclomolbehandlung in %:	55
Abbildung 16:	Immunfluoreszenzfärbung der Lysosomen von Fibroblasten nach Arimoclomolbehandlung:	56

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Gefäße	20
Tabelle 2:	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	22
Tabelle 3:	Verwendete Lösungen und Puffer	25
Tabelle 4:	Verwendete Substanzen zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	27
Tabelle 5:	Verwendete Kits	28
Tabelle 6:	Verwendete Plasmide	28
Tabelle 7:	Verwendete Primer mit jeweiliger Sequenz	29
Tabelle 8:	Verwendete Bakterienstämme	29
Tabelle 9:	Verwendete humane Zelllinien	30
Tabelle 10:	Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	31
Tabelle 11:	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe	32
Tabelle 12:	Verwendete Puffer bei der Mini-Plasmidpräparation ohne Kit	35
Tabelle 13:	Verwendete Substanzen und Säule zur Strep-tag-Proteinaufreinigung	37
Tabelle 14:	Verwendete Substanzen und Konzentrationen bei angegebenen Zellarten in den durchgeführten Versuchen	41
Tabelle 15:	AGA-Aktivität in Fibroblasten nach Behandlung	58

## 10 Literaturverzeichnis

- ACOG Committee on Genetics (2004): Prenatal and preconceptional carrier screening for genetic diseases in individuals of Eastern European Jewish descent. In: *Obstet Gynecol.* (298).
- Allison, A. C.; Cacabelos, R.; Lombardi, V. R.M.; Álvarez, X. A.; Vigo, C. (2001): Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as a possible treatment for Alzheimer's disease. In: *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* (25).
- Anfinsen, C. B. (1973): Principles that Govern the Folding of Protein Chains. In: *Science* (4096).
- Arakawa, T.; Ejima, D.; Kita, Y.; Tsumoto, K. (2006): Small molecule pharmacological chaperones. From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. In: *BBA* (1764).
- Araki, K.; Nagata, K. (2011): Protein folding and quality control in the ER. In: *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* (3).
- Arvio, M.; Autio, S.; Louhiala, P. (1993): Early clinical symptoms and incidence of aspartylglucosaminuria in Finland. In: *Acta Paediatr.* (82).
- Arvio, M.; Mononen, I. (2016): Aspartylglycosaminuria. A review. In: *Orphanet journal of rare diseases* 11 (1).
- Arvio, M.; Peippo, M. M.; Arvio, P. J.; Kääriäinen, H. A. (2004): Dysmorphic facial features in aspartylglucosaminuria patients and carriers. In: *Clin. Dysmorphol.* (1).
- Arvio, M.; Sauna-Aho, O.; Peippo, M. (2001): Bone marrow transplantation for aspartylglucosaminuria. Follow-up study of transplanted and non-transplanted patients. In: *J. Paediatr.* (138).
- Arvio, M. A.; Rapola, J. M.; Pelkonen, P. M. (1998a): Chronic arthritis in patients with aspartylglucosaminuria. In: *J. Rheumatol.* (6).
- Arvio, P.; Arvio, M.; Marttinen, E.; Sipilä, I.; Pirinen, S. (1999): Excessive infantile growth and early pubertal growth spurt: Typical features in patients with aspartylglycosaminuria. In: *J. Paediatr.* (134).
- Arvio, P.; Arvio, M.; Pirinen, S. (1997): Characteristic dental arches and occlusion in patients with aspartylglucosaminuria. In: *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* (3).
- Arvio, P.; Arvio, M.; Wolf, J.; Lukinmaa, P. L.; Saxen, L.; Pirinen, S. (1998b): Impaired oral health in patients with aspartylglucosaminuria. In: *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral radiol. endod.* (5).
- Aula, F.; Renlund, M.; Raivio, K. O.; Koskela, S.L. (1986): Screening of inherited oligosaccharidurias among mentally retarded patients in northern Finland. In: *J. Ment. Defic Res.* (4).
- Aula, P.; Mattila, K.; Piironen, O.; Ämmälä, P.; Koskull, H. von (1989): First-trimester prenatal diagnosis of aspartylglucosaminuria. In: *Prenat. Diagn.* (9).
- Aula, P.; Rapola, J.; Koskull, H.; Ammälä, P. (1984): Prenatal diagnosis and fetal pathology of aspartylglucosaminuria. In: *J. Med. Genet.* (2).
- Autti, T.; Rapola, J.; Santavuori, P.; Raininko, R.; Renlund, M.; Liukkonen, E. et al. (1999): Bone Marrow Transplantation in Aspartylglucosaminuria-Histopathological and MRI Study. In: *Neuropediatr.* (30).

- Ballabio, Andrea; Gieselmann, Volkmar (2009): Lysosomal disorders. From storage to cellular damage. In: *BBA*.
- Banning, A.; Gülec, C.; Rouvinen, J.; Gray, S. J.; Tikkanen, R. (2016): Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. In: *Sci. Rep.* (6).
- Banning, A.; König, J. F.; Gray, S. J.; Tikkanen, R. (2017): Functional Analysis of the Ser149/Thr149 Variants of Human Aspartylglucosaminidase and Optimization of the Coding Sequence for Protein Production. In: *International journal of molecular sciences* (4).
- Boyd, R. E.; Lee, G.; Rybczynski, P.; Benjamin, E. R.; Khanna, R.; Wustman, B. A.; Valenzano, K. J. (2013): Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. In: *J. Med. Chem.* (56).
- 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. In: *Neurodegen. Dis.* (12).
- Cismondi, I. A.; Kohan, R.; Adams, H.; Bond, M.; Brown, R.; Cooper, J. D. et al. (2015): Guidelines for incorporating scientific knowledge and practice on rare diseases into higher education. Neuronal ceroid lipofuscinoses as a model disorder. In: *BBA* (1852).
- Cox, T. M.; Cachón-González, M. B. (2012): The cellular pathology of lysosomal diseases. In: *J. Pathol.* (2).
- Craig, S. A.S. (2004): Betaine in human nutrition. In: *EME* 12 (4).
- Cudkovicz, M. E.; Shefner, J. M.; Simpson, E.; Grasso, D.; Yu, H.; Zhang, H. et al. (2008): Arimoclomol at dosages up to 300 mg/day is well tolerated and safe in amyotrophic lateral sclerosis. In: *Muscle Nerve* (38).
- Daugaard, M.; Rohde, M.; Jäättelä, M. (2007): The heat shock protein 70 family. Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. In: *FEBS Lett.* (19).
- Davidson, S. M.; Vander Heiden, M. G. (2017): Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (57).
- Delahunty, C. M.; Ankener, W.; Brainerd, S.; Nickerson, D. A.; Mononen, I. T. (1995): Finnish-type aspartylglucosaminuria detected by oligonucleotide ligation assay. In: *Clin. Chem.* (41).
- Dunder, U.; Valtonen, P.; Kelo, E.; Mononen, I. (2010): Early initiation of enzyme replacement therapy improves metabolic correction in the brain tissue of aspartylglucosaminuria mice. In: *J. Inherited Metabol. Dis.* (5).
- Eppstein, C. J.; Goldberger, R. F.; Anfinsen, C. B. (1963): Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. In: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (28).
- Fan, J.-Q.; Ishii, S. (2007): Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. Yin and Yang of enzyme inhibitors. In: *FEBS J.* (19).
- Feder, M. E.; Hofmann, G. E. (1999): Heat-Shock Proteins, molecular Chaperones and the stress response. Evolutionary and Ecological Physiology. In: *Annu. Rev. Physiol.* (61).
- Fisher, K. J.; Tollersrud, O. K.; Aronson, N. N. (1990): Cloning and sequence analysis of a cDNA for human glycosylasparaginase. In: *FEBS Lett.* (2).

- Fu, X. L.; Gao, D. S. (2014): Endoplasmic reticulum proteins quality control and the unfolded protein response. The regulative mechanism of organisms against stress injuries. In: *BioFactors* (6).
- Goodsell, D. S.; Olson, A. J. (2000): Structural Symmetry and Protein Function. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* (29).
- Gray, S. J. (2013): Gene therapy and neurodevelopmental disorders. In: *Neuropharmacol.* (68).
- Grön, K.; Aula, P.; Peltonen, L. (1990): Linkage of aspartylglucosaminuria (AGU) to marker loci on the long arm of chromosome 4. In: *Hum. Genet.* (85).
- Gupta, A.; Read, D. E.; Gupta, S. (2015): Assays for induction of the unfolded protein response and selective activation of the three major pathways. In: *Meth. Mol. Biol.* (1292).
- Haltia, M.; Palo, J.; Autio, S. (1975): Aspartylglycosaminuria: a generalized storage disease. Morphological and histochemical studies. In: *Acta Neuropathol.* (31).
- Harqitai, J.; Lewis, H.; Boros, I.; Racz, T.; Fiser, A.; Kurucz, I. et al. (2003): Bimoclolmol, a heat shock protein co-inducer, acts by the prolonged activation of heat shock factor-1. In: *Biochem Biophys Res Commun.* (307).
- Hartl, F. U.; Hayer-Hartl, M. (2002): Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. In: *Science's Compass* (295).
- Hietala, M.; Aula, P.; Syvänen, A. C.; Isoniemi, A.; Peltonen, L.; Palotie, A. (1996): DNA-based carrier screening in primary helathcare: screening for aspartylglucosaminuria mutations in maternity health office. In: *Current Chemistry* (42).
- Huang, J. T.; Xing, D. J.; Huang, W. (2012): Relationship between protein folding kinetics and amino acid properties. In: *Amino acids* (2).
- Ikonen, E.; Aula, P.; Gron, K.; Tollersrud, O.; Halila, R.; Manninen, T. et al. (1991a): Spectrum of mutations in aspartylglucosaminuria. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (24).
- Ikonen, E.; Baumann, M.; Grön, K.; Syvänen, A. C.; Enomaa, N.; Halila, R. et al. (1991b): Aspartylglucosaminuria: cDNA encoding human aspartylglucosaminidase and the missense mutation causing the disease. In: *EMBO J.* (10).
- Ikonen, E.; Julkunen, I.; Tollersrud, O. K.; Kalkkinen, N.; Peltonen, L. (1993): Lysosomal aspartylglucosaminidase is processed to the active subunit complex in the endoplasmic reticulum. In: *EMBO J.* (12).
- Imamura, T.; Haruta, T.; Takata, Y.; Usui, I.; Iwata, M.; Ishihara, H. et al. (1998): Involvement of Heat Shock Protein 90 in the Degradation of Mutant Insulin Receptors by the Proteasome. In: *J. Biol. Chem.* (18).
- Isoniemi, A.; Hietala, M.; Aula, P.; Jalanko, A.; Peltonen, L. (1995): Identification of a novel mutation causing aspartylglucosaminuria reveals a mutation hotspot region in the aspartylglucosaminidase gene. In: *Hum. Mut.* (4).
- Jalanko, A.; Tenhunen, K.; McKinney, C. E.; LaMarca, M. E.; Rapola, J.; Autti, T. et al. (1998): Mice with an aspartylglucosaminuria mutation similar to humans replicate the pathophysiology in patients. In: *Hum. Mol. Genet.* (7).
- Kaartinen, V.; Mononen, I. (1989): Analysis of aspartylglucosamine at the picomole level by high-performance liquid chromatography. In: *J. Chromatogr.* (490).

- Kaartinen, V.; Mononen, I.; Voncken, J. W.; Noronkoski, T.; Gonzales-Gomez, I.; Heisterkamp, N.; Groffen, J. (1996): A mouse model for the human lysosomal disease aspartylglycosaminuria. In: *Nat. Med.* (2(12)).
- Kaartinen, V.; Williams, J. C.; Tomich, J.; Yates III, J. R.; Hood, L. E.; Mononen, I. (1991): Glycosaparaginase from Human Leukocyte. Inactivation and covalent modification with Diazo-Oxonorvaline. In: *J. Biol. Chem.* (266).
- Kalmar, B.; Novoselov, S.; Gray, A.; Cheetham, M. E.; Margulis, B.; Greensmith, L. (2008): Late stage treatment with Arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1 mouse model of ALS. In: *J. Neurochem.* (2).
- Kapahnke, M.; Banning, A.; Tikkanen, R. (2016): Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. In: *Cells* (5).
- 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. In: *Glycobiol.* (1).
- Kieran, D.; Kalmar, B.; Dick, J. R. T.; Riddoch-Contreras, J.; Burnstock, G.; Greensmith, L. (2004): Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. In: *Nature Med.* (4).
- Kingma, S. D. K.; Bodamer, O. A.; Wijburg, F. A. (2015): Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. In: *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* (2).
- Kirkegaard, T.; Gray, J.; Priestmann, D. A.; Wallom, K. L.; Atkins, J.; Olsen, O. D. et al. (2016): Heat shock protein-based therapy as a potential candidate for treating the sphingolipidoses. In: *Sci. Transl. Med.* (8).
- Kirkegaard, T.; Roth, A. G.; Petersen, N. H. T.; Mahalka, A. K.; Olsen, O. Dines; Moilanen, I. et al. (2010): Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. In: *Nature* 463 (7280).
- Kulkarni, P.; Rajagopalan, K.; Yeater, D.; Getzenberg, R. H. (2011): Protein folding and the order/disorder paradox. In: *J. Cell. Biochem.* (7).
- Langlois, S.; FRCPC; FCCMG; Wilson, R. D.; FRCSC (Chair) (2006): Carrier Screening for Genetic Disorders in Individuals of Ashkenazi Jewish Descent. In: *J. Obstet. Gynaecol. Can.* (28).
- Lee, D. H.; Goldberg, A. L. (1998): Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. (8).
- Lindquist, S. (1986): The Heat-Shock Response. In: *Annual Rev. Biochem.* 55 (1).
- Makino, M.; Kojima, T.; Ohgushi, T.; Yamashina, I. (1968): Studies on enzymes acting on glycopeptides. In: *J. Biochem.* (63).
- Malik, B.; Nirmalanathan, N.; Gray, A. L.; La Spada, A. R.; Hanna, M. G.; Greensmith, L. (2013): Co-induction of the heat shock response ameliorates disease progression in a mouse model of human spinal and bulbar muscular atrophy. Implications for therapy. In: *Brain* (3).
- Meikle, P. J.; Hopwood, J. J.; Clague, A. E.; Carey, W. F. (1999): Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. In: *JAMA* 281.

- Mononen, I.; Fisher, K. J.; Kaartinen, V.; Aronson, N. N. Jr. (1993): Aspartylglycosaminuria: protein chemistry and molecular biology of the most common lysosomal storage disorder of glycoprotein degradation. In: *FASEB J.* (7).
- Mononen, I.; Heisterkamp, N.; Kaartinen, V.; Williams, J. C.; Yates III, J. R.; Griffin, P. R. et al. (1991): Aspartylglycosaminuria in the Finnish population: Identification of two point mutations in the heavy chain of glycoasparaginase. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* (88).
- Mononen, I.; Kaartinen, V.; Mononen, T. (1988a): Amniotic fluid glycoasparagines in fetal aspartylglycosaminuria. In: *J. Inh. Metab. Dis.* (11).
- Mononen, I.; Kaartinen, V.; Mononen, T. (1988b): Laboratory detection of aspartylglycosaminuria. In: *Scand. J. Clin. Invest Suppl.* (191).
- Mononen, I.; Mononen, T.; Ylikangas, P.; Kaartinen, V.; Savolainen, K. (1994): Enzymatic Diagnosis of Aspartylglucosaminuria by Fluorometric Assay of Glycosylasparaginase in Serum, Plasma or Lymphocytes. In: *Clin. Chem.* (40).
- Mononen, T.; Parviainen, M.; Penttilä, I.; Mononen, I. (1986): Liquid-Chromatographic Detection of Aspartylglycosaminuria. In: *Clin. Chem.* (32).
- Moore, P. B.; Steitz, T. A. (2005): The ribosome revealed. In: *Trends Biochem. Sci.* (6).
- Morris, C.; Heisterkamp, N.; Groffen, J.; Williams, J. C.; Mononen, I. (1992): Chromosomal localization of the human glycoasparaginase gene to 4q32-q33. In: *Hum. Genet.* (88).
- Mu, T.-W.; Ong, D. S. T.; Wang, Y.-J.; Balch, W. E.; Yates, J. R.; Segatori, L.; Kelly, J. W. (2008a): Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. In: *Cell* (5).
- Mu, Ting-Wei; Ong, Derrick Sek Tong; Wang, Ya-Juan; Balch, William E.; Yates, John R.; Segatori, Laura; Kelly, Jeffery W. (2008b): Proteostasis Regulators and Pharmacologic Chaperones Synergize to Correct Protein Misfolding Diseases. In: *Cell* 134 (5).
- Neef, D. W.; Jaeger, A. M.; Thiele, D. J. (2011): Heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* (12).
- Neudegger, T.; Verghese, J.; Hayer-Hartl, M.; Hartl, F. U.; Bracher, A. (2016): Structure of human heat-shock transcription factor 1 in complex with DNA. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2).
- Oinonen, C.; Tikkanen, R.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1995): Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. In: *Nat. Strukt. Biol.* (2).
- O'Leary, E. M.; Igdoura, S. A. (2012): The therapeutic potential of pharmacological chaperones and proteosomal inhibitors, Celastrol and MG132 in the treatment of sialidosis. In: *Mol. Genet. Metab.* (1-2).
- Parenti, G. (2009): Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones. From concept to clinics. In: *EMBO Mol. Med.* (5).
- Parenti, G.; Andria, G.; Ballabio, A. (2015): Lysosomal storage diseases. From pathophysiology to therapy. In: *Annu. Rev. Med.*
- Parenti, G.; Moracci, M.; Fecarotta, S.; Andria, G. (2014): Pharmacological chaperone therapy for lysosomal storage disease. In: *Future Medicinal Chemistry* (6).

- Parfitt, D. A.; Aguila, M.; McCulley, C. H.; Bevilacqua, D.; Mendes, H. F.; Athanasiou, D. et al. (2014): The heat-shock response co-inducer arimoclomol protects against retinal degeneration in rhodopsin retinitis pigmentosa. In: *Cell Death Dis.* (5).
- Paris, D.; Ganey, N. J.; Laporte, V.; Patel, N. S.; Beaulieu-Abdelahad, D.; Bachmeier, C. et al. (2010): Reduction of beta-amyloid pathology by Celastrol in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: *J. Neuroinflammation* (7).
- Pastores, G. M.; Torres, P. A.; Zeng, B.-J. (2013): Animal models for lysosomal storage disorders. In: *Biochem. Moscow* (7).
- Peltola, M.; Kyttälä, A.; Heinonen, O.; Rapola, J.; Paunio, T.; Revah, F. et al. (1998): Adenovirus-mediated gene transfer results in decreased lysosomal storage in brain and total correction in liver of aspartylglucosaminuria (AGU) mouse. In: *Gene Ther.* (10).
- Pinto, R.; Caseiro, C.; Lemos, M.; Lopes, L.; Fontes, A.; Ribeiro, H. et al. (2004): Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. In: *Eur. J. Hum. Genet.* (2).
- Pollitt, R. J.; Jenner, F. A.; Merskey, H. (1968): Aspartylglucosaminuria An Inborn Error of Metabolism Associated with Mental Defect. In: *Lancet.*
- Poupetová, H.; Ledvinová, J.; Berná, L.; Dvorská, L.; Kozich, V.; Elleder, M. (2010): The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic. Comparison with data in different populations. In: *J. Inherit Metab. Dis.* (4).
- Regier, D. S.; Proia, R. L.; D'Azzo, A.; Tiffit, C. J. (2016): The GM1 and GM2 Gangliosidoses: Natural History and Progress toward Therapy. In: *Pediatr. Endocrinol. Rev.* (13).
- Riikonen, A.; Rouvinen, J.; Tikkanen, R.; Julkunen, I.; Peltonen, L.; Jalanko, A. (1996): Primary Folding of Aspartylglucosaminidase. In: *J. Biol. Chem.* (35).
- Saarela, J.; Laine, M.; Oinonen, C.; von Schnatz, C.; Jalanko, A.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (2001): Molecular pathogenesis of a disease: structural consequences of aspartylglucosaminuria mutations. In: *Hum. Mol. Genet.* (10).
- Saarela, J.; Laine, M.; Tikkanen, R.; Oinonen, C.; Jalanko, A.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1998): Activation and Oligomerization of Aspartylglucosaminidase. In: *J. Biol. Chem.* (39).
- Saarela, J.; Oinonen, C.; Jalanko, A.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (2004): Autoproteolytic activation of human aspartylglucosaminidase. In: *Biochem. J.* (2).
- Salminen, A.; Lehtonen, M.; Paimela, T.; Kaarniranta, K. (2010): Celastrol: Molecular targets of Thunder God Vine. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (394).
- Staretz-Chacham, O.; Choi, J. H.; Wakabayashi, K.; Lopez, G.; Sidransky, E. (2010): Psychiatric and behavioral manifestations of lysosomal storage disorders. In: *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* (7).
- Tikkanen, R.; Riikonen, A.; Oinonen, C.; Rouvinen, J.; Peltonen, L. (1996): Functional analyses of active site residues of human lysosomal aspartylglucosaminidase: implications for catalytic mechanism and autocatalytic activation. In: *EMBO J.* (15).
- Tikkanen, R.; Enomaa, N.; Riikonen, A.; Ikonen, E.; Peltonen, L. (1995): Intracellular Sorting of Aspartylglucosaminidase: The Role of N-Linked Oligosaccharides and Evidence of Man-6-P-Independent Lysosomal Targeting. In: *DNA&Cell Biol.* (14).
- Tokola, A. M.; Aberg, L. E.; Autti, T. H. (2015): Brain MRI findings in aspartylglucosaminuria. In: *Am. J. Neuroradiol.* (42).

- Vairo, F. Pinto; Boczek, N. J.; Cousin, M. A.; Kaiwar, C.; Blackburn, P. R.; Conboy, E. et al. (2017): The prevalence of diseases caused by lysosome-related genes in a cohort of undiagnosed patients. In: *Mol. Genet. Metab. Rep.* (13).
- Valkonen, S.; Hietala, M.; Savontaus, M.-L.; Aula, P. (1999): Origin of Finnish mutations causing aspartylglucosaminuria. In: *Hereditas* (131).
- Vígh, L.; Literati, P. N.; Horvath, I.; Török, Z.; Balogh, G.; Glatz, A. (1997): Bimoclolmol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. In: *Nat. Med.* (3).
- 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. In: *J. Gene Med.* (8).
- Voges, D.; Zwickl, P.; Baumeister, W. (1999): The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. In: *Annu. Rev. Biochem.* (68).
- Walkley, S. U. (2004): Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. In: *Semin. Cell Dev. Biol.* (15).
- Wei, J.; Hendershot, L. M. (1996): Protein folding and assembly in the endoplasmic reticulum. In: *EXS.* (77).
- Westerheide, S. D.; Bosman, J. D.; Mbadugha, B. N. A.; Kawahara, T. L. A.; Matsumoto, G.; Kim, S. et al. (2004): Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection. In: *J. Biol. Chem.* (279).
- Wraith, J. E. (2002): Lysosomal disorders. In: *Semin. Neonatal Med.* (7).
- Wraith, J. E. (2013): Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. In: O. Dulac, M. Lassonde und H. B. Sarnat (Hg.): *Handbook of Clinical Neurology. Mucopolysaccharidose and mucopolipidoses, III.*
- www.raretrait.com, 07.12.2017
- Xia, B.; Asif, G.; Arthur, L.; Pervaiz, M. A.; Li, X.; Liu, R. et al. (2013): Oligosaccharide analysis in urine by maldi-tof mass spectrometry for the diagnosis of lysosomal storage diseases. In: *Clinical chemistry* 59 (9).
- 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. In: *Brain Dev.* (5).
- Yang, H.; Di Chen; Cui, Q. C.; Yuan, X.; Dou, Q. P. (2006): Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. In: *Canc. Res.* (66).
- Young, J. C.; Agashe, V. R.; Siegers, K.; Hartl, F. U. (2004): Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* (5).

## 11 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

## 12 Danksagung

Hiermit möchte ich meinen herzlichen Dank den folgenden Personen entgegenbringen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ritva Tikkanen. Vielen Dank für die Ermöglichung und für die durchgehende zeitnahe Betreuung dieser Doktorarbeit und die herzliche Hilfe bei der Durchführung, sowie die freundlichen Ratschläge.

Ein liebes Dankeschön geht an Dr. Antje Banning für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung. Vielen Dank für deine Unterstützung auf die ich jederzeit zählen konnte, die außergewöhnliche Motivation und die temporäre Aufnahme in dein Büro.

Des Weiteren danke ich Ralf Füllkrug und Petra Janson für die geduldige Einführung, Betreuung und Unterstützung im Labor und Petra besonders für die Ausdauer bei der Herstellung der Immunfluoreszenzbilder.

Danken möchte ich außerdem Bene, Junma und Peter. Bene, vielen lieben Dank für dein Engagement und für deine tatkräftige Hilfe. Junma und Peter danke ich für die lustige und moralisch Unterstützung, besonders während des Schreibens.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Vielen Dank für die großzügige Hilfsbereitschaft in der Zeit der Doktorarbeit.

Das herzliche und hilfsbereite Klima im Labor wird mir immer in Erinnerung bleiben.