

Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration

Direktor: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs

**Beeinflussung der ER-assoziierten Proteostase zur Erhöhung der
Aktivität mutanter α -Galaktosidase A und der Verbesserung der
Pathophysiologie in Morbus Fabry**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (doctor rerum humanarum)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Susanne Seemann, geb. am 08.11.1981 in Güstrow

aus Rostock

Rostock, 01.10.2018



Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Arndt Rolfs
Zentrum für Nervenheilkunde
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Hugo Murua Escobar
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Christine Klein
Institut für Neurogenetik
Universität Lübeck

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Proteostase sekretorischer Proteine	1
1.1.1 Proteinsynthese, Faltung und Prozessierung	1
1.1.2 Die ER-assoziierte Degradation (ERAD)	4
1.1.3 Die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR)	7
1.2 Bildung und Transport lysosomaler Proteine	9
1.3 Lysosomale Speichererkrankungen.....	11
1.4 Morbus Fabry	11
1.4.1 Pathophysiologie	11
1.4.2 Symptome und Diagnose	13
1.4.3 Therapiemöglichkeiten.....	14
1.4.4 Proteostase-Regulatoren als neuer Therapieansatz	16
1.5 Zielstellungen der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.2 Kultivierung von Fibroblasten	22
2.2.1 Passagieren und Aussaat	22
2.2.2 Kryokonservierung.....	23
2.3 <i>GLA</i> -Gensequenz-Analyse der Fibroblasten (nach Sanger).....	23
2.4 Behandlung und Zellernte der Fibroblasten für Enzymaktivitätsbestimmungen.....	23
2.5 Protein- und Enzymaktivitätsbestimmung	25
2.6 Western Blot-Analyse der α -Gal A	25
2.6.1 Zellkultur und Probenvorbereitung für Western Blot	25
2.6.2 SDS-Gelelektrophorese	26
2.6.3 Proteintransfer und immunologische Proteindetektion	26
2.6.4 PNGase F-Verdau	27
2.7 Quantifizierung von Globotriaosylsphingosin in Patientenfibroblasten	27
2.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	28
2.9 Bestimmung proteasomaler Aktivität.....	29
2.10 Dosis-Wirkungs-Kurven und Synergie-Kalkulation	30

2.11 Microarray-Analyse	31
2.11.1 Probenherstellung und Durchführung der Microarrays	31
2.11.2 Qualitätskontrolle und Expressionsanalyse	32
2.11.3 WikiPathways-Analyse	32
2.12 Erstellung eines Proteostase-Schemas.....	32
2.13 RNAi-vermittelter Knockdown regulierter Gene.....	34
2.13.1 <i>Readout</i> -Validierung	35
2.13.2 Knockdown regulierter Gene	36
2.14 Statistische Analysen.....	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Phänotypische Veränderungen in Morbus Fabry-Fibroblasten.....	37
3.2 Erhöhte Aktivität an α -Gal A in Morbus Fabry-Fibroblasten durch DGJ und PRs	39
3.3 Synergistische Effekte der PRs in Kombination mit dem PC DGJ.....	41
3.4 Erhöhung der Proteinmenge an α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch BTZ	45
3.5 Senkung endogener lyso-Gb3-Level in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch BTZ	48
3.6 DGJ und PRs mit unterschiedlichen Effekten auf die proteasomale Aktivität	52
3.7 DGJ und PRs mit unterschiedlichen Effekten auf die <i>GLA</i> -Expression	53
3.8 Erstellung eines Proteostase-Schemas	54
3.9 Vergleich der Genexpressionen in WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten	55
3.10 PRs mit starkem Einfluss auf die globale Genexpression.....	61
3.11 Einfluss der PRs auf die Expression Proteostase-assoziiierter Gene	63
3.12 Potenzielle Zielgene für die Beeinflussung mutanter α -Gal A	69
3.13 Regulierte Gene mit Einfluss auf die Aktivität von α -Gal A	71
3.13.1 <i>Readout</i> -Validierung	71
3.13.2 Einfluss potenzieller Zielgene auf die Aktivität mutanter α -Gal A	74
4 Diskussion	76
4.1 Pathophysiologie der Morbus Fabry-Fibroblasten.....	76
4.2 Verbesserung des Phänotyps von Morbus Fabry durch Proteostase-Regulatoren.....	78
4.2.1 Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A durch PRs	78
4.2.2 Steigerung der Proteinmenge mutanter α -Gal A durch BTZ	81
4.2.3 Senkung von lyso-Gb3-Ansammlungen in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch BTZ.....	83
4.3 Wirkmechanismen der effektiven PRs	86
4.3.1 <i>GLA</i> -Expressionserhöhung als ein Wirkmechanismus der PRs.....	86
4.3.2 Einfluss der proteasomalen Inhibition auf die Aktivität der α -Gal A	87
4.3.3 Transkriptionelle Einflüsse der PRs	89

4.4 Neue Zielgene für die Verbesserung der Pathophysiologie des Morbus Fabry	91
4.5 Klinische Aspekte	95
5 Zusammenfassung.....	98
6 Literaturverzeichnis.....	100
7 Anhang	110
Danksagung.....	134
Eidesstattliche Erklärung.....	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Prozessierung von Glykoproteinen

Abbildung 1.2: ERAD fehlgefalteter sekretorischer Proteine

Abbildung 1.3: Struktur und Funktion des 26S-Proteasoms

Abbildung 1.4: Aktivierung und Ablauf der UPR

Abbildung 1.5: M6PR-abhängiger Transport von Enzymen ins Lysosom

Abbildung 1.6: Struktur von Gb3 und lyso-Gb3

Abbildung 1.7: Struktur von DGJ

Abbildung 2.1: Arbeitsablauf für das Erstellen eines Proteostase-Schemas

Abbildung 3.1: Proteinmenge an α -Gal A in WT1- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Abbildung 3.2: Lyso-Gb3-Level in WT1- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Abbildung 3.3: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch PRs

Abbildung 3.4: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten durch PRs

Abbildung 3.5: Synergistische Wirkungen von DGJ und PRs

Abbildung 3.6: Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Kombinationsbehandlung mit DGJ und BTZ

Abbildung 3.7: Synergistische Effekte von DGJ und BTZ

Abbildung 3.8: Erhöhung der Proteinmenge mutanter α -Gal A durch DGJ und BTZ

Abbildung 3.9: Proteinmengen an α -Gal A in WT1- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nach PNGase F-Verdau

Abbildung 3.10: Effekte von DGJ und BTZ auf endogene lyso-Gb3-Level in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Abbildung 3.11: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nach 18 Tagen

Abbildung 3.12: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nach 14 Tagen

Abbildung 3.13: Einfluss von DGJ und PRs auf die proteasomale Aktivität

Abbildung 3.14: Einfluss von DGJ und PRs auf die GLA -Expression

Abbildung 3.15: Proteostase-Schema

Abbildung 3.16: Vergleich der globalen Genexpression in WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Abbildung 3.17: Vergleich der Expressionsmuster differenziell exprimierter Gene in WT-Fibroblasten

Abbildung 3.18: Vergleich der Expressionsmuster differenziell exprimierter Gene in WT- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten

Abbildung 3.19: Vergleich der Expressionsmuster differenziell exprimierter Proteostasegene in WT-Fibroblasten

Abbildung 3.20: Vergleich der behandlungsinduzierten globalen Expressionsmuster in *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten

Abbildung 3.21: PT-Signaturen der unterschiedlichen PRs

Abbildung 3.22: Vergleich der behandlungsinduzierten Expressionsmuster von Proteostasegenen in *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten

Abbildung 3.23: Visualisierte PT-Signaturen der unterschiedlichen PRs

Abbildung 3.24: Heatmap der differenziell exprimierten Proteostasegene

Abbildung 3.25: Effektivität des *GLA*-Knockdowns

Abbildung 3.26: Aktivität mutanter α -Gal A nach Knockdown des *GLA*-Gens

Abbildung 3.27: Einfluss des Knockdowns potenzieller Zielgene auf die Aktivität mutanter α -Gal A

Abbildung 4.1: Synergie von DGJ und BTZ bei der Wiederherstellung der Funktion mutanter α -Gal A

Abbildung A.1: Proteostase-Netzwerk

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zelllinien

Tabelle 2.2: Variationen/ Mutationen des *GLA*-Gens in den verwendeten Zelllinien

Tabelle 2.3: Zellkulturmedien und Mediumzusätze

Tabelle 2.4: Wirkstoffe

Tabelle 2.5: Konzentrationsbereiche der eingesetzten Wirkstoffe

Tabelle 2.6: Zellbehandlungen zur Generierung von Microarray-Proben

Tabelle 2.7: GO-Annotationen zur AmiGO-Abfrage

Tabelle 3.1: Anzahl differenziell exprimierter Gene in WT-Fibroblasten im Vergleich zu *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten

Tabelle 3.2: *GLA*-Expression in *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten in Bezug auf WT-Fibroblasten

Tabelle 3.3: Anzahl der regulierten Gene nach Behandlung mit DGJ und PRs

Tabelle 3.4: Überrepräsentierte Signalwege in der Überlappung aller GT-Signaturen

Tabelle 3.5: Anzahl der regulierten Proteostasegene nach Behandlung mit DGJ und PRs

Tabelle 3.6: Gene mit potenziellem Einfluss auf die Aktivität der α -Gal A

Tabelle A.1: Wirkstoff-Informationen

Tabelle A.2: Chemikalien

Tabelle A.3: Lösungen für biochemische Analyseverfahren und Western Blot

Tabelle A.4: Antikörper für Western Blot

Tabelle A.5: Kits

Tabelle A.6: Primer für qRT-PCR

Tabelle A.7: Geräte

Tabelle A.8: Verbrauchsmaterialien

Tabelle A.9: Software

Tabelle A.10: siRNA-Sequenzen für die Validierung potenzieller Zielgene

Tabelle A.11: Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Kombinationsbehandlung aus DGJ und BTZ

Tabelle A.12: Proteostasekomponenten

Tabelle A.13: Differenziell exprimierte Proteostasegene in WT-Fibroblastenlinien im Vergleich zu *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten

Tabelle A.14: Überrepräsentierte Signalwege innerhalb aller Gene der vier GT-Signaturen

Tabelle A.15: Differenziell exprimierte Proteostasegene nach Behandlung mit den PRs

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- α -D-Galaktopyranosid
α -Gal A	α -Galaktosidase A
ABX	Ambroxol
ATF	<i>activating transcription factor</i>
BIP	<i>immunoglobulin heavy-chain-binding protein</i> (GRP78)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (dt. Rinderserumalbumin)
BTZ	Bortezomib
CLC	Clasto-Lactacystin- β -lacton
CLEAR	<i>coordinated lysosomal expression and regulation</i>
CNX	Calnexin
CRT	Calreticulin
d	Einheitszeichen für Tag
Da	Dalton
DGJ	1-Deoxygalactonojirimycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EerI	Eeyarestatin I
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor-2α</i>
FKS	Fetales Kälberserum
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (dt. Europäische Arzneimittel-Agentur)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
ERT	<i>enzyme replacement therapy</i> (dt. Enzymersatztherapie)
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i>)
g	Einheitszeichen für Gramm
Gb3	Globotriaosylceramid
GCase	Glucocerebrosidase
GLA	Gen, das die α -Gal A kodiert
GT-Signatur	globale transkriptionelle Signatur
GO	<i>Gene Ontology</i>
°C	Einheitszeichen für Grad Celsius
h	Einheitszeichen für Stunde
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>

HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IRE1	<i>inositol-requiring protein 1</i>
LSD	<i>lysosomal storage disorder</i> (dt. lysosomale Speichererkrankung)
lyso-Gb3	Globotriaosylsphingosin
M	Maßeinheit der Stoffmengenkonzentration: mol/l
μ	Einheitenvorsatz Mikro: 10 ⁻⁶
m	Einheitenvorsatz Milli: 10 ⁻³
M6P	Mannose-6-phosphat
M6PR	M6P-Rezeptor
min	Einheitszeichen für Minute
n	Einheitenvorsatz Nano: 10 ⁻⁹
n	Anzahl der biologischen Replikate (Gruppengröße)
NPC1	Morbus Niemann-Pick Typ C1
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (dt. phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	Pharmakologisches Chaperon
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PERK	<i>protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration)
PR	Proteostase-Regulator
PT-Signatur	Proteostase-assoziierte transkriptionelle Signatur
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RT	Raumtemperatur
s	Einheitszeichen für Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dt. Sodiumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
UPR	<i>unfolded protein response</i> (dt. Antwort auf ungefaltete Proteine)
WT	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung [g]
XBP1	<i>X box-binding protein-1</i>

1 Einleitung

1.1 Proteostase sekretorischer Proteine

Unter Proteinhomöostase oder kurz Proteostase versteht man ein Zusammenspiel verschiedener biologischer Prozesse, die dazu dienen ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, -faltung, -transport und -abbau aufrechtzuerhalten¹. Nahezu ein Drittel des humanen Proteoms wird in das endoplasmatische Retikulum (ER) und von dort in nachgeschaltete Kompartimente des sekretorischen Signalweges transportiert. Entsprechende Proteine sind unter anderem in der Zell-Zell-Kommunikation, inflammatorischen und immunologischen Signalwegen sowie lysosomalen Abbauprozessen beteiligt^{2,3}. Zu letzteren gehört u. a. das lysosomale Enzym α -Galaktosidase A (α -Gal A). Diese Proteine werden im ER gefaltet und in ihre dreidimensionale Struktur gebracht. Proteine, die nicht in ihre gefaltete Konformation überführt werden können, werden von Komponenten der ER-assoziierten Degradation (ERAD) erkannt, in das Zytosol transportiert und proteasomal degradiert³. Zellstress und Mutationen können zu einem Ungleichgewicht zwischen der ER-Last mit ungefalteten Proteinen und der Faltungskapazität des ER führen. Die dadurch aktivierte Zellantwort auf ungefaltete Proteine (*unfolded protein response*, UPR) führt zur Erhöhung der Transkription von Komponenten der Proteinfaltung bzw. der ERAD^{3,4}. Die übermäßige Degradation aberranter Proteine und die damit verbundenen Einschränkungen in Faltung und Transport sind assoziiert mit Proteinfaltungserkrankungen wie den lysosomalen Speichererkrankungen, zu denen auch der Morbus Fabry zählt³.

1.1.1 Proteinsynthese, Faltung und Prozessierung

Sekretorische Proteine werden an ER-gebundenen Ribosomen synthetisiert und enthalten eine vorwiegend aus 20-25 Aminosäuren bestehende N-terminale Signalsequenz (31 Aminosäuren im Falle der α -Gal A⁵). Diese wird von einem Ribonukleoprotein-Komplex gebunden, welcher als *signal recognition particle* (SRP) bezeichnet wird. Der SRP besteht aus sechs Proteinen sowie einem RNA-Molekül und bindet an einen auf der ER-Membran befindlichen SRP-Rezeptor. Daraufhin löst sich SRP vom Ribosom-Protein-Komplex, wodurch das auf diese Weise zum ER geleitete Protein cotranslational durch eine Translokations-Pore (Translokon) in das ER-Lumen transportiert wird. Das Translokon wird aus einem Sec61-Komplex, bestehend aus einer alpha-, beta- und gamma-Untereinheit, gebildet. In den meisten Fällen kommt es während

der Translokation zur Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz durch eine Signal-Peptidase^{6,7,8}. Im ER erfolgt die N-Glykosylierung des Polypeptids, d.h. die Anbindung von vorgeformten Oligosacchariden ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$, vgl. Abbildung 1.1), an Asparagin-Seitenketten mit der Sequenz Asn-X-Ser/ Thr, wobei X jede Aminosäure außer Prolin und Asparaginsäure sein kann^{6,7,8}. Die cotranslationale Anbindung von Glykanen an das naszierende Protein wird durch den heterogenen Membrankomplex Oligosaccharyltransferase (OST) katalysiert, welcher mit dem Translokon assoziiert ist⁹.

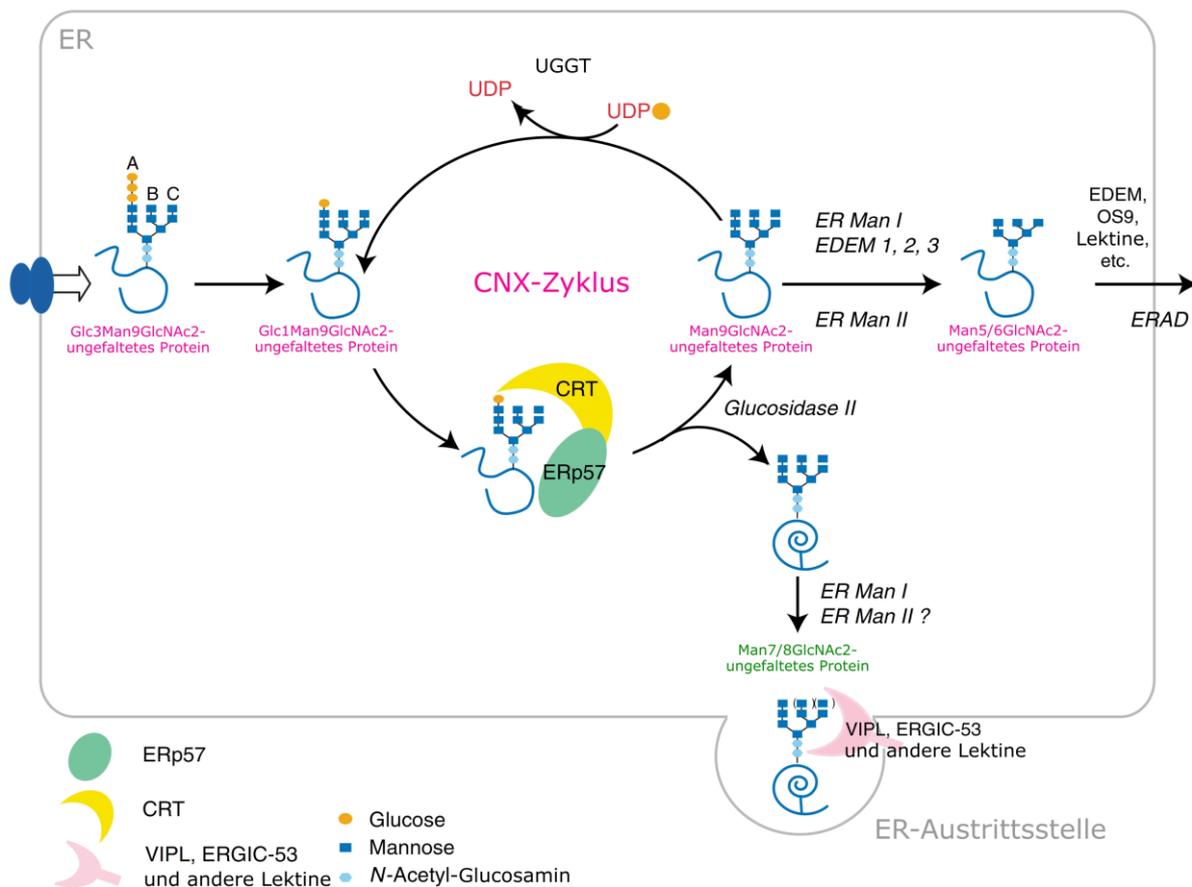


Abbildung 1.1: Prozessierung von Glykoproteinen. Glykoproteine werden cotranslational in das ER transportiert und glykosyliert. Nach Abspaltung von zwei Glucose-Resten erfolgt die Faltung der Glykoproteine durch Calnexin (CNX) bzw. Calreticulin (CRT). Die Abspaltung des finalen Glucoserestes führt zur Freigabe des Proteins und dessen Weitertransport in den Golgi-Apparat. Fehlfaltete Proteine werden reglykosyliert und binden erneut CNX/CRT. Die Termination des CNX/CRT-Zyklus erfolgt durch die Abspaltung des kritischen, als Glucose-Akzeptor fungierenden Mannose-Restes, wodurch eine erneute Bindung an CNX/CRT nicht möglich ist und das fehlgefaltete Protein zur ERAD markiert und in das Zytosol transportiert wird. (modifiziert nach Anelli und Sitia, 2008)

Im nächsten Schritt werden zwei der drei Glucose-Reste enzymatisch abgespalten, so dass der Zuckerrest des neu synthetisierten Glykoproteins von den Lektin-Chaperonen Calnexin (CNX) bzw. Calreticulin (CRT) erkannt wird. Durch die Interaktion mit beiden Lektinen kommt es zur Faltung des Glykoproteins und erst nach Abspaltung des finalen Glucoserestes zur Freigabe des Proteins. Sollte das Glykoprotein noch nicht vollständig gefaltet sein, wird dieses über die UDP-Glucose:Glykoprotein-Glucosyltransferase (UGGT) reglucosyliert und bindet erneut CNX/CRT, welche die ungefalteten Glykoproteine im ER zurückhalten und die oxidative Faltung mittels ERp57 fördern. Durch die Entfernung des terminalen Glucoserestes über die Glucosidase II dissoziiert das Protein von CNX/CRT für eine erneute Inspektion durch die UGGT. Korrekt gefaltete Proteine werden in Vesikel verpackt und über den Golgi-Apparat zur Zellmembran oder zu den Lysosomen transportiert. Weiterhin fehl- oder unvollständig gefaltete Proteine verbleiben währenddessen im CNX/CRT-Zyklus. Die Termination des Zyklus erfolgt durch die zunehmende Abspaltung von endständigen Mannose-Resten durch die ER-Mannosidase I oder die *ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*-Familie (EDEM1-3). Nach Abspaltung des kritischen, als Glucose-Akzeptor fungierenden Mannose-Restes ist eine erneute Bindung an CNX/CRT nicht mehr möglich und das fehlgefaltete Protein wird für die ERAD markiert^{7,8}.

Ein weiterer Signalweg für die Proteinfaltung basiert auf dem *immunoglobulin heavy-chain-binding protein* (BIP, Synonym: GRP78). BIP ist ein abundantes Chaperon, welches zur HSP70-Familie gehört. Allgemein wurden molekulare Chaperone einerseits in Bezug auf ihre molare Masse kategorisiert und andererseits unter Einbeziehung der Tatsache, dass viele Chaperone zuerst als Schutzmechanismus der Zelle auf extreme Temperaturbedingungen verstanden und als Hitzeschock-Proteine (*heat-shock proteins*, HSPs) bezeichnet wurden^{8,10}. BIP nimmt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der ER-Signalwege ein, zusammen mit fünf HSP40-Co-Chaperonen. Ob ein Glykoprotein initial in den BIP- oder den CNX/CRT-Signalweg gelangt, hängt von der Lokalisation der N-Glykane ab. Die Tendenz CNX als Chaperon-System zu verwenden steigt mit zunehmender Nähe der N-Glykane zum N-Terminus des unreifen Proteins. Sollten die ersten Faltungsversuche fehlschlagen, ist es dem Protein möglich, zum alternativen Signalweg zu wechseln⁸.

Ein drittes Chaperon-System, neben dem CNX/CRT-Zyklus und den nicht-kovalenten Interaktionen mit BIP, den HSP40 (Erdj) und HSP90-Chaperonen (GRP94), ist das der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDIs). Hierbei katalysieren ca. 20 verschiedene PDIs die Ausbildung von Disulfid-Brücken innerhalb der Proteine. Die PDIs variieren in ihren Oxidations-, Reduktions- und Isomerisations-Aktivitäten sowie in ihrer Substratspezifität⁹.

Die Aufrechterhaltung der Proteostase erfolgt durch einen hochkonservierten zellulären Mechanismus, welcher allgemein die Synthese, Faltung und Degradation von Proteinen beinhaltet. Hierbei aktiviert eine gesteigerte Proteinlast im ER die UPR, was wiederum die Faltungskapazitäten im ER erhöht und die ERAD aktiviert^{3,11,12}. Nicht zuletzt hat auch die Calcium-Konzentration im ER einen entscheidenden Einfluss auf die Biogenese sekretorischer Proteine. Dabei binden CRT, BIP und PDIs Calcium, was ihre Interaktion mit Polypeptiden und anderen Chaperonen ermöglicht und damit auch die Faltung naszierender Proteine. Der Transport von Calcium ins und aus dem ER wird über spezialisierte Transporter und Rezeptoren in der ER-Membran gesteuert. Hierzu gehören u. a. die Ryanodin-Rezeptoren und die Inositoltrisphosphat (IP3)-Rezeptoren. Da die Aktivität zahlreicher Chaperone stark von der Calcium-Konzentration im ER abhängt, können Änderungen dieser Calcium-Homöostase die Menge an fehlgefalteten Proteinen im ER erhöhen und zur Aktivierung der UPR führen¹³.

1.1.2 Die ER-assoziierte Degradation (ERAD)

Die Proteinsynthese ist ein fehleranfälliger Prozess, teilweise bedingt durch hohe Translationsraten. Außerdem können Zellstress oder Nährstoffmangel zum fehlerhaften Einbau von Aminosäuren führen¹⁰. Auch durch *missense*-Mutationen in einzelnen Genen, wie dem *GLA*-Gen, welches die α -Gal A kodiert, kann es zur Akkumulation defekter Proteine im ER kommen, welche Faltungsdefizite aufweisen¹⁴. Dies stellt ein hohes Risiko für die Zelle dar, da diese aberranten Proteine aggregieren bzw. funktionale Wildtyp-Proteine binden und so dominant-negative Effekte hervorrufen können. Um diese Gefahr zu minimieren, dienen zelluläre Mechanismen dazu, diese fehlerhaften Proteine in Lösung zu halten, um Proteinaggregation zu verhindern und sie dem proteolytischen Abbau zukommen zu lassen¹⁰.

Bei der ERAD kommt es zur Markierung fehlgefalteter Proteine im ER zur zytosolischen Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System⁹. Generell kann die ERAD in vier Schritte zusammengefasst werden. Dazu gehören die Substraterkennung, die Retrotranslokation in das Zytosol, die Ubiquitinierung und die proteasomale Degradation. ERM1 und EDEM1-3 leiten die Termination des CNX/CRT-Zyklus von fehlgefalteten Glykoproteinen durch die Abspaltung des kritischen Mannose-Restes und damit die ERAD ein (vgl. Abschnitt 1.1.1). Wichtig für die Retrotranslokation ist wahrscheinlich die Reduktion von Disulfidbrücken. Für die eigentliche Retrotranslokation von Proteinen werden mehrere Kanäle bzw. Poren in Betracht gezogen. Hierzu gehören der Sec61-Komplex, Mitglieder der Derlin-Proteinfamilie oder die E3-Ubiquitin-Ligasen Hrd1 und gp78 (Abbildung 1.2). Derlin-1 und Derlin-2 zeigen eine enge Assoziation mit Ubiquitin-Ligasen wie Hrd1, gp78 und RNF5 sowie anderen ERAD-Faktoren,

wodurch große Komplexe entlang der ER-Membran entstehen. Über diese Komplexe erfolgt wahrscheinlich die Kopplung des Substrates, dessen Insertion in die ER-Membran und die anschließende Ubiquitinierung beim Erscheinen im Zytosol^{7,9,15,16}.

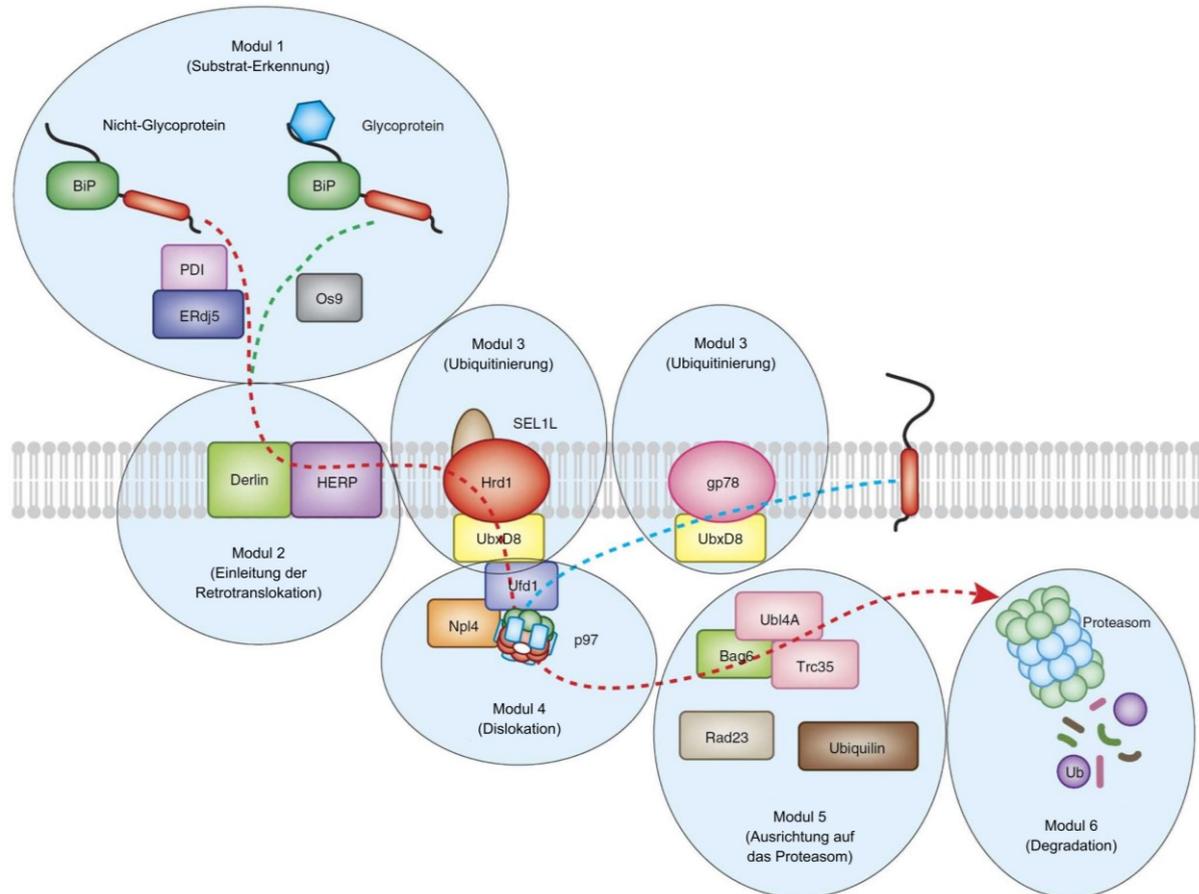


Abbildung 1.2: ERAD fehlgefalteter sekretorischer Proteine. Zu den vier Hauptschritten der ERAD gehören die Substraterkennung, die Retrotranslokation in das Zytosol, die Ubiquitinierung und die proteasomale Degradation. (modifiziert nach Christianson und Ye, 2014)

Nach bzw. parallel zur Retrotranslokation erfolgt die Ubiquitinierung der ERAD-Substrate durch eine Enzymkaskade. Dabei aktiviert ein E1-Enzym ein Ubiquitin-Molekül durch kovalente Bindung an einen Cystein-Rest. Bei Ubiquitin handelt es sich um ein 76 Aminosäuren umfassendes und 8,5 kDa großes Polypeptid¹⁷. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym übertragen. Dieses bindet daraufhin eine Ubiquitin-Ligase (E3), welche wiederum ein Zielprotein bindet und das Ubiquitin von der E2 üblicherweise auf einen Lysin-Rest des Zielproteins überträgt. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, wobei darauffolgende Ubiquitin-Moleküle an Lysine des vorher übertragenen Ubiquitins gebunden werden. Es kommt zur Ausbildung von Polyubiquitin-Ketten am Zielprotein, die vom Proteasom erkannt werden können. Nachdem das ERAD-Substrat das Zytosol erreicht hat und ubiquitiniert wurde, erfolgt die vollständige Verlagerung des Polypeptids ins

Zytosol, um die Retrotranslokation abzuschließen. Die Energie hierfür wird von der ATPase p97 (VCP) geliefert. Sofort nach der Retrotranslokation der ERAD-Substrate müssen diese degradiert werden, um Aggregationen im Zytosol zu vermeiden. Es wird angenommen, dass Retrotranslokation und proteasomale Degradation eng miteinander gekoppelt sind, da eine Inhibition der proteasomalen Aktivität zur Stabilisierung der meisten ERAD-Substrate im ER-Lumen führt. Eine Erklärung hierfür liefert ein Modell, in dem einige VCP- und Proteasom-assoziierten Faktoren ERAD-Substrate von VCP zum Proteasom transportieren. Im finalen Schritt der ERAD erfolgt die proteolytische Degradation der Substrate in den Proteasomen^{7,9,15}.

Proteasomale Degradation

Un- bzw. fehlgefaltete Proteine, welche die Qualitätsprüfung im ER (ERQC-System, *ER quality control system*) nicht bestehen, werden zur Degradation markiert und über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Hierzu werden die Proteine polyubiquitiniert und dem 26S-Proteasom zugeführt¹⁷. Die Polyubiquitinkette wird vom Proteasom gebunden, woraufhin das Protein entfaltet, deubiquitiniert, in das zylindrisch geformte Innere des Proteasoms geleitet und dort proteolytisch gespalten wird (Abbildung 1.3). Die entstandenen Oligopeptide werden über Peptidasen im Zytoplasma zu Aminosäuren degradiert bzw. zur Antigenpräsentation verwendet^{18,19}.

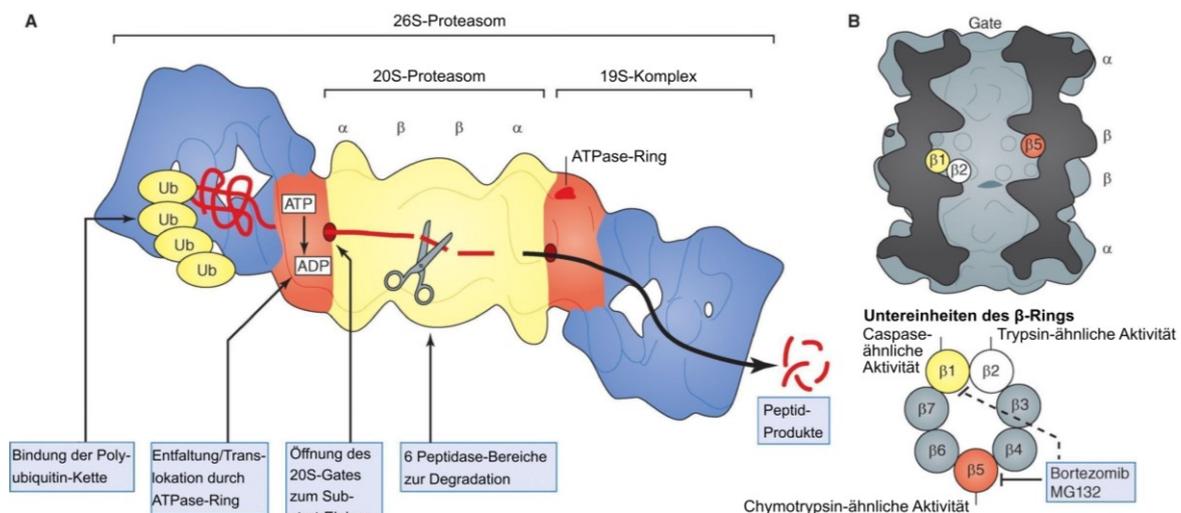


Abbildung 1.3: Struktur und Funktion des 26S-Proteasoms. (A) Struktur und Komponenten des 26S-Proteasoms. (B) Lokalisation der aktiven Zentren im Inneren der zylindrischen 20S-Untereinheit. Beide β-Ringe enthalten jeweils drei unterschiedliche proteolytische Aktivitäten. Die proteasomalen Inhibitoren Bortezomib (BTZ) und MG132 inhibieren v.a. die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und in hohen Konzentrationen auch die Caspase-ähnliche Aktivität innerhalb der β-Untereinheit. (modifiziert nach Goldberg, 2012)

Das 26S-Proteasom ist ein im Zytosol und im Nukleus lokalisierter Proteinkomplex, der aus einer zylindrischen, multikatalytischen 20S-Untereinheit besteht, welche von zwei 19S-Untereinheiten flankiert wird²⁰. Die 20S-Untereinheit besteht aus vier gestapelten Ringen, von denen jeder sieben Untereinheiten enthält. Jeweils beide äußeren nicht-katalytischen α -Ringe und beide inneren katalytischen β -Ringe sind identisch aufgebaut. Die katalytische Aktivität der β -Ringe befindet sich auf der luminalen Seite der Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$. Die $\beta 1$ -Untereinheit spaltet Peptide nach sauren Aminosäuren und besitzt Caspase-ähnliche Aktivität. Die $\beta 2$ -Untereinheit spaltet Peptide nach basischen Aminosäuren und trägt damit Trypsin-ähnliche Aktivität, während die $\beta 5$ -Untereinheit nach hydrophoben Aminosäuren spaltet und dem 20S-Proteasom damit Chymotrypsin-ähnliche Aktivität verleiht^{18,21}.

Die regulatorische 19S-Untereinheit besteht wiederum aus 18 Untereinheiten, von denen acht in der an die 20S-Untereinheit angrenzenden Basis lokalisiert sind. Sechs dieser acht Untereinheiten sind in einem Ring angeordnete ATPasen, welche zu degradierende Proteine binden, entfalten und in den Zylinder der 20S-Untereinheit verlagern. Der äußere Deckel der 19S-Untereinheit bindet die Polyubiquitin-Kette und deubiquitiniert zu degradierende Proteine^{18,21}.

Durch Verwendung proteasomaler Inhibitoren können die katalytischen Funktionen des Proteasoms spezifisch inhibiert werden. Beispielsweise sind MG132 und Bortezomib (BTZ) kompetitive, reversible Inhibitoren v.a. der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität, inhibieren in hohen Konzentrationen aber auch die Caspase-ähnliche Aktivität (vgl. Abbildung 1.3)^{19,22}. Bei Clasto-Lactacystin- β -lacton (CLC) bzw. dessen Vorstufe Lactacystin handelt es sich um irreversible Inhibitoren der drei proteasomalen Aktivitäten, bevorzugt aber der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität^{21,23}. Die Inhibition des Proteasoms führt zu einer negativen Feedback-Regulation, da auch der Abbau der Transkriptionsfaktoren Nrf1 und Nrf2 vermindert ist. Diese induzieren wiederum die Expression der proteasomalen Untereinheiten²⁴. Proteasomale Inhibition führt außerdem zu einer Erhöhung der Proteinfaltungskapazität in der Zelle durch die Hochregulation von Chaperonen wie HSP70, HSP90 oder BIP, wodurch proteasomale Inhibitoren auf unterschiedlichem Weg die Proteostase beeinflussen²⁵.

1.1.3 Die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR)

Die durch z. B. *missense*-Mutationen ausgelöste Akkumulation fehlgefalteter Proteine und der damit verbundene ER-Stress führen zur Aktivierung der UPR. Dadurch werden die Faltungskapazitäten im ER erhöht bzw. die ERAD fehlgefalteter und akkumulierter Proteine eingeleitet. Ist die Proteinlast im ER und der damit verbundene ER-Stress zu stark, führt dies zur UPR-

induzierten Apoptose. Die UPR besteht aus drei Signalwegen, welche durch jeweils ein transmembranäres Sensorprotein im ER aktiviert werden (Abbildung 1.4). Dabei handelt es sich um die *protein-kinase R-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK), das *inositol requiring enzyme 1* (IRE1) und der *activating transcription factor 6* (ATF6)^{9,26}.

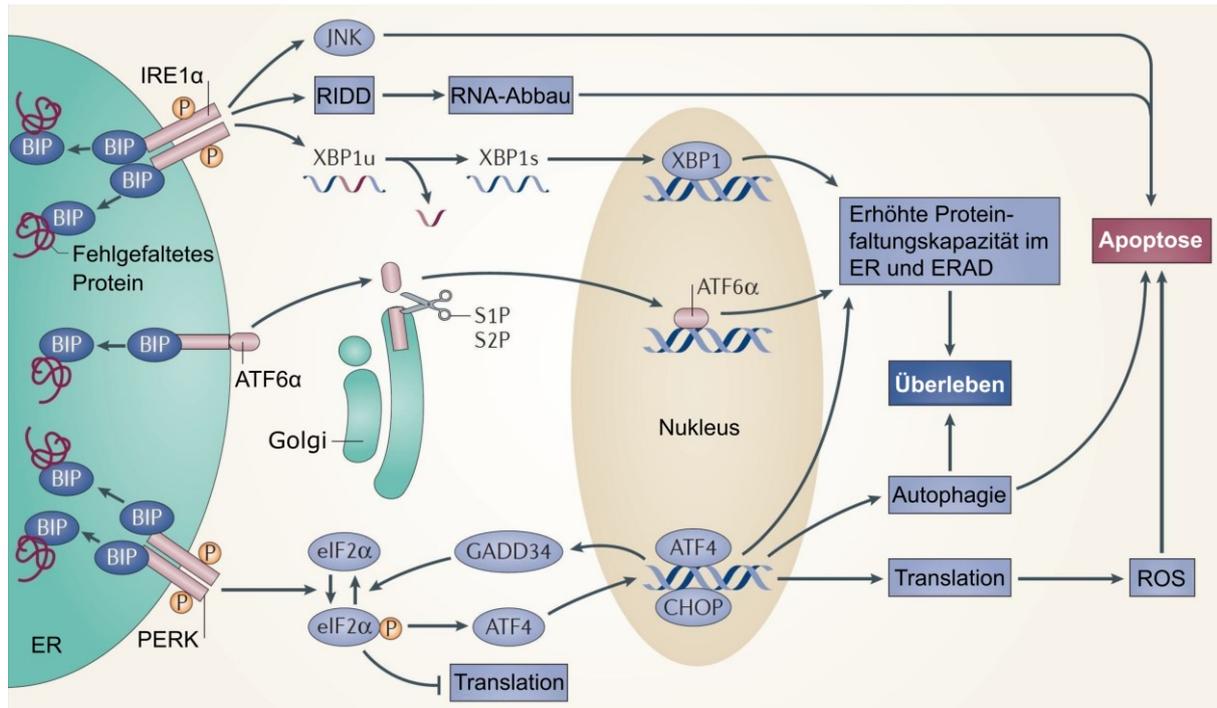


Abbildung 1.4: Aktivierung und Ablauf der Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR). Beim Auftreten von ER-Stress kommt es zur Bindung von BIP an fehlgefaltete Proteine und damit zur Freigabe und Aktivierung dreier Sensorproteine. Dies wiederum bewirkt die Aktivierung von drei unabhängigen Signalwegen der UPR. Im Resultat wird die globale Proteinsynthese verringert und zeitgleich werden Proteinfaltung, -transport und ERAD verstärkt. Sollte das Problem des ER-Stresses über längere Zeit nicht gelöst werden, geht die Zelle in Apoptose. JNK: JUN N-terminale Kinase, P: Phosphorylierung; RIDD: *regulated IRE1-dependent decay*, ROS: reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*), XBP1s: transkriptionell aktives XBP1, XBP1u: ungespleißtes XBP1. (modifiziert nach Wang und Kaufmann, 2014)

Unter stressfreien Bedingungen bindet das Chaperon BIP auf der luminalen Seite im ER an PERK, IRE1 und ATF6 und verhindert so deren Aktivierung. ER-Stress bewirkt die stärkere Bindung von BIP an ungefaltete bzw. fehlgefaltete Proteine. BIP löst daher die Bindung zu PERK, IRE1 und ATF6, was in der Aktivierung der drei UPR-Signalwege resultiert. Die Freigabe von PERK führt zur Ausbildung von Homodimeren und deren Autophosphorylierung. Auf diese Weise aktiviertes PERK bewirkt die Abschwächung der globalen Translation innerhalb der Zelle unter gleichzeitig verstärkter Translation von ATF4. Dieses wiederum induziert die

Expression von Genen der ER-Stress-Antwort, u. a. *C/EBP homologous protein* (CHOP), welches für ER-Stress-vermittelte Apoptose verantwortlich ist. Zu frühen Zeitpunkten des ER-Stresses induziert die PERK-Aktivierung die Expression von miR-211, welche die CHOP-Transkription unterdrückt. Bei chronischem ER-Stress führt die dauerhafte PERK-Aktivierung zu Apoptose^{9,26,27}.

Nach BIP-Freisetzung von ATF6 wandert dieses in den Golgi-Apparat und wird dort zu einem aktiven Transkriptionsfaktor prozessiert. Gespaltenes ATF6 induziert die Expression von Genen, die den Import, die Faltung bzw. die Degradation fehlgefalteter Proteine regulieren. Zur Zeit ist nicht bekannt, ob ATF6 in der ER-Stress-vermittelten Apoptose involviert ist^{26,27,28}. Mit anhaltendem Stresssignal erfolgt die Aktivierung des zeitlich nachgeschalteten IRE1-Zweigs der UPR²⁹, ebenfalls durch ER-Stress-vermittelte BIP-Freigabe, Oligomerisierung und Autophosphorylierung. Aktiviertes IRE1 spaltet *Xbp1*-mRNA, was zur Synthese der Xbp1s-Isoform führt. Diese induziert die Expression von Genen, die für die Faltung, den Transport bzw. die Degradation von Proteinen verantwortlich sind^{9,27}.

1.2 Bildung und Transport lysosomaler Proteine

Lysosomen sind membranbegrenzte Zellorganellen, welche auf die Degradation intrazellulärer bzw. endozytotisch aufgenommener Makromoleküle spezialisiert sind³⁰. Das lysosomale Lumen hat einen pH-Wert von ca. 5 und enthält mehr als 50 verschiedene saure Hydrolasen mit einem pH-Optimum unter 6, zu denen u. a. Glykosidasen, Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen und Sulfatasen gehören^{6,31}.

Bei den lysosomalen Enzymen handelt es sich um Glykoproteine, deren Biosynthese zunächst der von sekretorischen Proteinen entspricht. Die Trennung vom sekretorischen Signalweg erfolgt im Golgi-Apparat, größtenteils durch die Bindung von Mannose-6-phosphat (M6P)-Resten an einer oder mehreren Oligosaccharid-Seitenketten der lysosomalen Glykoproteine (Abbildung 1.5). Im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) erfolgt die Bindung der M6P-Reste an entsprechende M6P-Rezeptoren (M6PR) und die Clathrin-abhängige Abschnürung von Vesikeln mit M6PR-Ligand-Komplexen^{6,31}. Diese fusionieren mit Endosomen. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, an welcher Stelle der Transport lysosomaler Vorläuferproteine mit dem endozytotischen Signalweg zusammenläuft. Die Transportvesikel des TGN liefern ihren Inhalt entweder direkt an die späten Endosomen oder dieser Vorgang verläuft über frühe Endosomen³¹. Auf Grund des in den späten Endosomen vorherrschenden niedrigeren pH-Wertes dissoziieren

M6PR und Ligand. Die Hydrolase transloziert daraufhin ins Lysosom während der M6PR zur erneuten Verwendung entweder zum TGN oder zur Zellmembran transportiert wird³².

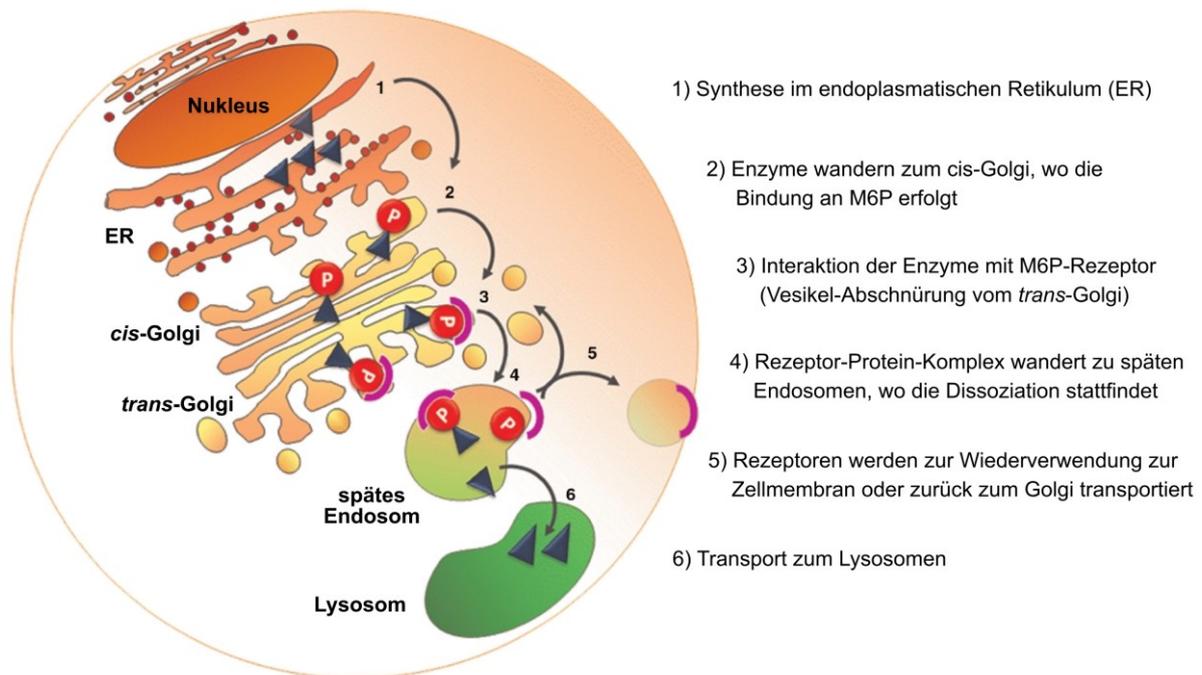


Abbildung 1.5: M6PR-abhängiger Transport von Enzymen ins Lysosom. Lysosomale Enzyme werden cotranslational in das ER und weiter in den Golgi-Apparat transportiert. Dort erfolgt die Anbindung von M6P, woraufhin die Glykoproteine M6PR-vermittelt in späte Endosomen und weiter zu den Lysosomen transportiert werden. (modifiziert nach Filocamo und Morrone, 2011)

Der Weg der lysosomalen Enzyme vom späten Endosom zum Lysosom ist noch nicht vollständig geklärt, es werden aber verschiedene Optionen diskutiert. Ein mögliches Modell beschreibt die Entwicklung von Lysosomen als Reifungsprozess aus späten Endosomen. Eine weitere Möglichkeit beinhaltet die Bildung von Transport-Vesikeln mit lysosomalen Enzymen und lysosomalen Membran-Proteinen, welche mit bereits existierenden Lysosomen fusionieren. Eine dritte Theorie schlägt vor, dass späte Endosomen und bereits existierende Lysosomen zeitweilig fusionieren (*“kiss-and-run“-Theorie*), um Inhalte auszutauschen. Es ist ebenfalls denkbar, dass beide Organellen zu einer transienten Hybrid-Organelle verschmelzen, woraufhin es zur Neubildung dicht gepackter Lysosomen kommt³¹. Ein Teil der phosphorylierten lysosomalen Enzyme im TGN bindet nicht an den M6PR und wird sezerniert. Die inaktiven Proenzyme können daraufhin an den M6PR auf der Außenseite der Zellmembran binden, endozytotisch aufgenommen und so den Lysosomen zugeführt werden².

1.3 Lysosomale Speichererkrankungen

Unter lysosomalen Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorders*, LSDs) versteht man eine Gruppe von mehr als 50 verschiedenen genetischen Stoffwechselerkrankungen³². In der Regel sind LSDs monogenetisch, wobei für die meisten LSDs eine Vielzahl verschiedener Mutationen im gleichen Gen beschrieben wurden. Hierbei können *missense*- oder *nonsense*-Mutationen, Spleißstellen-Mutationen, Deletionen oder Insertionen auftreten³³. Die meisten LSDs werden durch verminderte bzw. fehlende Aktivität eines spezifischen lysosomalen Enzyms verursacht³². In einigen Fällen resultieren LSDs aus defekten nicht-enzymatischen lysosomalen Proteinen oder auch nicht-lysosomalen Proteinen, welche im ER, dem Golgi-Apparat oder im endosomalen Signalweg lokalisiert und an der Biogenese von Lysosomen beteiligt sind³⁴. Allen LSDs gemein ist der fehlende Abbau bzw. Transport bestimmter Metaboliten und deren fortschreitende Akkumulation in den Lysosomen, was wiederum zu generalisierten Beeinträchtigungen von Zellen und Geweben und damit einem multisystemischen Krankheitsverlauf führt^{35,32}.

LSDs können auf Grundlage verschiedener Faktoren eingruppiert werden. Eine Möglichkeit der Klassifikationen basiert auf der Charakterisierung des Substrates, welches durch die verminderte Aktivität des entsprechenden Enzyms akkumuliert. Dabei werden u. a. Mukopolysaccharidosen (MPS, z. B. Morbus Hunter), Sphingolipidosen, Oligosaccharidosen (z. B. α -Mannosidose), die Glykogenose Morbus Pompe und die Lipidose Morbus Wolman unterschieden. Im Falle der Sphingolipidosen kommt es zur Akkumulation nicht-degradierter Sphingolipide. Zu dieser Gruppe an LSDs gehört u. a. Morbus Fabry^{32,34}.

1.4 Morbus Fabry

Morbus Fabry (OMIM 301500) ist eine X-chromosomal vererbte, lysosomale Speichererkrankung. Sie wurde 1898 erstmalig durch die Dermatologen William Anderson und Johann Fabry beschrieben³⁶. Neuesten Studien zufolge ist Morbus Fabry wahrscheinlich die häufigste lysosomale Speichererkrankung und hat eine Inzidenz von 1:1.250 bis 1:11.000^{37,38}.

1.4.1 Pathophysiologie

Ursache des Morbus Fabry sind Mutationen des *GLA*-Gens, welche zu fehlender oder verminderter Aktivität des lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase A (α -Gal A, EC3.2.1.22) führen³⁹.

Das *GLA*-Gen befindet sich am Genlocus Xq22, umfasst sieben Exons und kodiert für ein 429 Aminosäuren langes Vorläufer-Protein (51 kDa) der α -Gal A, welches zu einem 398 Aminosäuren umfassenden Glykoprotein prozessiert wird (46 kDa)⁴⁰. Dieses wiederum verbindet sich mit einem weiteren α -Gal A-Molekül zum aktiven Homodimer. Die α -Gal A spaltet terminale α -D-Galaktosyl-Reste von Glykolipiden und Glykoproteinen^{41,42}. Mehr als 900 Genvarianten wurden bisher beschrieben (Human Gene Mutation Database, HGMD Professional, Version 2017.4). Die Mutationen beinhalten sowohl *missense*- und *nonsense*-Mutationen als auch Umlagerungen und Spleißdefekte. Die Anzahl an *missense*-Mutationen des *GLA*-Gens beträgt derzeit ca. 467⁴³. Diese resultieren in Fehlfaltungen und einer beeinträchtigten Prozessierung des Enzyms im ER, was zu einem Rückstau des Enzyms im ER und einer ERAD des prämaternen Proteins führt⁴⁴. Eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit der α -Gal A bewirkt eine fortschreitende Ablagerung von Globotriaosylceramid (Gb3, vgl. Abbildung 1.6), dessen deacylierten Derivats Globotriaosylsphingosin (lyso-Gb3)⁴⁵, Galabiosylceramiden und neutralen Glykosphingolipiden in Lysosomen, anderen zellulären Kompartimenten sowie dem Extrazellularraum^{46,47,48}.

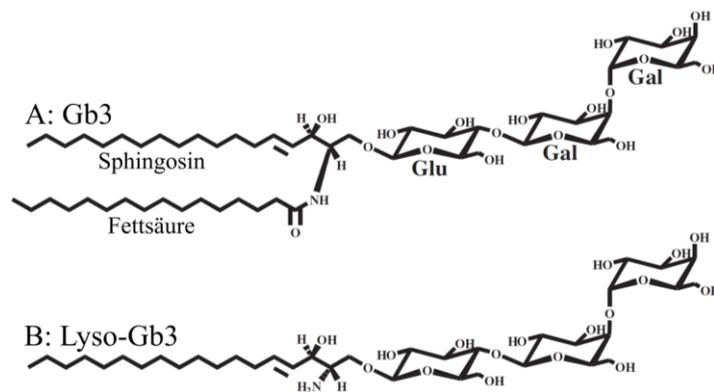


Abbildung 1.6: Struktur von Gb3 und lyso-Gb3. Bei Globotriaosylceramid (Gb3) und dessen deacylierten Derivats Globotriaosylsphingosin (lyso-Gb3) handelt es sich um Substrate der α -Gal A. (modifiziert nach Boutin et al. 2012)

Die entsprechenden Ablagerungen sind dabei in verschiedenen Gewebearten zu finden, v.a. in vaskulären Endothelzellen, in Epithelzellen und Podozyten⁴⁸. Zunehmende Gb3-Ablagerungen korrelieren dabei nicht notwendigerweise mit der klinischen Manifestation des Morbus Fabry. Die Krankheitszeichen werden wahrscheinlich nicht unmittelbar von Gb3-Ablagerungen verursacht³⁹. Dagegen wird lyso-Gb3 eine ursächliche Rolle in der Pathophysiologie von Morbus Fabry zugeschrieben⁴⁹. In Konzentrationen, welche im Plasma von symptomatischen Morbus Fabry-Patienten auftreten, induziert lyso-Gb3 die Proliferation von glatter Muskulatur *in vitro*

und fördert Gb3-Ablagerungen. Letzteres basiert wahrscheinlich auf der nachweislichen Inhibition der α -Gal A-Aktivität durch lyso-Gb3³⁹. Denkbar ist auch, dass lyso-Gb3 aus dem Blutplasma in die Zellen aufgenommen, dort acyliert und in extralysosomales Gb3 umgewandelt wird, welches unzugänglich für lysosomale α -Gal A und damit auch für eine Enzymersatztherapie (ERT) ist³⁹. Die lyso-Gb3-Konzentration im Blutserum, -plasma oder Vollblut dient als einfach zu messender diagnostischer und Verlaufs-Biomarker zur Überwachung des Therapieerfolges. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass lyso-Gb3-Level eine Aussage über die klinische Relevanz neuer *GLA*-Mutationen liefern^{48,50}. Lyso-Gb3-Werte können außerdem nützlich sein, um die Notwendigkeit einer Therapie bei heterozygoten Patientinnen zu beurteilen⁴⁸.

1.4.2 Symptome und Diagnose

Abhängig von der Art der *GLA*-Mutation und vom Zeitpunkt der Manifestation unterscheidet man den klassischen (*early-onset*, Typ I) und den atypischen (*late-onset*, Typ II) Phänotyp. Hemizygot männliche Patienten mit klassischem Verlauf weisen kaum bzw. keine Aktivität von α -Gal A auf und zeigen entsprechend vaskuläre endotheliale Gb3-Ablagerungen⁴⁸. Klinische Symptome beinhalten Akroparästhesien, Hornhaut- und Linsentrübungen, Angiokeratome, gastrointestinale Störungen (Diarrhoe, Krämpfe, Übelkeit, Erbrechen und abdominale Schmerzen) sowie eine Hypohidrose. Durch die zunehmende Ablagerung an Glykosphingolipiden kommt es zur Kardiomyopathie, v.a. zur linksventrikulären Hypertrophie. Außerdem treten im erwachsenen klassischen Morbus Fabry-Patienten zerebrovaskuläre Erkrankungen (u.a. Schlaganfälle) auf sowie Nierenschäden bis hin zu Nierenversagen. Weitere mögliche Symptome sind Hörverlust, obstruktive Lungenerkrankung, Müdigkeit, Hitzeintoleranz und Arrhythmien^{46,48,51}.

Männliche Morbus Fabry-Patienten mit atypischem Verlauf besitzen eine Restaktivität an α -Gal A und zeigen keine frühen klinischen Manifestationen, wie sie in klassischen Verläufen auftreten. Häufig treten in der vierten bis sechsten Lebensdekade ähnliche Symptome wie in klassischen Morbus Fabry-Patienten auf, u. a. Herzerkrankungen, Nierenprobleme und zerebrovaskuläre Erkrankungen⁴⁸. Bei heterozygoten weiblichen Morbus Fabry-Patientinnen kommt es auf Grund der während der Embryonalentwicklung auftretenden randomisierten X-Chromosom-Inaktivierung zu einer starken Genotyp/Phänotyp-Variabilität. Dabei können die Patientinnen völlig symptomfrei sein oder den klassischen Morbus Fabry-Phänotyp ausbilden⁴⁶.

Durch die heterogenen und oft unspezifischen Symptome des manifestierten Morbus Fabry, bleibt dieser oft undiagnostiziert^{46,52}. Die Diagnose von Patienten mit atypischem Mor-

bus Fabry-Phänotyp erfolgt meist durch Screenings innerhalb von Dialysezentren, Kardiologien oder Einrichtungen für die Behandlung von Schlaganfällen und seit neuerem durch Neugeborenen-Screenings⁴⁸. In männlichen Morbus Fabry-Patienten kann die Erkrankung zuverlässig durch eine Bestimmung der deutlich reduzierten oder fehlenden Aktivität von α -Gal A in Blutplasma, peripheren Leukozyten oder Trockenblut (*dried blood spots*, DBS) diagnostiziert und durch eine Sequenzierung des *GLA*-Gens bestätigt werden. Ein neueres diagnostisches Verfahren, um den Phänotyp männlicher Morbus Fabry-Patienten zuverlässig zu klassifizieren, ist die Messung von lyso-Gb3 in Blut oder Urin⁵². Die Aktivität von α -Gal A in heterozygoten Patientinnen ist sehr variabel innerhalb eines Spektrums zwischen Enzymmangel und normaler Enzymaktivität. Mindestens 40% der bestätigten heterozygoten Trägerinnen von *GLA*-Mutationen weisen normale bis leicht reduzierte Enzymaktivitäten auf. Lyso-Gb3 hat sich als nützlicher diagnostischer Marker für behandlungsbedürftige heterozygote Patientinnen erwiesen^{50,52}. Bei Verdacht auf Heterozygotie kann eine familiäre Mutation über die Sequenzierung des *GLA*-Gens diagnostiziert werden⁴⁸. Der Nutzen der genetischen Testung von Patienten mit Risiko oder Verdacht auf Morbus Fabry ist jedoch durch das Auftreten von benignen *missense*-Mutationen beeinträchtigt⁵².

1.4.3 Therapiemöglichkeiten

Seit 2001 steht die ERT als konventionelle Therapiemethode des Morbus Fabry zur Verfügung⁴⁴. Hierbei erhalten an Morbus Fabry erkrankte Patienten in periodischen Zeitintervallen eine intravenöse Gabe rekombinant hergestellter α -Gal A⁵³. Das Enzym wird dabei über M6P-Rezeptoren internalisiert und gelangt so über den endozytotischen Transportweg in die Lysosomen⁵⁴. Die ERT verringert die Gb3-Akkumulationen in Urin, Plasma und im Gewebe⁵¹. Obwohl die ERT zur gewünschten Beseitigung von Gb3 aus dem Endothel führt, sind etliche klinische Effekte, wie die Stabilisierung der Nierenfunktion und eine Verbesserung der linksventrikulären Hypertrophie, nicht so robust wie erwartet³⁹. Dies könnte an der begrenzten Penetration in die entsprechenden Gewebe liegen. So wird rekombinante α -Gal A z. B. nur schwer vom Nierengewebe aufgenommen, was die Behandlung limitiert⁵⁵. Zudem kann es zu Immunreaktionen durch ERT-Gabe kommen, die zur Bildung von Immunglobulin G- (IgG)-Antikörpern führen, was die Effektivität der Behandlung einschränken kann⁵⁶. Weiterhin fallen mit 250.000 € pro Patient und pro Jahr hohe Kosten für die ERT an⁵⁷.

Die klinische Zulassung von 1-Deoxygalactonojirimycin (DGJ; Freiname: Migalastat; Handelsname: Galafold), eines oral verfügbaren pharmakologischen Chaperons (PC), gehört zu den jüngsten Fortschritten in der Therapie des Morbus Fabry⁵⁸. Hierbei handelt es sich um einen

reversiblen kompetitiven Inhibitor der α -Gal A. DGJ ist ein Iminozucker (vgl. Abbildung 1.7), welcher die α -Galaktose z. B. des Gb3 imitiert und an das aktive Zentrum der α -Gal A bindet. Dies fördert die Faltung und Stabilität des Enzyms (*active-site-specific chaperone*)⁵⁹, wodurch weniger α -Gal A der ERAD zugeführt wird⁶⁰ und stattdessen vermehrt α -Gal A vom ER zum Golgi-Apparat und weiter in die Lysosomen transportiert werden kann⁵⁹. Im Lysosomen angelangt, verursacht der dort vorherrschende saure pH-Wert und die Verfügbarkeit natürlicher Substrate der α -Gal A die Dissoziation von DGJ und Enzym, wodurch letzteres seine katalytische Funktion ausüben kann⁵³. DGJ kommt daher nur dem Teil der an Morbus Fabry erkrankten Patienten zu Gute, welche entsprechend für DGJ zugängliche *missense*-Mutationen tragen⁴⁴. Die Ansprechbarkeit der verschiedenen *GLA*-Mutationen auf DGJ ist im *European Public Assessment Report* der EMA (<http://www.ema.europa.eu/ema/>) gelistet. Patienten mit dieser Genetik können gemäß der Zulassung für das Medikament innerhalb der Europäischen Union mit DGJ behandelt werden.

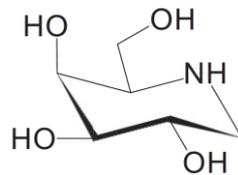


Abbildung 1.7: Struktur von DGJ. DGJ ist ein Iminozucker und imitiert die α -Galaktose von Substraten der α -Gal A. Es bindet an das aktive Zentrum der α -Gal A, wodurch deren Stabilität, Faltung und der Weitertransport in die Lysosomen verbessert wird. (Quelle: Ishii et al. 2009)

Ein großer Vorteil der DGJ-Behandlung ist, dass es sich bei dem Wirkstoff um eine niedermolekulare Verbindung (*small molecule*) handelt, welche leichter in alle Gewebe vordringt als die ERT⁶¹. Dabei verlängert DGJ die Halbwertszeit der α -Gal A sowohl im Mausmodell als auch im Menschen. Die DGJ-Behandlung führt zu einem verstärkten Abbau von Gb3 und kann in Synergie mit einer ERT eingesetzt werden bzw. als Einzelbehandlung für spezifische *missense*-Mutationen. Im Mausmodell reduzierte die orale Gabe von DGJ Gb3-Ablagerungen in den Nieren, dem Herzen und in der Haut von transgenen Mäusen, welche die DGJ-responsive p.R301Q-Mutation tragen. Im Patienten wurde die orale Anwendung von DGJ mit einer Dosis von 150 mg gut vertragen, welche zur Erhöhung der Aktivität von α -Gal A und zur Abnahme von lyso-Gb3 im Plasma der Mehrzahl an Patienten mit DGJ-responsiven *GLA*-Mutationen führte^{43,62}.

1.4.4 Proteostase-Regulatoren als neuer Therapieansatz

Lysosomale Speichererkrankungen werden durch den Funktionsverlust eines mutanten lysosomalen Enzyms verursacht. Dieses häufig noch funktionale Protein kann nicht oder nur unvollständig gefaltet werden, was zur verstärkten ERAD und verminderten Konzentration des Enzyms im Lysosomen führt²⁵. Etliche niedermolekulare Verbindungen sind in der Lage die Proteostase zu beeinflussen und damit die Synthese, Faltung bzw. den Abbau fehlgefalteter Proteine zu regulieren, um so die Proteostase wiederherzustellen. Viele dieser Substanzen werden bereits als potenzielle Behandlungsmöglichkeiten für Proteinfaltungserkrankungen bzw. mit Proteinaggregation assoziierten Erkrankungen in Betracht gezogen, insbesondere lysosomale Speichererkrankungen^{25,63,64,65,66} bzw. Mukoviszidose⁶⁷, Alzheimer⁶⁸ oder Retinitis pigmentosa^{69,70}.

Mittlerweile konnten Substanzen verschiedener Klassen mit unterschiedlichen Primärfunktionen als Proteostase-Regulatoren (PRs) identifiziert werden. Während die verstärkte Degradation fehlgefalteter Proteine⁷¹ u. a. bei Amyloidosen ausgenutzt werden kann, um die Sekretion und extrazelluläre Aggregation destabilisierter Proteine zu vermindern⁷¹, können PRs im Hinblick auf LSDs die Faltungskapazität der Zelle erhöhen²⁵ und die Degradation aberranter Proteine vermindern⁷². Beispielsweise reduzieren PRs die ERAD fehlgefalteter lysosomaler Proteine durch eine proteasomale Inhibition. U. a. erhöhen die proteasomalen Inhibitoren MG132 und Bortezomib (BTZ) die Proteinmenge bzw. Aktivität mutanter lysosomaler Proteine in LSDs wie Morbus Pompe^{63,73} bzw. Morbus Niemann-Pick-Typ C^{35,66}. BTZ (Handelsname: Velcade) ist bereits für die Behandlung von malignen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom⁶³ und dem Mantelzelllymphom⁷⁴ klinisch zugelassen. Neben der proteasomalen Inhibition kann die ERAD u. a. auf den Ebenen der Retrotranslokation (z. B. durch Inhibition der p97-ATPase (VCP) mittels Eeyarestatin I (EerI)) und der Substraterkennung (z. B. durch Inhibition der ER-Mannosidase I mittels Kifunensin) inhibiert werden, was ebenfalls die Aktivität lysosomaler Enzyme steigern kann⁶⁴. Da mutante α -Gal A, wie auch andere aberrante lysosomale Enzyme, verstärkt vorzeitig degradiert wird⁴⁴, stellt die Inhibition der ERAD einen sinnvollen Ansatz dar, um die Enzymmenge und damit die lysosomale Aktivität der α -Gal A zu erhöhen.

Die Signalwege des Proteostase-Netzwerkes sind stark mit Genregulationen verbunden^{4,75}, was zellspezifische transkriptionelle Muster als Stressantwort hervorruft⁷¹. Der Zusammenhang zwischen der Expression von Proteostasegenen und Proteinfaltungserkrankungen wird von einem wachsenden Forscherkreis untersucht^{3,11,25,26,64,76,77,78,79,80,81}. Dies unterstreicht die Bedeutung von Transkriptomdaten für das bessere Verständnis von Proteinfaltungserkrankungen, wie dem Morbus Fabry, und die Optimierung von

Behandlungsmöglichkeiten. Der Wirkmechanismus vieler PRs beinhaltet neben deren bekannten primären biochemischen und physiologischen Effekten auch signifikante Einflüsse auf die Transkription Proteostase-assoziiierter Gene. Beispielsweise erhöht die Behandlung von Fibroblasten von Morbus Gaucher-Patienten mit dem Ryanodin-Rezeptor-Hemmstoff Dantrolen die Expression einer Reihe von ER-assoziierten Chaperonen⁷⁶. Der reversible proteasomale Inhibitor MG132 zeigt als PR in Morbus Gaucher einen ausgeprägten Effekt auf die Expression von Chaperonen sowie UPR- und ERAD-Komponenten⁷⁶. Beide Substanzen erhöhen die Menge an Glucocerebrosidase (GCCase) in der Zelle und verstärken deren Transport aus dem ER in den Golgi-Apparat. Es wird daher postuliert, dass der Einfluss der Substanzen auf die Expression Proteostase- und besonders Proteinfaltungs-assoziiierter Gene einen Teil des Wirkmechanismus, der zur Verbesserung der Prozessierung der mutanten GCCase in der Zelle führt, darstellt⁷⁶. Die detaillierte Charakterisierung scheinbar sekundärer Effekte, die den Einfluss auf das Transkriptom beinhalten, kann daher wichtige mechanistische Einblicke in die Wirkungsweise von PRs liefern, die in der Lage sind, Proteinfehlfaltungen zu verbessern.

Immer häufiger kommen Kombinationsbehandlungen zum Einsatz, um Nebenwirkungen zu reduzieren und synergistische Wirkungen verschiedener Substanzen zu erzielen^{76,82,83,84}. Beispielsweise zeigt die Kombination von PCs mit PRs synergistische Effekte bei der Enzymaktivitätserhöhung mutanter lysosomaler Enzyme. Dabei erfolgt eine PR-induzierte UPR-Aktivierung, welche den Pool an mutantem Enzym erhöht. Dieses kann wiederum vom PC gebunden, stabilisiert und damit vermehrt dem Transport zu den Lysosomen zugeführt werden²⁵. In Hinblick auf Morbus Fabry bewirkte das als Hustenlöser zugelassene Ambroxol (ABX), welches experimentell als pharmakologisches Chaperon bei Morbus Gaucher verwendet wird, in Kombination mit DGJ eine Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher ungeklärt und wurde ausschließlich im Überexpressionssystem untersucht⁸⁵. Es ist daher sinnvoll, die bisherigen Analysen zur kombinierten Behandlung mutanter α -Gal A weiter auszubauen und auf die endogene Enzymaktivität zu übertragen.

In Bezug auf Morbus Fabry könnten PRs solchen Patienten zu Gute kommen, die *missense*-Mutationen tragen und deren α -Gal A in Konformation und Stabilität beeinträchtigt ist, aber dennoch vollständige oder zumindest partielle Aktivität besitzt¹⁴. Die durch *missense*-Mutationen verursachte Fehlfaltung und vorzeitige Degradation des mutanten Enzyms konnte in der Zellkultur zwar durch pharmakologische Intervention mit PRs vermindert werden^{14,85}, jedoch beziehen sich bisherige Daten vorrangig auf Überexpressionsmodelle und die Effektivität von PRs in Bezug auf die Wiederherstellung endogener lysosomaler Enzymaktivität wurde nur wenig in Patientenzellen untersucht⁸⁶.

1.5 Zielstellungen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, niedermolekulare Proteostase-regulierende Substanzen (PRs) zu identifizieren und zu charakterisieren, welche die Maturierung mutanter α -Gal A positiv beeinflussen, deren vorzeitigen Abbau über die ERAD vermindern und so die Pathophysiologie des Morbus Fabry verbessern. Da sich bisherige Daten vorrangig auf Überexpressionsmodelle beschränken, sollte in der vorliegenden Arbeit die Effektivität von PRs in Bezug auf die Wiederherstellung endogener α -Gal A in einem Patienten-abgeleiteten Zellkultursystem untersucht werden. Um dies zu erreichen, wurden folgende Etappenziele angestrebt:

- die Beschreibung der Pathophysiologie der verwendeten, von Morbus Fabry-Patienten stammenden Fibroblastenlinien, welche die *missense*-Mutationen c.902G>A (p.R301Q) bzw. c.901C>G (p.R301G) des *GLA*-Gens trugen
- die Untersuchung unterschiedlicher PRs in Patientenfibroblasten zur Identifizierung von Substanzen, welche die Aktivität endogener, mutanter α -Gal A erhöhen
- der funktionelle Nachweis des positiven Einflusses der PRs auf die Pathophysiologie bei Morbus Fabry über die Messung des intrazellulären lyso-Gb3-Gehaltes

Des Weiteren sollten PRs mit einem positiven Effekt auf die Aktivität mutanter α -Gal A hinsichtlich ihres Wirkmechanismus charakterisiert werden. Speziell sollten dabei folgende Aspekte analysiert werden:

- die Fähigkeit effektiver PRs proteasomale Aktivität und damit die ERAD zu inhibieren
- der Einfluss effektiver PRs auf die *GLA*-Expression
- die transkriptionellen Signaturen der effektiven PRs unter Verwendung einer selbst recherchierten und visualisierten Übersicht über die Proteostasekomponenten

Außerdem sollten potenzielle Zielgene für die Verbesserung der Pathophysiologie des Morbus Fabry identifiziert werden. Um dies zu erreichen, sollte ein RNAi-vermittelter Knockdown PR-regulierter Proteostasegene erfolgen und dessen Einfluss auf die Aktivität mutanter α -Gal A untersucht werden. Diese Herangehensweise sollte gleichzeitig dazu dienen, die Proteostase mutanter α -Gal A näher zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fibroblastenkulturen von männlichen Morbus Fabry-Patienten und männlichen gesunden Probanden verwendet. Alle Hautbiopsien wurden am Arm entnommen. Die Morbus Fabry-Zelllinien trugen die p.R301Q- bzw. die p.R301G-Mutation des *GLA*-Gens. Beide Mutationen sind bereits als DGJ-responsiv beschrieben^{43,85,87}. Die p.R301Q-Mutation ruft einen atypischen Morbus Fabry-Phänotyp hervor⁸⁸, während die p.R301G-Mutation innerhalb des *GLA*-Gens einen klassischen Verlauf des Morbus Fabry bewirkt^{89,90}. Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Zelllinien

Bezeichnung	Genotyp	Alter bei Biopsie	Anbieter
<i>GLA</i> ^{p.R301Q/o}	c.902G>A	43	Amicus Therapeutics, Cranbury Township, USA
<i>GLA</i> ^{p.R301G/o} (GM00882)	c.901C>G	40	Coriell cell repository, Camden, USA
GM01653 (Wildtyp 1, WT1)	<i>GLA</i> -Wildtyp	37	Coriell cell repository, Camden, USA
GM23249 (Wildtyp 2, WT2)	<i>GLA</i> -Wildtyp	44	Coriell cell repository, Camden, USA
GM23250 (Wildtyp 3, WT3)	<i>GLA</i> -Wildtyp	44	Coriell cell repository, Camden, USA
GM23968 (Wildtyp 4, WT4)	<i>GLA</i> -Wildtyp	43	Coriell cell repository, Camden, USA

Für alle verwendeten Zelllinien wurde eine Sequenzierung des *GLA*-Gens (Referenz-Sequenz: NC_000023.11) vorgenommen. Hierbei konnten die *GLA*-Mutationen in den von Morbus Fabry-Patienten stammenden Fibroblastenlinien validiert werden (Tabelle 2.2). Außerdem konnten die Wildtyp-Sequenzen der Kontrolllinien validiert werden. Einzig Linie GM23249 wies drei nach derzeitigem Stand der Kenntnis biologisch irrelevante Polymorphismen auf (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Die den Variationen bzw. Mutationen entsprechenden Referenz-SNP-ID-Nummern der dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Variationen/ Mutationen des *GLA*-Gens in den verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Variation/ Mutation	Referenz-SNP ID-Nr.
<i>GLA</i> ^{p.R301Q/o}	c.902G>A	rs104894828
GM00882 (<i>GLA</i> ^{p.R301G/o})	c.901C>G	rs398123224
GM01653 (Wildtyp 1, WT1)	Keine Variation/ Mutation	
GM23249 (Wildtyp 2, WT2)	Int02 c.370-81_-77delCAGCC Int04 c.640-16A>G Int06 c.1000-22C>T	rs5903184 rs2071397 rs2071228
GM23250 (Wildtyp 3, WT3)	Keine Variation/ Mutation	
GM23968 (Wildtyp 4, WT4)	Keine Variation/ Mutation	

Die verwendeten Zellkulturmedien und Mediumzusätze sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Zellkulturmedien und Mediumzusätze

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	31966
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D2650
HyClone™ fetales Kälberserum (FKS)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK	SV30160.03
Trypsin-EDTA (0.25%)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	25200-056
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	15140-122
PBS-Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, DE	L 1825

Die niedermolekularen Verbindungen, welche zur Behandlung der Fibroblasten verwendet wurden, sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Die enthaltenen Referenzen belegen den Einfluss der Wirkstoffe auf die zelluläre Proteostase und teilweise deren Wirksamkeit bei lysosomalen Speichererkrankungen mit Proteinfaltungsdefekt. Die dazugehörigen Artikelinformationen sind im Anhang in Tabelle A.1 aufgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, angesetzten Lösungen, Antikörper, Kits, qRT-PCR-Primer, Geräte, Verbrauchsmaterialien und Computerprogramme sind in den Tabellen A.2 bis A.9 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Wirkstoffe

Molekulare Funktion	Bezeichnung	Erkrankung	Referenz
Ca ²⁺ -Kanal-Blocker	Lacidipin	Morbus Gaucher	Wang et al. Chem Biol. 2011
	Dantrolen	Morbus Gaucher	Wang et al. ACS Chem Biol. 2011 Ong et al. Nat Chem Biol. 2010
	Diltiazem	Morbus Gaucher	Ong et al. Nat Chem Biol. 2010
Co-Induktor von HSPs	Arimoclomol	NPC1	Kirkegaard et al. Sci Transl Med. 2016
Cyclooxygenase-Inhibitor	Ibuprofen	Mukoviszidose	Carlile et al. J Cyst Fibros. 2015
ERAD-Inhibitor	17-AAG (HSP90)	Glioblastom	Sauvageot et al. Neuro Oncol. 2009
	Bortezomib (Proteasom)	Morbus Pompe	Shimada et al. JIMD Rep. 2015
	Celastrol (Proteasom)	Morbus Gaucher, Tay-Sachs-Syndrom	Mu et al. Cell. 2008
	Clasto-Lactacystin-β-lacton (Proteasom)	Morbus Fabry	Ishii et al. Biochem J. 2007
	Eeyarestatin I (VCP)	Morbus Gaucher	Wang et al. J Biol Chem. 2011
	Kifunensin (MAN1B1)	Morbus Gaucher	Wang et al. J Biol Chem. 2011
	MG132 (Proteasom)	Morbus Gaucher, Tay-Sachs-Syndrom	Mu et al. Cell. 2008
	Pifithrin-μ (HSP70)	Krebs	Leu et al. Mol Cell. 2009
	Pyr41 (Ubiquitinierung)	Morbus Fabry	Lukas et al. Mol Ther. 2015
	Ritonavir (Proteasom)	Solide Tumore	Kraus et al. Mol Cancer Ther. 2008
	SAHA (Histon-Deacetylase)	NPC1, Morbus Gaucher	Pipalia et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, Lu et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011
	TSA (Histon-Deacetylase)	NPC1	Pipalia et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011

Na ⁺ -Kanal-Blocker/ Pharmakologisches Chaperon (PC)	Ambroxol	Morbus Fabry/ Morbus Pompe, Morbus Gaucher	Lukas et al. Mol Ther. 2015, McNeill et al. Brain. 2014
PC	DGJ	Morbus Fabry	Lukas et al. Hum Mutat. 2016
PPAR-Agonist	Rosiglitazon (PPAR γ)	Morbus Fabry	Lukas et al. Mol Ther. 2015
	Pioglitazon (PPAR γ)	Alzheimer	Papadopoulos et al. PLoS One. 2013
	15d-PGJ ₂ (PPAR γ)	Multiples Myelom	Sperandio et al. Exp Mol Pathol. 2017
	Bezafibrat (PPAR $\alpha/\delta/\gamma$)	Morbus Fabry	Lukas et al. Mol Ther. 2015

2.2 Kultivierung von Fibroblasten

Die für diese Arbeit verwendeten Fibroblastenlinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und erhöhter Luftfeuchtigkeit in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Dauerkultur sowie die Kultur während der Versuche erfolgten in Fibroblasten-Medium bestehend aus DMEM, 15 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin.

2.2.1 Passagieren und Aussaat

Bei Erreichen einer Zelldichte von ca. 95 % wurden die Fibroblasten in neue T75-Zellkulturflaschen passagiert bzw. für Versuche ausgesät. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 2,5 ml 0,25 %igem Trypsin-EDTA pro T75-Flasche und eine Inkubation für ca. 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde die enzymatische Reaktion mit 5 ml Fibroblasten-Medium gestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 418 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Fibroblasten-Medium resuspendiert. Anschließend wurden Zellzahl und Vitalität mittels Zellzähler CASY bestimmt und die Zellen in der entsprechenden Konzentration in neue Zellkulturflaschen bzw. für Versuche ausgesät.

2.2.2 Kryokonservierung

Die Zellsuspension mit der einzufrierenden Menge an Fibroblasten wurde 5 min bei 418 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Dieses bestand aus Fibroblasten-Medium versetzt mit 10 % DMSO. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden in 1,7 ml Einfriermedium aufgenommen und in entsprechende Kryoröhrchen überführt. Im Anschluss erfolgte eine Lagerung der Zellen in mit Isopropanol befüllten Gefrierbehältern bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, um eine langsame Temperaturabsenkung um $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute zu gewährleisten. Nach 12 h wurden die Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff zur Langzeitlagerung überführt. Um kryokonservierte Fibroblasten wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese aus dem Stickstoff genommen und zügig im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Die Zellsuspension wurde tröpfchenweise in 8,5 ml Fibroblasten-Medium überführt und 5 min bei 418 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Fibroblasten-Medium resuspendiert und die Zellzahl sowie Viabilität mit dem Zellzähler CASY bestimmt. Daraufhin wurden die Fibroblasten für die Dauerkultur in Zellkulturflaschen überführt und bei Erreichen ausreichender Konfluenz erneut passagiert.

2.3 *GLA*-Gensequenz-Analyse der Fibroblasten (nach Sanger)

Um die beschriebenen Mutationen der Morbus Fabry-Fibroblasten zu validieren und um zusätzliche Mutationen in Morbus Fabry- und Wildtyp-Fibroblasten ausschließen zu können, wurde in allen verwendeten Zelllinien das sieben Exons umspannende *GLA*-Gen sequenziert. Hierfür wurde eine Suspension mit 1×10^6 Zellen der entsprechenden Linie in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 420 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um die genomische DNA (gDNA) aus den Zellen zu extrahieren, wurde das *Quick-gDNATM MiniPrep*-Kit nach Vorgaben des Herstellers verwendet. Als letzter Schritt des Protokolls wurde die entsprechende gDNA in 50 μl Reinstwasser eluiert. Die weitere Verarbeitung der Proben und die Durchführung der *Next Generation*-Sequenzierung mittels MiSeq-System (Illumina, San Diego, USA) erfolgten in der Centogene AG (Rostock, DE).

2.4 Behandlung und Zellernte der Fibroblasten für Enzymaktivitätsbestimmungen

WT- bzw. Morbus Fabry-Fibroblasten wurden in einer Konzentration von 200.000 Zellen pro Well in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h kultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.1). Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel mit Fibroblasten-Medium ohne bzw. mit Zugabe von Wirk-

stoffen bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle. Die eingesetzten Konzentrationsbereiche der verwendeten Substanzen sind Tabelle 2.5 zu entnehmen. Nach jeweils 2,5 Tagen Behandlungsdauer erfolgte ein erneuter Mediumwechsel analog dem zu Behandlungsbeginn durchgeführten. Die genaue Behandlungsdauer ist für jeden Versuch im entsprechenden Resultateteil angegeben.

Tabelle 2.5: Konzentrationsbereiche der eingesetzten Wirkstoffe

Wirkstoff	Konzentration	Lösungsmittel
15d-PGJ2	1 - 50 μ M	DMSO
17-AAG	5 - 500 nM	DMSO
Ambroxol	0,1 - 40 μ M	DMSO
Arimoclomol	0,1 - 100 μ M	DMSO
Bezafibrat	1 - 500 μ M	DMSO
Bortezomib	1 - 100 nM	DMSO
Celastrol	0,1 - 1 μ M	DMSO
Clasto-Lactacystin- β -lacton	0,5 - 7 μ M	Methylacetat
Dantrolen	0,5 - 10 μ M	DMSO
DGJ	1 - 200 μ M	Reinstwasser / DMSO
Diltiazem	10 - 200 μ M	Reinstwasser
Eeyarestatin I	1 - 10 μ M	DMSO
Ibuprofen	5 - 500 μ M	DMSO
Kifunensin	50 - 400 nM	DMSO
Lacidipin	2,5 - 20 μ M	DMSO
MG132	0,1 - 0,5 μ M	DMSO
Pioglitazon	1 - 120 μ M	DMSO
Pifithrin μ	1 - 100 μ M	DMSO
Pyr-41	1 - 75 μ M	DMSO
Ritonavir	1 - 100 μ M	DMSO
Rosiglitazon	1 - 160 μ M	DMSO
SAHA	10 nM - 40 μ M	DMSO
Trichostatin A (TSA)	1 nM - 5 μ M	DMSO

Für die Zellernte wurden die Zellen mit 500 μ l 0,25 %igem Trypsin-EDTA pro Well von der Plattenoberfläche abgelöst und diese enzymatische Reaktion mit 1 ml Fibroblasten-Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 500 μ l PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das PBS möglichst vollständig abgenommen. Bei nicht sofortiger Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung der Zellpellets bei -20 °C.

2.5 Protein- und Enzymaktivitätsbestimmung

Um die Aktivität der α -Gal A in den Fibroblasten zu bestimmen, wurden die bei der Zellernte gewonnenen Zellpellets (vgl. Abschnitt 2.4) in 80 μ l Reinstwasser resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Vortex gemischt, für ca. 10 s in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend im Wasserbad bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Dieser Vorgang wurde 5-mal wiederholt und die Proben anschließend 5 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden quantitativ (ca. 65 μ l) in frische Reaktionsgefäße überführt und für die Proteinbestimmung verwendet. Diese wurde mit dem Pierce[®] BCA Protein Assay-Kit nach Herstelleranweisung durchgeführt. Die Zellysate wurden hierfür 1:5 mit Reinstwasser verdünnt und jeweils 10 μ l der Verdünnungen in Doppelbestimmung in 96-Well-Platten überführt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine BSA-Eichreihe mitgeführt, deren sechs Konzentrationen von 0 bis 1 μ g/ μ l betragen. Die befüllten 96-Well-Platten wurden im Thermoschüttler für 1h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert und die Proteinmenge mittels Absorptionmessung am Plattenlesegerät GENios mit Hilfe der Software Magellan bestimmt.

Nach erfolgter Proteinbestimmung wurden 10 μ l der Zellysate mit einer Proteinkonzentration von 5 μ g/ 10 μ l in Doppelbestimmung in 96-Well-Platten überführt und mit jeweils 20 μ l 4-Methylumbelliferyl- α -D-Galaktopyranosid (4-MUG), einem Substrat der α -Gal A, versetzt. Anschließend erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation der Platten für 1h bei 37 °C und 300 rpm. Durch Zugabe von 200 μ l Glycin-NaOH (pH = 10,5) wurde die Reaktion abgestoppt und das freigesetzte fluoreszente Reaktionsprodukt 4-Methylumbelliferon (4-MU) stabilisiert. Zusätzlich wurde eine 4-MU-Eichreihe mit 6 Konzentrationen im Bereich von 0 bis 10 ng/ μ l pro Platte mitgeführt. Dabei wurden 10 μ l der Eichlösung mit 20 μ l Phosphat-Citrat-Puffer (pH = 4,7) und 200 μ l Glycin-NaOH (pH = 10,5) versetzt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mittels Plattenlesegerät GENios und der Software Magellan bestimmt und sind proportional der Aktivität der α -Gal A. Es erfolgte eine Normierung der Fluoreszenzen auf die jeweils verwendete Proteinmenge und die Enzymaktivität wurde in nmol 4-MU/ mg Protein/ h angegeben.

2.6 Western Blot-Analyse der α -Gal A

2.6.1 Zellkultur und Probenvorbereitung für Western Blot

Wildtyp- bzw. Morbus Fabry-Fibroblasten wurden mit jeweils 1 x 10⁶ Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h kultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.1). Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel mit Fibroblasten-Medium unter Zugabe der Wirkstoffe bzw. der entsprechenden

Lösungsmittelkontrolle. Nach 2,5 Tagen Behandlungsdauer erfolgte ein erneuter Mediumwechsel analog dem zu Behandlungsbeginn durchgeführten. Nach 5 Tagen Gesamtbehandlungsdauer wurde eine Auswaschung der Substanzen für 6 h vorgenommen. Die Zellernte erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.4 beschrieben.

Die bei der Ernte der Fibroblasten gewonnenen Zellpellets wurden in 45 μ l RIPA-Puffer resuspendiert und für 20 min schüttelnd auf Eis lysiert. Die Zelllysate wurden daraufhin mit dem Vortex gemischt und für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in 1,5 ml- Reaktionsgefäße überführt und für eine Proteinbestimmung verwendet (vgl. Abschnitt 2.5). 100 μ g Protein pro Probe wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 20 μ l gebracht und mit 5 μ l 5 x Laemmli-Puffer gemischt. Daraufhin wurden die Proben mit dem Vortex gemischt und für 5 min bei 95 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.6.2 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurde das vorgegossene Criterion™ TGX Gel (4–15% TRIS-HCl, 18 Well, 30 μ l Taschengröße) in den Laufstand der Criterion™ Cell Elektrophoresekammer eingesetzt, welche daraufhin mit SDS-Elektrophorese-Puffer befüllt wurde. Die Taschen des Gels wurden mit 25 μ l der vorbereiteten Proben (vgl. Abschnitt 2.6.1) befüllt, was 100 μ g Protein pro Probe entsprach. Die Markertaschen wurden mit 2 μ l des Proteinstandards (Precision Plus Protein™ Dual Xtra) beladen. Die am Powerpac angelegte Spannung betrug 100 V für die ersten 10 min und 180 V für weitere 70 min.

2.6.3 Proteintransfer und immunologische Proteindetektion

Der Proteintransfer aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mittels Elektrotransfer im *Semi-Dry-Blot-System*. Hierfür wurden nacheinander in Puffer getränktes *Blotting-Papier*, die Membran, das SDS-Gel und ein zweites *Blotting-Papier* auf die Anode der *Blotting-Kammer* gelegt. Nach Anschließen der Kathode wurde ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt und eine Stromstärke von 2,5 A erzeugt. Bei 25 V wanderten die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode und wurden auf der Nitrocellulose-Membran fixiert. Die Dauer der Übertragung im Trans-Blot® Turbo™ Transfer System

betrug 7 min. Anschließend wurde die Membran für 1 h schüttelnd bei RT in Blocklösung und anschließend für 2 h schüttelnd bei RT in Primärantikörperlösung gegen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, vgl. Tabelle A.4) inkubiert. Hierauf erfolgten 5 Waschschrte für 5 min mit 1 x TBST und die anschließende Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (Anti- α -Gal A) bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler. Am Folgetag wurden erneut 5 Waschschrte für 5 min mit 1 x TBST durchgeführt und die Membran für 2 h lichtgeschützt in Lösung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gegen beide Primärantikörper inkubiert. Anschließend erfolgten 4 Waschschrte für 5 min mit 1 x TBST und abschließend 1 Waschschrte für 5 min mit 1 x TBS, ebenfalls lichtgeschützt. Nach dem lichtgeschützten Trocknen der Membran, wurde diese am Odyssey 9120 gescannt, um die Fluoreszenzen zu detektieren. Mittels *Odyssey® Infrared Imaging System-Application Software* wurde das Molekulargewicht der Banden bestimmt und eine Quantifizierung der Proteinbanden vorgenommen.

2.6.4 PNGase F-Verdau

Ein Teil der bei der Ernte der Fibroblasten gewonnenen Zellpellets (vgl. Abschnitt 2.4) wurden mit PNGase F verdaut, um alle N-Glykosylierungen der α -Gal A zu entfernen. Hierfür wurden die Zellen zunächst lysiert (vgl. Abschnitt 2.6.1) und eine Proteinbestimmung durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.5). Der Verdau erfolgte mit dem PNGase F-Kit von New England Biolabs nach Vorgaben des Herstellers. Dabei wurden die Mengen der verwendeten Lösungen an die eingesetzten Proteinwerte angepasst. 100 μ g Protein pro Probe wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 14 μ l gebracht. Nach Zugabe von 1,6 μ l 10 x *Glycoprotein Denaturing Buffer* und 0,4 μ l Reinstwasser wurden die Proben gemischt, runterzentrifugiert und bei 100 °C für 10 min denaturiert. Daraufhin wurden die denaturierten Glykoproteine auf Eis gelagert und für 10 s zentrifugiert. Zu jeder Probe wurden 2,4 μ l 10 x *GlycoBuffer 2*; 2,4 μ l 10 %iges NP-40; 0,8 μ l Reinstwasser und 2,4 μ l PNGase F pipettiert. Die Ansätze wurden bei 37 °C für 2 h inkubiert und anschließend mit 6 μ l 5 x Laemmli-Puffer gemischt. Die SDS-PAGE, das Blotten der Proteinbanden und die immunologische Proteindetektion wurden wie unter den Abschnitten 2.6.2 und 2.6.3 durchgeführt.

2.7 Quantifizierung von Globotriaosylsphingosin in Patientenfibroblasten

Um Effekte der zu untersuchenden Wirkstoffe auf die Globotriaosylsphingosin (lyso-Gb3)-Menge in den Patientenfibroblasten zu analysieren, wurden die Zellen zunächst in 6-Well-Plat-

ten ausgesät (vgl. Abschnitt 2.2.1). Die Dauer der Behandlung sowie Zeitpunkte und Dauer der Auswaschung der Substanzen variierten und sind in den entsprechenden Ergebnisteilen angegeben. Die Auswaschungsdauer von 4 Tagen wurde in Anlehnung an bereits veröffentlichte Ergebnisse zur Gb3-Reduktion mittels DGJ-Behandlung und einer Auswaschungsdauer von 3 Tagen in Morbus Fabry-Fibroblasten durchgeführt⁹¹. Die Zellernte erfolgte wie im Abschnitt 2.4 beschrieben und die gefrorenen Zellpellets wurden in der Abteilung *VP High Throughput Testing and Biomarker Development* der Firma Centogene AG (Rostock, DE) hinsichtlich der lyso-Gb3-Menge massenspektrometrisch analysiert. Zunächst wurden die Proben innerhalb von sechs Zyklen bestehend aus Frieren in Flüssigstickstoff und Ultraschallbehandlung lysiert. Anschließend erfolgte eine Proteinbestimmung mittels Pierce[®] BCA Protein Assay-Kit nach Anweisungen des Herstellers. Die Probenvorbereitung für die lyso-Gb3-Bestimmung und die massenspektrometrische Quantifizierung der lyso-Gb3-Menge wurde wie bereits beschrieben durchgeführt⁹². Abschließend erfolgte eine Normalisierung der lyso-Gb3-Werte auf die Gesamtproteinmenge.

2.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

WT- und Morbus Fabry-Fibroblasten wurden in 24-Well-Zellkulturplatten in einer Konzentration von 30.000 Zellen pro Well ausgesät (vgl. Abschnitt 2.2.1). Nach 24-stündiger Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel mit Fibroblasten-Medium unter Zugabe des Wirkstoffes bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle. Die Behandlungsdauer betrug 24 h woraufhin die Fibroblasten geerntet und für die cDNA-Synthese vorbereitet wurden. Probenvorbereitung und cDNA-Synthese wurden mit dem FastLane Cell cDNA-Kit vorgenommen. Hierfür wurden die adhärennten Fibroblasten mit dem im Kit enthaltenen Puffer FCW gewaschen und im Puffer FCP für 10 min bei RT auf dem Schüttler lysiert. Die Zellysate wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss wurde die reverse Transkription nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Herstellung der PCR-Proben aus den erhaltenen cDNAs wurde das FastStart Essential DNA Green Master-Kit nach Anweisungen des Herstellers genutzt. Die verwendeten Primer mit den dazugehörigen Sequenzen sind in Tabelle A.6 aufgelistet. Ebenfalls aufgeführt sind die Temperaturen für die Primerhybridisierung. Die Arbeitslösungen aller Primer hatten eine Konzentration von 10 pmol/ µl. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit dem LightCycler[®] Nano in Verbindung mit der LightCycler[®] Nano SW 1.1-Software durchgeführt. Dabei wurde für jede Probe der Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert) bestimmt.

Folgende Parameter wurden für die Durchführung der qRT-PCR verwendet:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 10 min
2. 40 Zyklen, pro Zyklus
 - 20 s bei 95 °C für die Denaturierung,
 - 20 s bei 55 °C bzw. 60 °C für die Hybridisierung der *GLA*- bzw. *G6PD*-Primer und
 - 23 s bei 72 °C für die Elongation
3. Schmelzen der DNA-Stränge bei 65 °C bis 95 °C (mit einem Anstieg von 0,1 °C/ s)

Mittels Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte verifiziert. Die ermittelten Ct-Werte für die *GLA*-Expression wurden mittels der Ct-Werte für das Referenzgen Glucose-6-phosphatdehydrogenase (*G6PD*) intern normalisiert. Änderungen der mRNA-Mengen wurden mittels des effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodells⁹³ berechnet und in Vielfachen der entsprechenden Kontrolle angegeben.

2.9 Bestimmung proteasomaler Aktivität

Für die Bestimmung der proteasomalen Aktivität wurden die Fibroblasten in 24-Well-Zellkulturplatten mit 60.000 Zellen pro Well ausgesät (vgl. Abschnitt 2.2.1). Die Zellen wurden für 24 h kultiviert und für 2 h mit den entsprechenden Wirkstoffen bzw. der Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 300 µl PBS geerntet, welches ebenfalls den Wirkstoff bzw. die Lösungsmittelkontrolle enthielt. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit den *Proteasome-GloTM Cell-Based Assays* für die Chymotrypsin-, Trypsin- und die Caspase-ähnliche Aktivität des Proteasoms nach Vorgaben des Herstellers. Jedes Kit enthielt ein für die jeweilige proteasomale Untereinheit spezifisches Substrat, welches durch die in den Fibroblasten enthaltenen Proteasomen proteolytisch umgesetzt wurde. Das hierbei freigesetzte Aminoluciferin wurde zeitgleich von einer Luciferase unter Lichtfreisetzung umgesetzt. Dabei war die Stärke der proteasomalen Aktivität in den Fibroblasten proportional zu der Intensität der Lichtfreisetzung. Hierfür wurden 100 µl der Zellsuspension, und damit 20.000 Zellen, mit 100 µl des Proteasom-Glo-Reagenzes gemischt, welches sowohl das spezifische Substrat als auch die Luciferase enthielt. Die Zellsuspensionen wurden für 10 min lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Um Hintergrundsignale zu ermitteln wurden außerdem 100 µl PBS mit der gleichen Menge an Proteasom-Glo-Reagenz gemischt und inkubiert. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte am Luminometer Lumat 9507 mit einer Messzeit von 2 s.

2.10 Dosis-Wirkungs-Kurven und Synergie-Kalkulation

Alle hierzu notwendigen Berechnungen wurden von Dr. Stephan Struckmann am Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock unter Verwendung von R (Version 3.3.0) vorgenommen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mittels R-Paket “drc“ (Version 3.0-1) erstellt⁹⁴ (vgl. Abbildung 3.3). Für die Oberflächendarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen von DGJ und BTZ (vgl. Abbildung 3.6) und für die Synergie-Testungen (vgl. Abbildung 3.7) wurde das R-Paket “synergyfinder“ verwendet⁹⁵. Bei letzterem wurden die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung in Prozent der maximal gemessenen Aktivität umgerechnet. Die Enzymaktivität der unbehandelten Kontroll-Zellen wurde dabei von den übrigen Ergebnissen abgezogen, um eine eindeutige Aussage über die tatsächlichen Effekte der Substanzen treffen zu können. Dabei traten negative Werte für die Behandlungen der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit 1 nM BTZ bzw. 10 nM BTZ auf. Diese BTZ-Konzentrationen hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der α -Gal A und verhielten sich vergleichbar der DMSO-Kontrolle. Da eine Synergie-Kalkulation sonst nicht möglich gewesen wäre, wurden diese Werte auf Null gesetzt. Dies geschah in Anlehnung an die EP17-Richtlinie des *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) und basierte auf dem Befund, dass das *Limit of Quantitation* (LoQ) nach diesen Behandlungen nicht erreicht wurde⁹⁶. Daraufhin wurden die Enzymaktivitäten nach Kombinationsbehandlung mit der hypothetischen Enzymaktivität verglichen, die erreicht werden musste, damit es sich um einen additiven Effekt beider Substanzen handelt. Die Ermittlung dieses hypothetischen additiven Effektes für jede Kombinationsbehandlung erfolgte auf Grundlage des BLISS-Independence-Modells für Synergie-Analyse⁹⁷ mittels folgender Formel $E_D + E_B - E_D * E_B$. Dabei ist E_D die Enzymaktivitätserhöhung nach Einzelbehandlung mit der entsprechenden DGJ-Konzentration und E_B die Enzymaktivitätserhöhung nach Einzelbehandlung mit der entsprechenden BTZ-Konzentration. Die Differenz zwischen dem tatsächlich erreichten Effekt der Substanzkombination und dem hypothetischen additiven Effekt stellt dabei den Synergie-Wert dar (*excess over bliss, eob*). Ist der Synergie-Wert negativ, handelt es sich um eine antagonistische Wirkung beider Substanzen. Bei einem Synergie-Wert von Null liegt ein additives Verhalten beider Substanzen vor. Ein positiver Synergie-Wert weist auf eine Synergie beider Wirkstoffe hin.

2.11 Microarray-Analyse

2.11.1 Probenherstellung und Durchführung der Microarrays

WT-Fibroblasten (WT1-WT4, vgl. Tabelle 2.1) bzw. Morbus Fabry-Fibroblasten wurden in 10 cm-Zellkulturschalen mit einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgesät (vgl. Abschnitt 2.2.1). Nach einer 24-stündigen Vorkultivierung erfolgten ein Mediumwechsel und eine erneute Kultivierung für 24 h mit Fibroblasten-Medium ohne bzw. mit Zugabe von Wirkstoffen oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (vgl. Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Zellbehandlungen zur Generierung von Microarray-Proben

Behandlung	Molarität	Substanz-Klasse
DMSO	-	-
DGJ	50 μ M	PC
MG132	0,3 μ M	PR
BTZ	5 nM	PR
CLC	5 μ M	PR
EerI	6 μ M	PR
ABX	40 μ M	PR
MG132 + DGJ	0,3 μ M MG132 + 50 μ M DGJ	PR + PC
EerI + DGJ	6 μ M EerI + 50 μ M DGJ	PR + PC
ABX + DGJ	40 μ M ABX + 50 μ M DGJ	PR + PC

PC: pharmakologisches Chaperon, PR: Proteostase-Regulator

Für die Behandlung der Zellen wurden die für die Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A effektivsten Konzentrationen verwendet. Pro Zelllinie bzw. pro Behandlung wurden 4 Replikate hergestellt. Für die Zellernte wurden die Fibroblasten mit PBS gewaschen und daraufhin mit 600 μ l RLT-Puffer des RNeasy Plus Mini-Kits (supplementiert mit 1 % β -Mercaptoethanol) bedeckt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst und die Zelllysate in RNase-freie 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -20 °C bis sie in die "Core Facility Micro-Array-Technologie" der Universitätsmedizin Rostock, geleitet von Dr. Dirk Koczan, transportiert wurden. Dort erfolgten die weitere Prozessierung und Verarbeitung der Proben. Hierzu gehörte zunächst die RNA-Purifikation mittel RNeasy Plus Mini-Kit nach Vorgaben des Herstellers. Weiterhin wurden die RNA-Proben amplifiziert, in cDNA umgeschrieben und fluoreszenzmarkiert, wofür das GeneChip® WT

PLUS Reagent-Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet wurde. Für die über Nacht-Hybridisierung auf den GeneChip[®] Human Transcriptome Arrays 2.0 (HTA 2.0-Arrays) wurde der GeneChip[®] Hybridization Oven (Affymetrix) verwendet. Die Visualisierung der Microarrays erfolgte mit dem GeneChip Scanner 3000/ 7G von Affymetrix.

2.11.2 Qualitätskontrolle und Expressionsanalyse

Die Rohdaten der Microarrays wurden in cel-Dateien umgewandelt, welche nach bestandener Qualitätskontrolle mittels der Expression Console Software (Version 1.4.1.46, Affymetrix) zurückübermittelt und analysiert wurden. Hierfür wurde die R-Software (Version 3.2.3) in Kombination mit Bioconductor (Version 3.2) verwendet. Die Normalisierung der Microarray-Daten und die Hintergrundkorrektur wurden mittels der *Robust Multichip Average (RMA)*-Prozedur⁹⁸ durchgeführt. Für vergleichende Expressionsanalysen wurde das Signifikanzniveau mit Expressionsunterschieden von mehr als 1,5-fach in Kombination mit angepassten p-Werten (engl. *adjusted p-value*) kleiner als 0,05 festgelegt.

2.11.3 WikiPathways-Analyse

Die transkriptionellen Signaturen von MG132, BTZ, CLC und EerI hinsichtlich der globalen Genexpression (GT-Signaturen) stellen die Gruppe differenziell exprimierter Gene nach Behandlung der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit einer der Substanzen dar. Die vier GT-Signaturen wurden unter Verwendung der WikiPathways-Datenbank⁹⁹ hinsichtlich der Annotationen der Signalwege der in ihnen enthaltenen Gene untersucht. Diese Analyse wurde mittels R-Software (Version 3.2.3) und dem Bioconductor-Paket “org.Hs.eg.db”¹⁰⁰ vorgenommen. Dabei wurde geprüft, welche Signalwege signifikant häufiger in der Gruppe an Genen innerhalb der GT-Signaturen annotiert sind im Vergleich zum gesamten Genom.

2.12 Erstellung eines Proteostase-Schemas

Zur visuellen Analyse der Microarray-Ergebnisse sollte ein Proteostase-Schema erstellt werden. Die hierzu durchgeführten Arbeitsschritte sind in Abbildung 2.1 zusammengefasst. Dabei wurden zunächst Proteostasekomponenten aus aktueller, mit Proteinfaltungserkrankungen assoziierter Literatur zusammengestellt^{11,76,79,101,102,103,104,105,106,107,108,109}. In einem zweiten Schritt wurden diese Komponenten mittels der String-Datenbank hinsichtlich ihrer Interaktionen un-

tersucht und in einem Interaktionsnetzwerk dargestellt. Dies wurde von Dr. Mathias Ernst am Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock unter Verwendung von R (Version 3.3.0) vorgenommen.

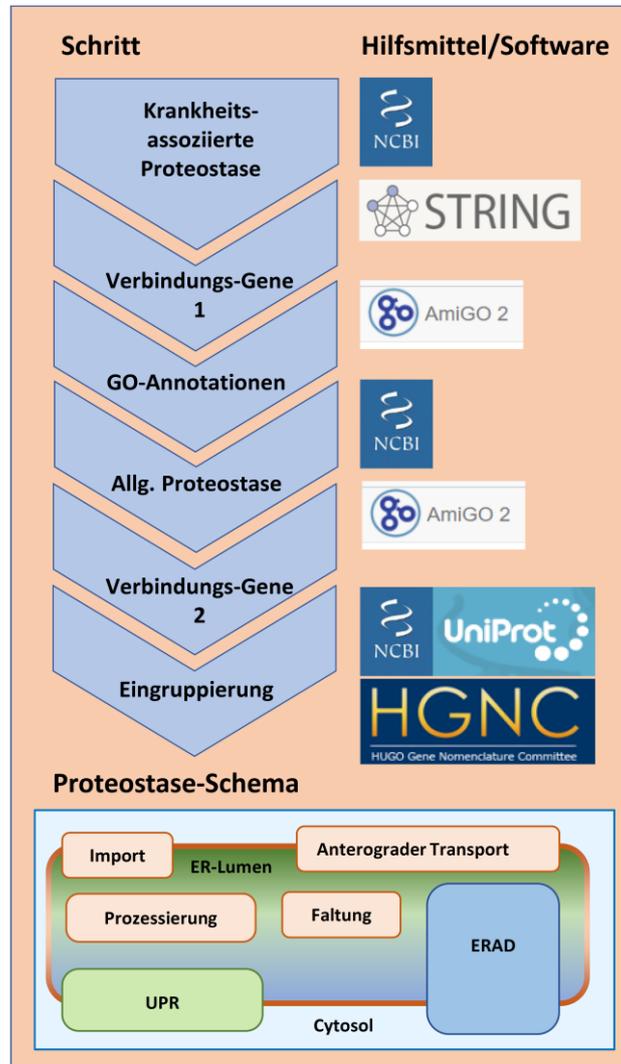


Abbildung 2.1: Arbeitsablauf für das Erstellen eines Proteostase-Schemas. Mittels sechs verschiedener Schritte wurden Proteostase-assoziierte Gene zusammengestellt und daraufhin entsprechend ihrer biologischen Funktion innerhalb der Proteostase eingruppiert.

Die für die Erstellung des Netzwerkes benötigten Zusatzpakete in R waren “igraph“, “org.Hs.eg.db“, “GA“, “GO.db“, “Category“, “GOstats“ und “limma“. Hierzu wurden nicht in der Liste an Proteostasekomponenten enthaltene Gene als Brückengene eingefügt, um die Konnektivität zu verbessern und damit die vollständige Komponentenliste in das Netzwerk aufnehmen zu können. Die hierbei gewonnenen Informationen über mögliche weitere Proteostasekomponenten wurden mittels der UniProt-Datenbank und den im QuickGO-Browser (EMBL-EBI) enthaltenen *Gene Ontology*-(GO)-Annotationen validiert.

Um ein möglichst vollständiges Bild der Proteostase zu erhalten, wurden in einem dritten Schritt sämtliche Proteostase-relevanten GO-Annotationen bezüglich molekularer Funktionen/ biologischer Prozesse unter Einbeziehung der zellulären Lokalisation aller Proteostasekomponenten zusammengetragen. Die relevanten GO-Annotationen sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. Einschlusskriterien waren dabei, dass es sich um Prozesse der Proteostase handelt, welche eindeutig ER-assoziiert sind. Mit Hilfe des *Advanced Search* des AmiGO-Browsers (GO Central) wurden alle mit dem jeweiligen GO annotierten und auf *Homo Sapiens* beschränkten Gene zusammengetragen und mittels UniProt auf ihre Proteostase-Zugehörigkeit validiert.

Nach erneuter Literaturrecherche^{15,16,71,110} und Erstellung des eben genannten Proteostase-Netzwerkes mit Einfügen und Validierung von Verbindungskomponenten wurde die Proteostaseliste erneut erweitert. Als letzter Schritt erfolgte eine Eingruppierung der Proteostasekomponenten hinsichtlich ihrer biologischen Funktion innerhalb der Proteostase, soweit diese bereits publiziert war. Hierfür wurden sowohl Literatur^{11,12,15,16,71,76,110,111,112,113} als auch die Datenbanken HGNC und UniProt verwendet. Bei dieser Recherche zusätzlich ermittelte Proteostasekomponenten wurden ebenfalls der Proteostaseliste hinzugefügt. Abschließend wurden die eingruppierten Proteine in einem Proteostase-Schema dargestellt.

Tabelle 2.7: GO-Annotationen zur AmiGO-Abfrage

GO-ID	GO-Annotation
GO:0006987	<i>activation of signaling protein activity involved in unfolded protein response</i>
GO:0030968	<i>endoplasmic reticulum unfolded protein response</i>
GO:0034663	<i>endoplasmic reticulum chaperone complex</i>
GO:0034975	<i>protein folding in endoplasmic reticulum</i>
GO:0034976	<i>response to endoplasmic reticulum stress</i>
GO:0036498	<i>IRE1-mediated unfolded protein response</i>
GO:0036499	<i>PERK-mediated unfolded protein response</i>
GO:0036500	<i>ATF6-mediated unfolded protein response</i>
GO:0071712	<i>ER-associated misfolded protein catabolic process</i>
GO:1900102	<i>negative regulation of endoplasmic reticulum unfolded protein response</i>
GO:1900103	<i>positive regulation of endoplasmic reticulum unfolded protein response</i>

2.13 RNAi-vermittelter Knockdown regulierter Gene

Um den Einfluss der durch die PRs transkriptionell regulierten Gene auf die mutante α -Gal A zu untersuchen, wurden die während der Microarray-Analyse definierten Zielgene mit potentielltem Einfluss auf die Maturierung oder Degradation mutanter α -Gal A mittels RNA-Interferenz (RNAi) validiert. Durchgeführt wurde diese Validierung von der Firma Thermo Fisher

Scientific (Waltham, USA). Hierfür wurden die $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten expandiert und in Kryoröhrchen mit 2×10^6 Zellen an Thermo Fisher Scientific verschickt. Vor der Versuchsdurchführung wurde sichergestellt, dass die Fibroblasten keine Kontamination mit Pathogenen (Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), Humanes Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1), Humanes Immundefizienz-Virus-2 (HIV-2), Humanes T-lymphotropes Virus 1/2 (HTLV 1/2), Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1), Herpes-simplex-Virus-2 (HSV-2)) aufwiesen.

2.13.1 Readout-Validierung

Um die im Albrecht-Kossel-Institut durchgeführten *Readouts* in Form von Proteinbestimmung und Enzymaktivitätsmessung für den experimentellen Ablauf der Firma Thermo Fisher Scientific zu validieren, wurden die $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten von Thermo Fisher Scientific in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Well in 24-Well-Zellkulturplatten in 400 μ l Medium ausgesät (vgl. Abschnitt 2.2.1) und mit zwei *GLA*-spezifischen siRNAs bzw. einer randomisierten Kontroll-siRNA, die nicht im Transkriptom bindet, behandelt. Die siRNAs wurden in 50 μ l OptiMEM-Medium in 10-facher Konzentration (200 nM) angesetzt. RNAiMAX wurde für 1 μ l pro Well in 50 μ l OptiMEM-Medium vorbereitet. Daraufhin wurden 50 μ l mit siRNA versetztes OptiMEM-Medium mit 50 μ l RNAiMAX enthaltendes OptiMEM-Medium gemischt und für 10 min bei RT inkubiert, damit sich siRNA/ RNAiMAX-Komplexe formen konnten. Anschließend wurden 100 μ l siRNA/ RNAiMAX-Komplex zu den jeweiligen 400 μ l Zellsuspension im Well der 24-Well-Zellkulturplatte pipettiert und die Platten für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Hälfte der Proben erhielt eine zusätzliche Behandlung mit 50 μ M DGJ. Eine Hälfte der Proben ohne bzw. mit DGJ-Behandlung wurden für die Bestimmung der Aktivität der α -Gal A geerntet (vgl. Abschnitt 2.4). Die Zellen wurden dabei mit 500 μ l PBS pro Well gewaschen und mit 100 μ l 0,25 %igem Trypsin/ EDTA vom Plattenboden abgelöst. Die Reaktion wurde mit 200 μ l Fibroblasten-Medium abgestoppt. Die nach Zentrifugation und Waschen gewonnenen Zellpellets wurden bis zum Versand bei -20 °C gelagert. Die zweite Hälfte der Zellen wurde für die Bestimmung des *GLA*-mRNA-Levels mittels qRT-PCR geerntet. Hierfür wurden, analog der ersten Hälfte der Proben, Zellpellets hergestellt. Diese wurden zur Stabilisierung der mRNA mit 500 μ l RNAlater™ versetzt und bei -20 °C gelagert. Die Zellpellets und Zelllysate wurden zur Messung der Aktivität der α -Gal A (vgl. Abschnitt 2.5) und zur Bestimmung der *GLA*-Expression (vgl. Abschnitt 2.8) auf Trockeneis ins Albrecht-Kossel-Institut geschickt. Um, trotz Normierung der Enzymaktivitäts-Ergebnisse auf die Proteinmenge in den

Proben, auftretende unspezifische Abweichungen auszuschließen, wurden nur diejenigen Proben in die Auswertung einbezogen, deren Proteingehalt sich nicht mehr als 20 % von den Kontrollen (mit randomisierter siRNA behandelten Proben) unterschied.

2.13.2 Knockdown regulierter Gene

Nach erfolgter *Readout*-Validierung wurden erneut Fibroblasten an Thermo Fisher Scientific versandt, welche mit einer Reihe an *Silencer*[®] *Select* siRNAs gegen die vorher definierten Zielgene behandelt wurden. Das Versuchsprotokoll entsprach dem der *Readout*-Validierung (Abschnitt 2.13.1). Dabei wurden drei siRNA-Oligos gegen jedes potenzielle Zielgen verwendet. Dies erfolgte für vier parallele Proben pro Oligo, so dass zwölf Proben für den Knockdown jedes Zielgens generiert wurden, was $n = 3$ entsprach. Die entsprechenden siRNA-Sequenzen sind Tabelle A.10 zu entnehmen. Für eine spätere Normierung der Knockdown-Ergebnisse wurden zusätzlich 8 Wells mit randomisierter siRNA (*Silencer*[®] *Select Negative Control*) behandelt. Parallel zur siRNA-Behandlung wurden alle Wells mit DGJ behandelt und nach der Zellernte zur Bestimmung der Enzymaktivität mutanter α -Gal A (vgl. Abschnitt 2.5) ins Albrecht-Kossel-Institut gesendet.

2.14 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden abhängig vom Verwendungszweck mit GraphPad Prism 5, Microsoft Excel bzw. R vorgenommen. Durch Laborarbeit ermittelte Daten sind als Mittelwerte \pm der Standardabweichung angegeben und stammen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, paarigen T-Test ermittelt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für $p \leq 0,05$ angenommen und folgendermaßen gekennzeichnet: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$. Den Signifikanzberechnungen für die mittels GeneChip[®] Human Transcriptome Arrays 2.0 ermittelten differenziellen Genexpressionsdaten liegt eine *moderated* T-Statistik zugrunde. Die adjustierten p-Werte für multiples Testen wurden mittels Korrektur der *False Discovery Rate* (FDR) nach Benjamini-Hochberg erstellt. Die Untersuchung der $GLA^{p.R301Q/o}$ - und WT-Fibroblasten hinsichtlich signifikanter Unterschiede in der globalen Genexpression erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (vgl. Abschnitt 3.9, Seite 58/ 59).

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypische Veränderungen in Morbus Fabry-Fibroblasten

Zunächst sollte die Aktivität endogener α -Gal A in den Morbus Fabry-Fibroblasten untersucht werden. Hierfür wurden vier verschiedenen Wildtyp (WT)-Fibroblastenlinien und zwei Morbus Fabry-Fibroblastenzelllinien für 5 Tage kultiviert (vgl. Abschnitt 2.4) und die Aktivität von α -Gal A in den Zellen gemessen (vgl. Abschnitt 2.5). Die Morbus Fabry-Fibroblasten stammten von hemizygoten männlichen Morbus Fabry-Patienten, welche die $GLA^{p.R301Q/o}$ - bzw. die $GLA^{p.R301G/o}$ -Mutation trugen. Um die Aktivität der α -Gal A zwischen den WT- und den Morbus Fabry-Fibroblasten zu vergleichen, wurden die Mediane der Enzymaktivitätswerte jeder der vier WT-Linien ermittelt. Diese wurden zur Bestimmung des 25 %-Perzentils verwendet, welches 34,44 nmol 4-MU/ mg Protein/ h betrug und als Schwellenwert für eine normale Aktivität der α -Gal A definiert wurde. Die Enzymaktivitätswerte in den $GLA^{p.R301Q/o}$ - bzw. in den $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten lagen mit 16,70 (\pm 3,70) nmol 4-MU/ mg Protein/ h bzw. 12,28 (\pm 4,93) nmol 4-MU/ mg Protein/ h deutlich unterhalb des Normalbereiches.

Außerdem wurde geprüft, ob eine veränderte Proteinmenge an α -Gal A in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten vorlag. Hierfür wurden Wildtyp 1 (WT1)- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten für 5 Tage kultiviert (vgl. Abschnitt 2.6.1). Zur besseren Quantifizierbarkeit der α -Gal A, wurden die Proben vor dem Western Blot mit PNGase F verdaut, wodurch die komplexen N-Glykosylierungen abgespalten und die verschiedenen Spezies der α -Gal A in einer distinkten Bande dargestellt wurden (vgl. Abschnitte 2.6.4 und 3.4). Die Proteinbanden vor und nach dem Verdau sind den Abbildungen 3.8 und 3.9 zu entnehmen. Die Quantifizierung der distinkten Banden der α -Gal A nach PNGase F-Verdau zeigte eine 0,50-fache signifikante Verringerung der Proteinmenge an α -Gal A in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten (Abbildung 3.1).

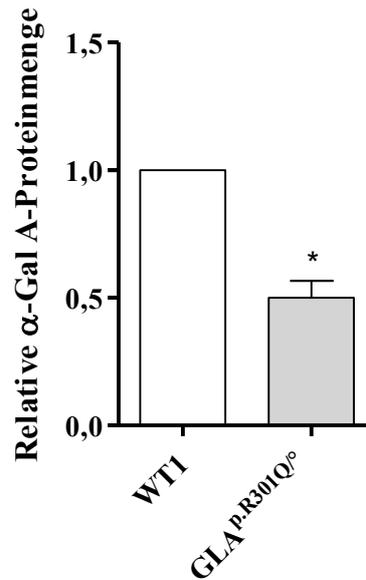


Abbildung 3.1: Proteinmenge an α -Gal A in WT1- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. WT1- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 5 Tage kultiviert. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse der Proteinmenge an α -Gal A durchgeführt, wobei GAPDH als interne Ladekontrolle diente. Die Proteinmenge an α -Gal A war in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den WT-Fibroblasten signifikant reduziert (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; $n = 3$).

Zudem wurde der lyso-Gb3-Level in den WT1-Fibroblasten und den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten bestimmt (vgl. Abschnitt 2.7). Hierfür wurden die Zellen für 8 Tage kultiviert und eine massenspektrometrische Bestimmung der lyso-Gb3-Menge vorgenommen. Die lyso-Gb3-Werte wurden hinsichtlich der Proteinmenge in den jeweiligen Proben normalisiert und in ng/ mg Protein angegeben. Die Ergebnisse demonstrierten eine 12,5-fach erhöhte Menge an lyso-Gb3 in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den WT1-Fibroblasten (Abbildung 3.2). Damit konnte eine deutliche und signifikante Ansammlung an lyso-Gb3 in der verwendeten Morbus Fabry-Zelllinie gezeigt werden.

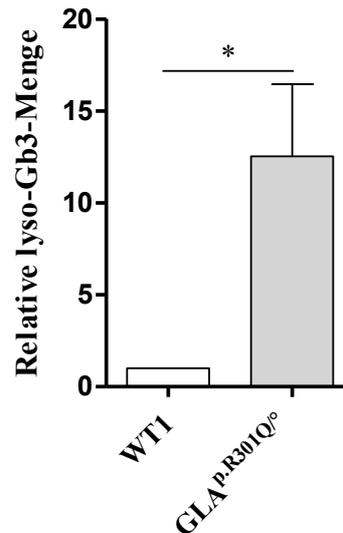


Abbildung 3.2: Lyso-Gb3-Level in WT1- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten. WT1- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 8 Tage kultiviert mit anschließender massenspektrometrischer Bestimmung der lyso-Gb3-Menge. Diese wurde auf die Proteinmenge in den Proben normalisiert. Es erfolgte weiterhin eine interne Normierung der lyso-Gb3-Level der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten auf die der WT1-Fibroblasten. Die lyso-Gb3-Mengen in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten waren signifikant erhöht (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; $n = 3$).

Zusammenfassend konnten eine reduzierte Enzymaktivität und ein verminderter Proteinlevel der α -Gal A sowie eine Erhöhung des Biomarkers lyso-Gb3 in den untersuchten Morbus Fabry-Fibroblasten konstatiert werden. Somit zeigten die Zellen den bekannten molekularen Phänotyp von Morbus Fabry.

3.2 Erhöhte Aktivität an α -Gal A in Morbus Fabry-Fibroblasten durch DGJ und PRs

In der vorliegenden Arbeit wurden 22 verschiedene Proteostase-Regulatoren (PRs, vgl. Tabelle 2.4) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die endogene Aktivität mutanter α -Gal A zu erhöhen. Hierfür wurden die *GLA*^{p.R301Q/o}- und die *GLA*^{p.R301G/o}-Fibroblasten mit einer Konzentrationsreihe an DGJ bzw. des jeweiligen PR behandelt (vgl. Abschnitt 2.4 und Tabelle 2.5). Der DGJ-Behandlung folgte eine 6-stündige Inkubation mit Fibroblasten-Medium ohne Zusatz von DGJ. Diese Auswaschung der Substanz diente dazu, eine inhibitorische Wirkung von DGJ auf die α -Gal A zu vermeiden. Die proteasomalen Inhibitoren MG132 und Bortezomib (BTZ) wiesen dabei den stärksten Effekt auf die Enzymaktivität der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten auf (Abbildung 3.3). Die Erhöhung entspricht dem mit dem zugelassenen Therapeutikum DGJ erzielten

Effekt. Clasto-Lactacystin- β -lactone (CLC) als weiterer proteasomaler Inhibitor erhöhte die endogene Enzymaktivität der α -Gal A um das 1,6-fache.

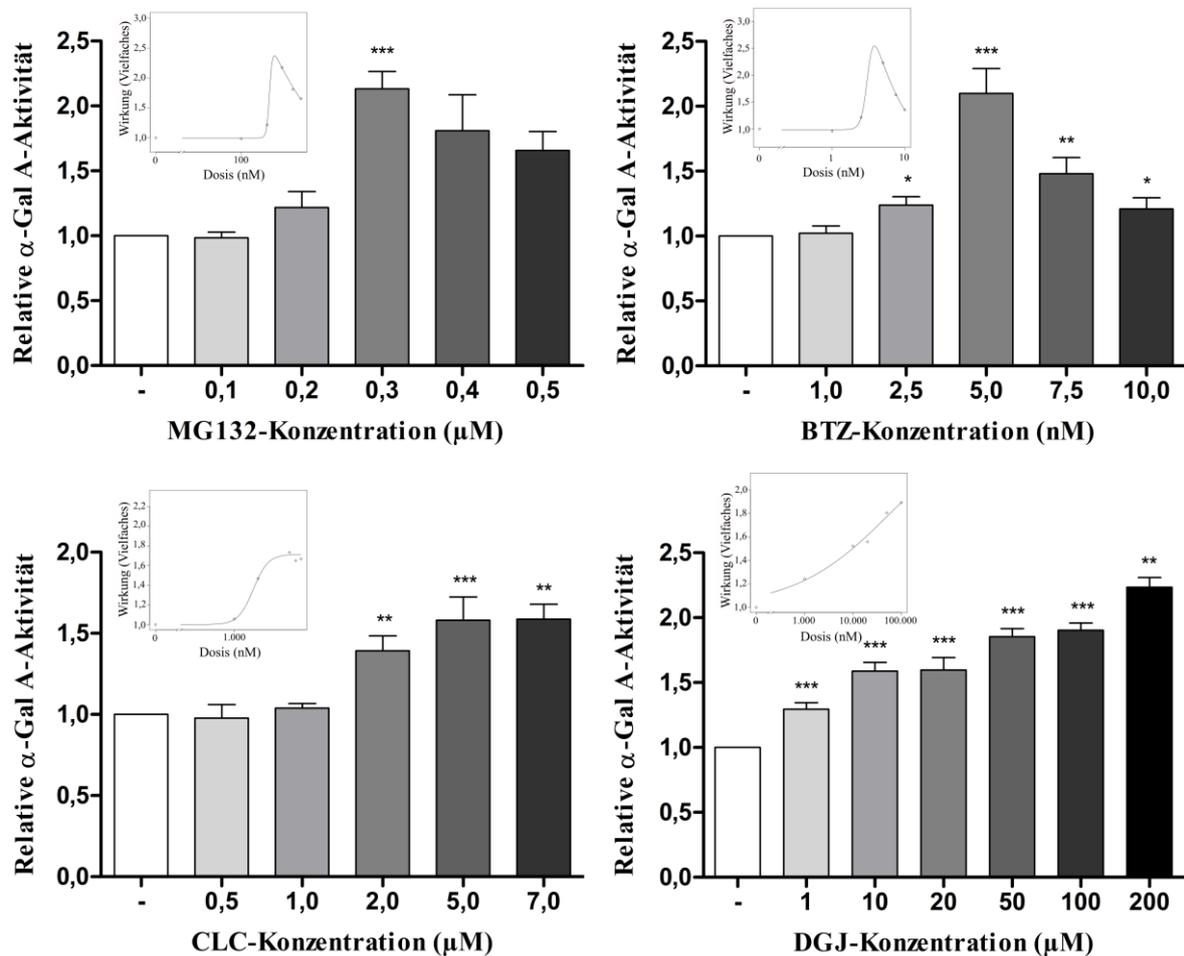


Abbildung 3.3: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch PRs. $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 5 Tage mit dem pharmakologischen Chaperon (PC) DGJ behandelt, mit anschließender Auswaschung des DGJ für 6 h, bzw. mit PRs. Anschließend wurde eine Bestimmung der Aktivität der α -Gal A durchgeführt. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die unbehandelte Kontrolle. Signifikante Erhöhungen der endogenen Aktivität an α -Gal A konnten nach Behandlung mit DGJ sowie den PRs MG132, BTZ und CLC beobachtet werden (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3-11$). Zur Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde das R-Paket “drc“ (Version 3.0-1) verwendet.

Zusätzlich wurde die $GLA^{p.R301G/o}$ -Linie mit den Substanzkonzentrationen behandelt, welche die höchste Effektivität in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten aufwiesen. Auch hier erfolgte eine 6-stündige Auswaschung von DGJ, um eine inhibitorische Wirkung von DGJ auf die Aktivität der α -Gal A zu vermeiden. Dabei war der DGJ-Effekt mit einer 2-fachen Erhöhung der Enzymaktivität (Abbildung 3.4) vergleichbar mit dem in der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Linie. Die PRs MG132, BTZ

und CLC konnten die Aktivität der mutanten α -Gal A mit einer Erhöhung auf das 6,5-Fache, das 8,5-Fache bzw. das 4,1-Fache noch stärker erhöhen als in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. Die $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten wurden ebenfalls mit dem ERAD-Inhibitor Eeyarestatin I (EerI) behandelt. Während der Effekt in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nicht signifikant war, wurde die Aktivität in den $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten dagegen reproduzierbar auf das 1,6-Fache erhöht.

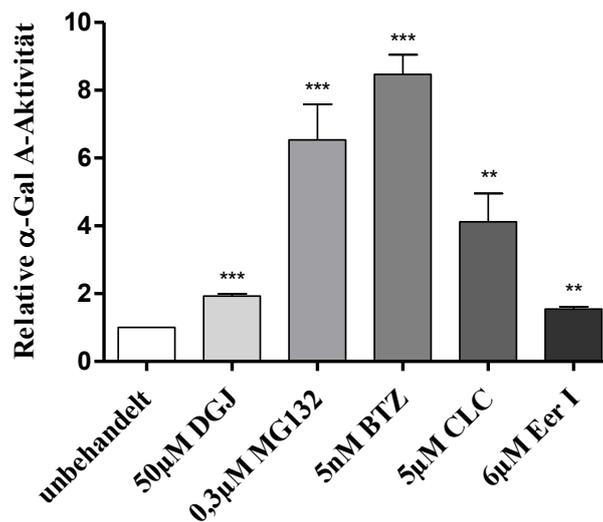


Abbildung 3.4: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten durch PRs. $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten wurden für 5 Tage mit dem PC DGJ behandelt, mit anschließender Auswaschung des DGJ für 6 h, bzw. mit PRs. Anschließend wurde eine Bestimmung der Aktivität der α -Gal A durchgeführt. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die unbehandelte Kontrolle. Signifikante Erhöhungen der endogenen Aktivität an α -Gal A konnten nach Behandlung mit DGJ sowie den PRs MG132, BTZ, CLC und EerI beobachtet werden (Mittelwert \pm SD, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 4-19$).

3.3 Synergistische Effekte der PRs in Kombination mit dem PC DGJ

Im nächsten Schritt wurden beide Morbus Fabry-Fibroblastenlinien für 5 Tage mit einer Kombination aus 50 μ M DGJ und der optimalen Konzentration eines der effektiven PRs behandelt, gefolgt von einer 6-stündigen Auswaschung der Substanzen (vgl. Abschnitt 2.4). Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten erfolgte die Auswaschung sowie für die mit DGJ-behandelten Zellen als auch für die übrigen Behandlungen. Es sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen Wirkmechanismen beider Substanzgruppen zu synergistischen Effekten führen. Die Resultate der Kombinationsbehandlungen zeigten eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität im Vergleich zur DGJ-Einzelbehandlung für alle in der Einzelbehandlung effektiven PRs (Abbildung 3.5). Besonders starke Effekte traten bei der Kombination von DGJ mit BTZ auf, wel-

che die Enzymaktivität in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Zellen auf das 6,8-Fache und in $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten auf das 17,8-Fache erhöhte. Die Kombination aus DGJ und MG132 zeigte ähnlich starke Effekte und erhöhte die Aktivität mutanter α -Gal A 6,5-fach in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Zellen und 13,2-fach in den $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Zellen. Die kombinierten Behandlungen mit DGJ und CLC bzw. EerI erzielten Aktivitätserhöhungen auf das 4,0-Fache bzw. 3,3-Fache in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und auf das 7,0-Fache bzw. 4,3-Fache in der $GLA^{p.R301G/o}$ -Linie. Das als Hustenlöser bekannte Ambroxol (ABX) bewirkte zwar keine signifikante Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in der Einzelbehandlung, konnte aber in der Kombinationsbehandlung mit DGJ den jeweiligen DGJ-Einzeleffekt in beiden Morbus Fabry-Zelllinien signifikant verstärken (Abbildung 3.5). Auf Basis des BLISS Independence-Modells wurden für die Kombinationen von DGJ mit MG132, BTZ oder CLC in beiden Morbus Fabry-Zelllinien und für die Kombination von DGJ und EerI in den $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten synergistische Wirkweisen festgestellt. Beim BLISS-Modell handelt es sich um eine Berechnungsform zur Untersuchung des Zusammenwirkens zweier gleichzeitig applizierter Wirkstoffe zur Feststellung der Effektivität von Kombinationsbehandlungen (vgl. Abschnitt 2.10).

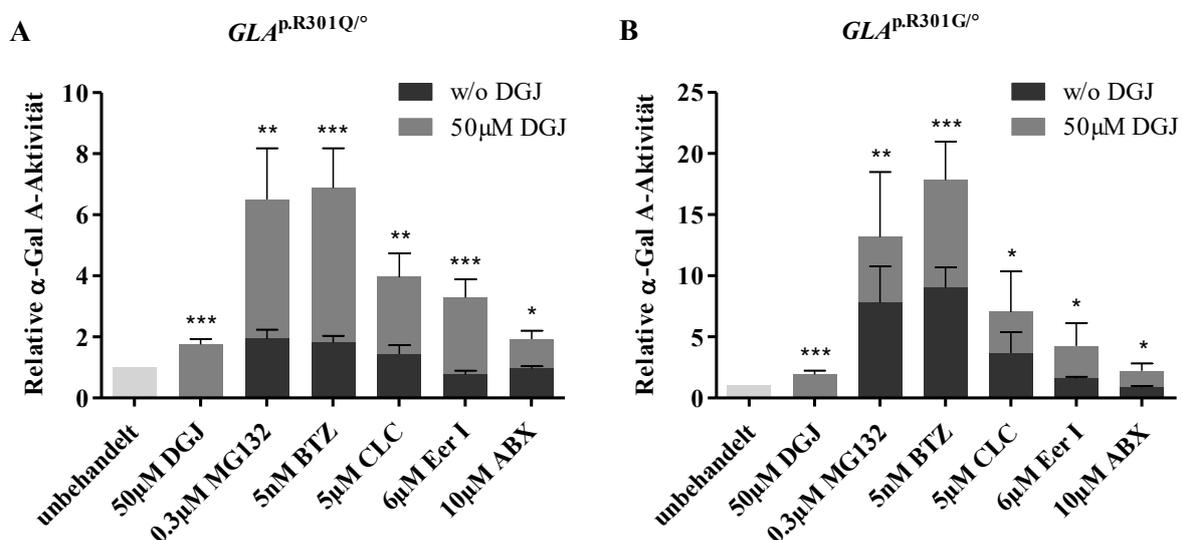


Abbildung 3.5: Synergistische Wirkungen von DGJ und PRs. $GLA^{p.R301Q/o}$ - (A) bzw. $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten (B) wurden für 5 Tage mit einer Kombination aus dem PC DGJ und einem PR behandelt, gefolgt von einer Auswaschung beider Substanzen für 6 h mit anschließender Messung der Aktivität der α -Gal A. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die unbehandelte Kontrolle. Die Signifikanz-Angaben der DGJ-Behandlungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. Die Signifikanz-Angaben der Kombinationsbehandlungen beziehen sich auf die DGJ-Einzelbehandlung. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 4-23$)

Um die Dynamik der effektivsten Substanzkombination näher zu untersuchen, wurden für die Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten verschiedene Konzentrationsbereiche an DGJ und BTZ miteinander kombiniert. Die stärkste Erhöhung endogener Aktivität von α -Gal A wurde dabei mit der Kombination von 200 μ M DGJ und 5 nM BTZ erreicht (Abbildung 3.6). Durch diese konnte eine Enzymaktivität von 143,8 nmol 4-MU/ mg Protein/ h erzielt werden, welche die endogene Enzymaktivität in allen verwendeten WT-Fibroblasten überstieg und dem 9,3-Fachen der Aktivität in den unbehandelten Zellen entsprach (Tabelle A.11).

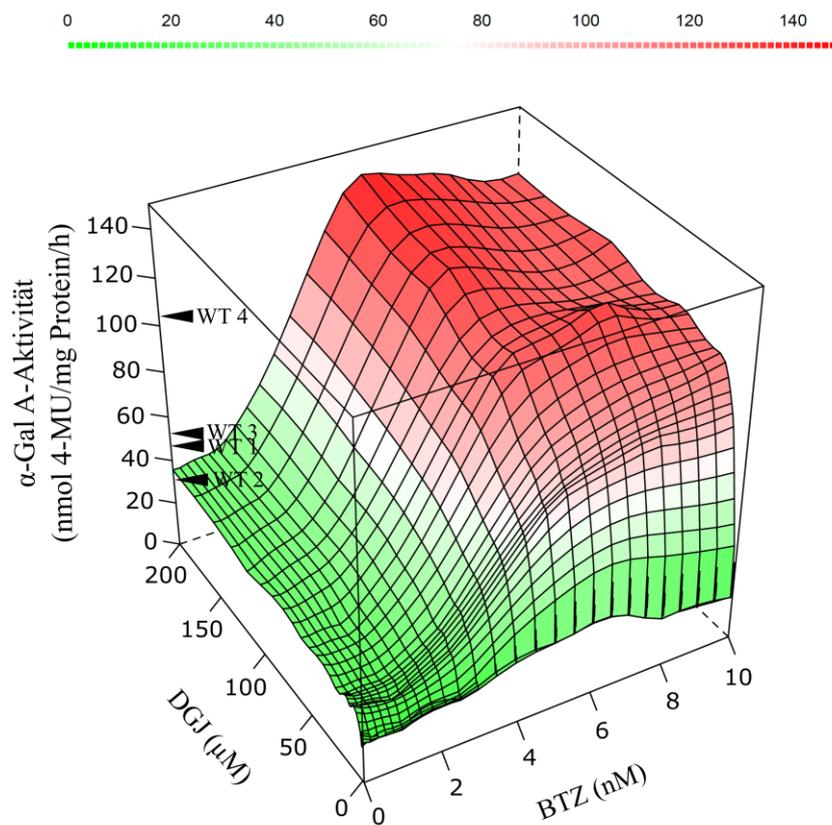


Abbildung 3.6: Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Kombinationsbehandlung mit DGJ und BTZ. $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 5 Tage mit einer Kombination aus dem PC DGJ und dem PR BTZ behandelt, gefolgt von einer Auswaschung beider Substanzen für 6 h mit anschließender Aktivitätsmessung der α -Gal A. Die Angabe der Enzymaktivitäten in der Oberflächendarstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen von DGJ und BTZ erfolgte in nmol des Produktes der Enzymreaktion pro mg Protein pro Stunde. Ebenfalls angegeben wurden die endogenen Aktivitäten der α -Gal A in den vier WT-Fibroblastenlinien. Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche.

Wie unter Abschnitt 3.1 beschrieben, lag der Schwellenwert zur physiologischen Aktivität der α -Gal A in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellsystem bei 34,44 nmol 4-MU/ mg Protein/ h. Dieser wurde über das 25 %-Perzentil der bereits beschriebenen Enzymaktivitätswerte in den vier WT-Fibroblastenlinien berechnet. Die DGJ-Einzelbehandlung bewirkte eine Erhöhung der Enzymaktivität in den physiologischen Bereich, allerdings erst bei einer Konzentration von 200 μ M. Mittels der Kombinationsbehandlung mit DGJ und BTZ war es möglich, die Enzymaktivität bereits mit niedrigeren DGJ-Konzentrationen in den physiologischen Bereich zu erhöhen. In der Kombination mit 5 nM BTZ wurde nur 1 μ M DGJ benötigt, um die Aktivität mutanter α -Gal A auf 49,9 nmol 4-MU/ mg Protein/ h in den physiologischen Bereich zu steigern. Umgekehrt sind nur 2,5 nM BTZ notwendig, um in Kombination mit, auch klinisch eingesetzten, 10 μ M DGJ die Aktivität mutanter α -Gal A auf 37,4 nmol 4-MU/ mg Protein/ h und damit in den physiologischen Bereich zu erhöhen.

Um ein genaueres Bild über die Synergie von DGJ und BTZ zu erhalten, wurde eine auf dem BLISS-Independence-Modell basierende Synergie-Analyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.10). Dabei wurden die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung in Prozent der maximal gemessenen Aktivität umgerechnet. Die Enzymaktivitäten der unbehandelten Kontrollzellen wurden dabei von den übrigen Ergebnissen abgezogen, um eine eindeutige Aussage über die tatsächlichen Effekte der Substanzen treffen zu können. Die Differenz zwischen dem hypothetischen additiven Effekt nach Kombinationsbehandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und dem tatsächlich erreichten Effekt der Substanzkombination stellt dabei den Synergie-Wert dar. Ist der Synergie-Wert negativ, handelt es sich um eine antagonistische Wirkung beider Substanzen. Bei einem Synergie-Wert von Null liegt ein additiver Effekt beider Substanzen vor. Dementsprechend weist ein positiver Synergie-Wert auf eine Synergie beider Wirkstoffe hin. Abbildung 3.7 macht die hohen Synergie-Werte für die Behandlungen mit DGJ und BTZ deutlich, welche mit zunehmenden Einzelkonzentrationen beider Substanzen ansteigen. Die größten Synergien wurden mit den Kombinationen aus 50 μ M DGJ und 7,5 nM BTZ bzw. 200 μ M DGJ und 5 nM BTZ erreicht.

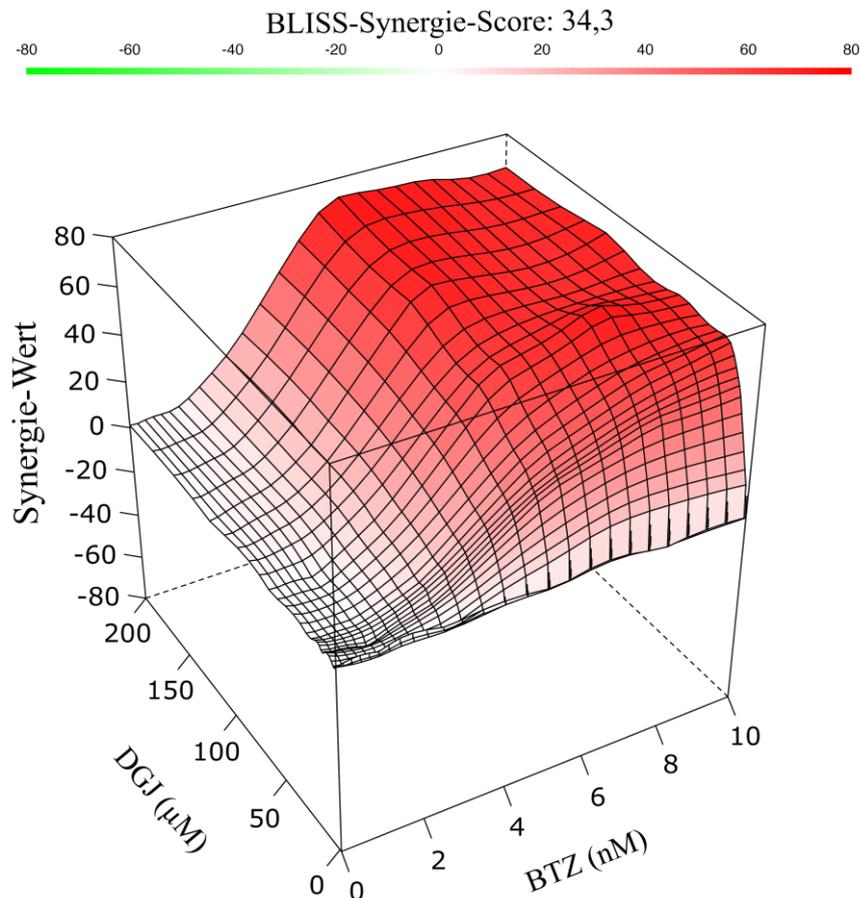


Abbildung 3.7: Synergistische Effekte von DGJ und BTZ. *GLA^{p.R301Q/o}*-Fibroblasten wurden für 5 Tage mit einer Kombination aus DGJ und BTZ in verschiedenen Konzentrationen behandelt, gefolgt von einer Auswaschung beider Substanzen für 6 h mit anschließender Messung der Aktivität der α -Gal A. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die maximal gemessene Aktivität und die Ermittlung und Visualisierung der Synergie-Werte jeder Kombinationsbehandlung mittels dem R-Paket “synergyfinder“. Die Differenz zwischen dem tatsächlich erreichten Effekt der Substanzkombination und dem hypothetischen additiven Effekt stellt dabei den Synergie-Wert dar (*excess over bliss, eob*). Für den *eob* gilt folgendes: $eob > 0$: synergistisches Verhalten beider Substanzen, $eob = 0$: additives Verhalten, $eob < 0$: antagonistisches Verhalten. Der BLISS-Synergie-Score stellt dabei den Mittelwert aller einzeln berechneten Synergie-Werte dar. Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche.

3.4 Erhöhung der Proteinmenge an α -Gal A in *GLA^{p.R301Q/o}*-Fibroblasten durch BTZ

Eine erhöhte Enzymaktivität sollte mit einer verbesserten Prozessierung und Maturierung der mutanten α -Gal A einhergehen. Wie einleitend bereits beschrieben, durchläuft die α -Gal A einen komplizierten Faltungs- und Transportprozess in der Zelle, bis sie an den Wirkort gelangt. Am Beispiel von DGJ und BTZ wurde eine quantitative Analyse der erhöhten intrazellulären Proteinmenge der α -Gal A mittels Western Blot und Glykosylierungsanalyse durchgeführt.

Hierfür wurden WT1- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten für 5 Tage mit DGJ und BTZ behandelt mit anschließender 6-stündiger Auswaschung der Wirkstoffe (vgl. Abschnitt 2.6.1). Dabei war die Menge an α -Gal A in den Morbus Fabry-Fibroblasten im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten WT1-Fibroblasten deutlich reduziert (Abbildung 3.8). Die Behandlung der Morbus Fabry-Fibroblasten mit DGJ führte zu einer Steigerung der Menge an α -Gal A im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit BTZ führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Proteinmenge. Die kombinierte Behandlung mit DGJ und BTZ konnte die intrazelluläre Menge an α -Gal A über den Level der WT1-Fibroblasten hinaus steigern. Damit konnte mittels Kombinationsbehandlung aus 50 μ M DGJ und 5 nM BTZ die Proteinmenge mutanter α -Gal A vollständig wiederhergestellt werden.

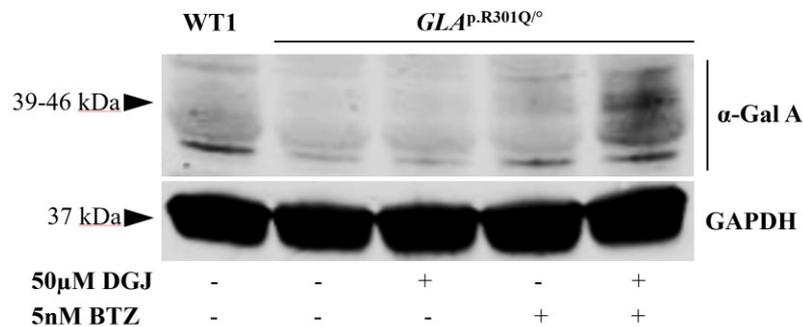


Abbildung 3.8: Erhöhung der Proteinmenge mutanter α -Gal A durch DGJ und BTZ. WT1- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 5 Tage mit 50 μ M DGJ und 5 nM BTZ behandelt, gefolgt von einer Auswaschung beider Substanzen für 6 h. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse der Proteinmenge an α -Gal A durchgeführt. GAPDH diente als interne Ladekontrolle. Es konnte eine verminderte Proteinmenge an α -Gal A in den Morbus Fabry-Fibroblasten im Vergleich zur WT1-Linie festgestellt werden, welche durch Behandlung mit DGJ und BTZ über das WT-Niveau hinaus erhöht wurde. Der dargestellte Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Auf Grund unterschiedlicher Glykosylierungen der maturierenden α -Gal A wurde diese nicht als distinkte Bande im Western Blot deutlich. Um eine verbesserte Quantifizierung aller α -Gal A-Spezies der Zelle zu erhalten, wurde vor dem Western Blot ein PNGase F-Verdau der Zelllysate vorgenommen (vgl. Abschnitt 2.6.4). Dadurch wurden die N-Glykane der in den Proben enthaltenen Proteine entfernt. Die in Abbildung 3.8 deutlich werdenden verschiedenen Spezies der α -Gal A waren nach dem Verdau verschwunden, so dass die α -Gal A im Western Blot als distinkte Bande deutlich wurde (Abbildung 3.9 A).

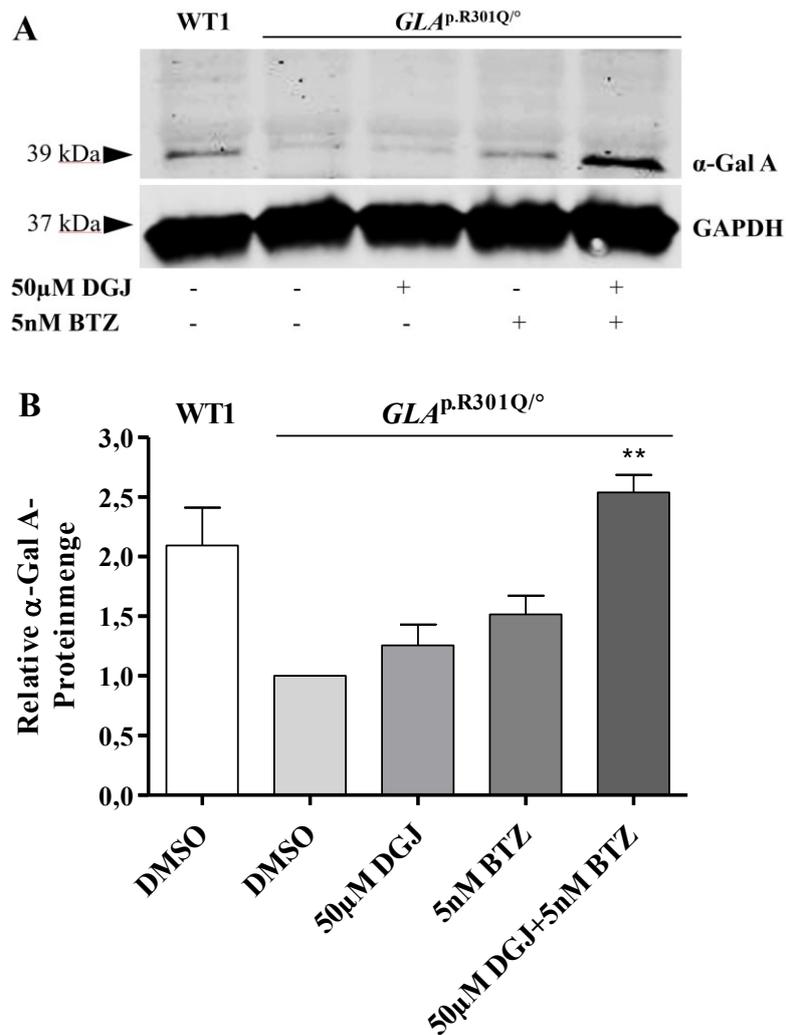


Abbildung 3.9: Proteinmengen an α -Gal A in WT1- und *GLA*^{p.R301Q/°}-Fibroblasten nach PNGase F-Verdau. WT1- und *GLA*^{p.R301Q/°}-Fibroblasten wurden für 5 Tage mit 50 μ M DGJ und 5 nM BTZ behandelt mit anschließender Auswaschung beider Substanzen für 6 h. Es folgte ein PNGase F-Verdau der Zellysate und eine Western Blot-Analyse der Proteinmenge an α -Gal A. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der α -Gal A-Banden auf die der jeweiligen GAPDH-Bande normalisiert. (A) Durch die Deglykosylierung mit PNGase F zeigten sich distinkte Banden der α -Gal A. Die Verhältnisse der Proteinmengen waren mit denen ohne Verdau vergleichbar. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Quantifizierung von α -Gal A in WT1- und Morbus Fabry-Fibroblasten nach PNGase F-Verdau. Die Normierung und die Angabe der Signifikanz erfolgte in Bezug auf die unbehandelten *GLA*^{p.R301Q/°}-Fibroblasten. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Proteinmenge an α -Gal A nach Behandlung mit DGJ und BTZ gezeigt werden (Mittelwert \pm SD, ** $p < 0,01$; $n = 3$).

Die Quantifizierung der α -Gal A-Banden nach PNGase F-Verdau zeigte eine 0,50-fach verminderte Menge an α -Gal A in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den WT1-Fibroblasten (Abbildung 3.9 B). Die Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit 50 μ M DGJ bzw. 5 nM BTZ führten zu einer Erhöhung der Menge mutanter α -Gal A auf das 1,26- bzw. das 1,52-Fache im Vergleich zu den unbehandelten $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. Die kombinierte Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit 50 μ M DGJ und 5 nM BTZ steigerte die Menge an α -Gal A auf das 2,54-Fache.

3.5 Senkung endogener lyso-Gb3-Level in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch BTZ

Um den Einfluss von PRs auf die Pathophysiologie von Morbus Fabry zu untersuchen, wurde exemplarisch geprüft, ob BTZ in der Lage ist, den erhöhten lyso-Gb3-Level in Morbus Fabry-Fibroblasten zu reduzieren. Dafür wurden $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten für 7 Tage bzw. 14 Tage mit 50 μ M DGJ, 5 nM BTZ bzw. einer Kombination beider Wirkstoffkonzentrationen behandelt, gefolgt von einer Auswaschung der Substanzen für 4 Tage (vgl. Abschnitt 2.7). Die Notwendigkeit der Auswaschung von DGJ wurde in Vorversuchen bestätigt. Dabei bewirkte eine DGJ-Behandlung für 7 Tage kombiniert mit 3 Tagen Auswaschung (analog einer bereits veröffentlichten Studie, vgl. Abschnitt 2.7) noch keine Veränderung der lyso-Gb3-Level (n=3, Daten nicht gezeigt), so dass die Auswaschung auf 4 Tage erhöht wurde. Für das 11-tägige Behandlungsschema konnte zwar nach Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit 50 μ M DGJ eine geringe Reduktion der intrazellulären lyso-Gb3-Menge auf das 0,90-Fache gezeigt werden (Abbildung 3.10 A), diese wies jedoch keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (DMSO) auf. Die Behandlung mit BTZ reduzierte in diesem Behandlungsschema den lyso-Gb3-Level signifikant auf das 0,68-Fache. Die Kombination von DGJ und BTZ konnte eine 0,51-fache Reduktion bewirken.

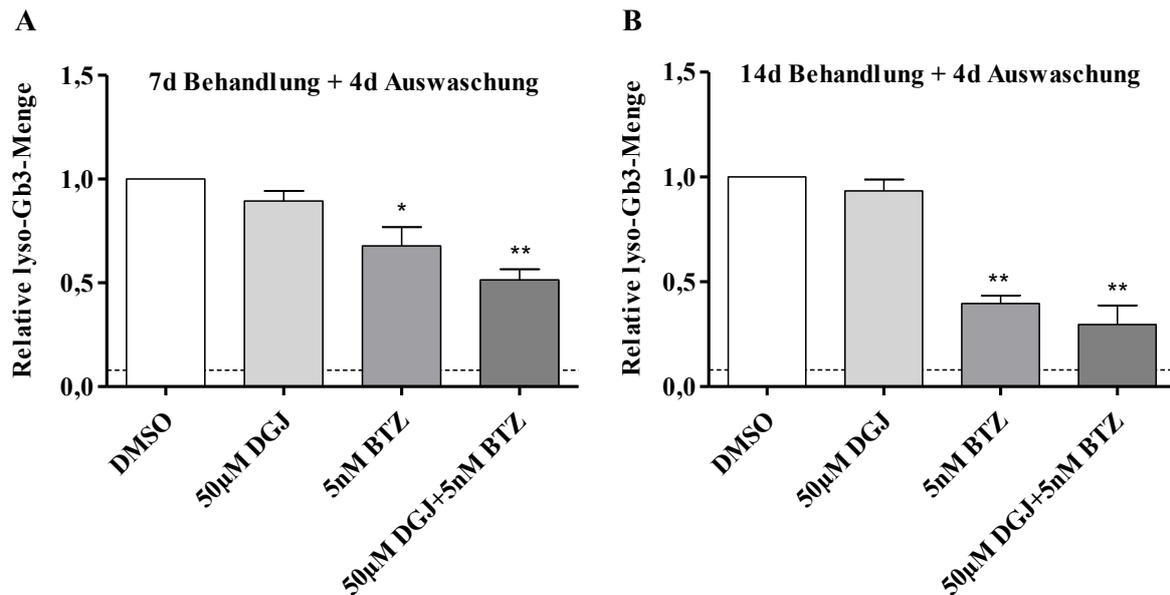


Abbildung 3.10: Effekte von DGJ und BTZ auf endogene lyso-Gb3-Level in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 7 Tage (A) bzw. 14 Tage (B) mit 50 μ M DGJ oder/ und 5 nM BTZ behandelt. Die Substanzen wurden für 4 Tage ausgewaschen mit anschließender massenspektrometrischer Bestimmung der lyso-Gb3-Menge in den Proben. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die unbehandelte Kontrolle. Die gestrichelte Linie markiert die lyso-Gb3-Menge in WT1-Fibroblasten. Die BTZ-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion des lyso-Gb3-Levels in Morbus Fabry-Fibroblasten. Dieser Effekt konnte durch eine verlängerte Behandlungsdauer bzw. durch die Kombination mit DGJ verstärkt werden. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3-4$)

Die Verwendung des 18-tägigen Behandlungsschemas zeigte keine Änderung des mittels 11-tägigem Behandlungsschema erzielten DGJ-Effektes. Dieser betrug nach 14 Tagen Behandlung und 4 Tagen Auswaschung das 0,93-Fache der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.10 B). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem des 11-tägigen Behandlungsschemas und legt nahe, dass die Länge der DGJ-Auswaschungsphase eher als die Länge der Behandlungsphase über den Behandlungserfolg entscheidet. Die Inkubation mit BTZ bewirkte in diesem Behandlungsschema erneut eine signifikante Reduktion der lyso-Gb3-Menge, in diesem Fall auf das 0,40-Fache für die Einzelbehandlung bzw. auf das 0,30-Fache für die Kombinationsbehandlung mit DGJ. Auch in der Kombinationsbehandlung zeigte sich, dass die Dauer der Inkubation mit DGJ keinen Einfluss auf den kombinatorischen Effekt beider Substanzen hat. Die beobachteten Effekte von BTZ zeigten auch nach 18 Tagen noch keine Normalisierung des lyso-Gb3-Levels. Die Ergebnisse nach Verlängerung der Behandlung weisen aber darauf hin, dass das Potential einer möglichen BTZ-Langzeittherapie noch nicht ausgeschöpft ist.

Um die Kinetik der lyso-Gb3 Reduktion in ein Verhältnis zur Kinetik der Enzymaktivitätssteigerung in den Zellen unter Beeinflussung durch DGJ und BTZ zu setzen, wurden die Enzymaktivitätsmessungen nach 14 Tagen Wirkstoffinkubation wiederholt. Um die Kinetik der Auswaschung zu berücksichtigen, wurde die Inkubation in Relation zu den lyso-Gb3-Analysen mit 4 Tagen Auswaschung bzw. in Relation zu den bisherigen Enzymaktivitätsmessungen mit 6 h Auswaschung kombiniert. Beim 18-tägigen Behandlungsschema zeigte sich, dass die Effekte von 50 μ M DGJ bzw. der Kombinationsbehandlung mit 50 μ M DGJ und 5 nM BTZ auf die Enzymaktivität mit einer 1,64-fachen bzw. einer 6,81-fachen Erhöhung (Abbildung 3.11) vergleichbar mit den entsprechenden Effekten nach 5 Tagen Behandlung und 6 h Auswaschung waren (vgl. Abschnitt 3.3/ Abbildung 3.5). Weiterhin wurde deutlich, dass die 14-tägige Behandlung mit 5 nM BTZ kombiniert mit 4 Tagen Auswaschung der Substanz keinen nachweislichen Effekt zum Zeitpunkt der Enzymaktivitätsmessung hatte, womit offenbar der BTZ-Effekt (vgl. Abschnitt 3.3/ Abbildung 3.5) durch die lange Auswaschungsphase verschwand.

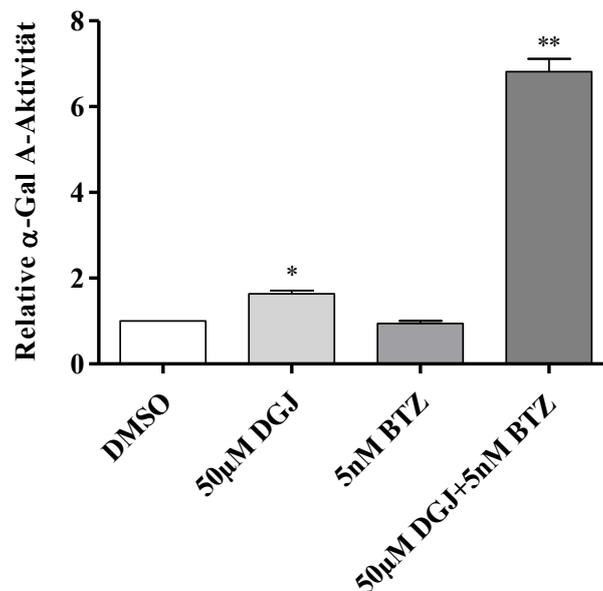


Abbildung 3.11: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nach 18 Tagen. $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 14 Tage mit 50 μ M DGJ oder/ und 5 nM BTZ behandelt. Die Substanzen wurden für 4 Tage ausgewaschen. Anschließend wurde die Aktivität der α -Gal A bestimmt. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die unbehandelte Kontrolle. Die Effekte von DGJ sowie der Kombinationsbehandlung mit DGJ und BTZ waren mit denen nach 5 Tagen und 6 h Auswaschung vergleichbar. Der BTZ-Effekt blieb aus (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3$).

Um zu prüfen, ob die 4-tägige Auswaschung von BTZ dessen Effekt auf die Aktivität mutanter α -Gal A maskierte, wurden die $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten für 14 Tage mit 50 μ M DGJ, 5 nM BTZ bzw. einer Kombination beider Wirkstoffkonzentrationen behandelt, kombiniert mit einer Auswaschungsdauer von 6 h, analog den Enzymaktivitätsbestimmungen in den Abschnitten 3.2 und 3.3. Der DGJ-Effekt war nach diesem Behandlungsschema vergleichbar mit den Effekten nach 5-tägiger Behandlung und 6 h Auswaschung bzw. nach 14-tägiger Behandlung und 4 Tagen Auswaschung (vgl. Abbildung 3.12). Daher scheint der Einfluss von DGJ auf die Enzymaktivität unabhängig von den verwendeten Behandlungs- oder Auswaschungszeiten zu sein. Der BTZ-Effekt ist nach 14 Tagen Behandlung und 6 h Auswaschung vergleichbar mit den Ergebnissen nach 5 Tagen Behandlung und 6 h Auswaschung. Interessanterweise übertraf der Kombinationseffekt aus DGJ und BTZ die bisher beobachtete ca. 7-fache Erhöhung der Aktivität der α -Gal A in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten um ein Vielfaches und erzeugte eine 23,9-fache Erhöhung der Aktivität der α -Gal A im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese auffällige Aktivitätserhöhung erklärt die ausgeprägte Reduktion der lyso-Gb3-Ansammlung nach 14-tägiger Behandlung (vgl. Abbildung 3.10 B).

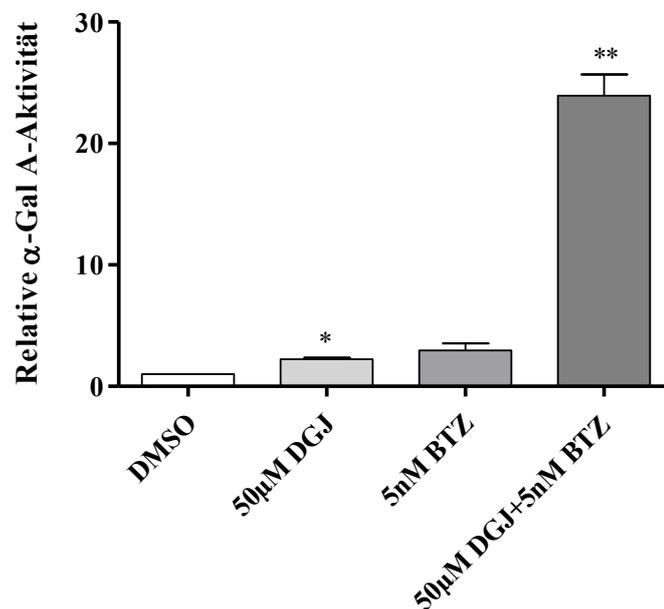


Abbildung 3.12: Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nach 14 Tagen. $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 14 Tage mit 50 μ M DGJ oder/ und 5 nM BTZ behandelt. Die Substanzen wurden für 6 h ausgewaschen. Anschließend wurde die Aktivität der α -Gal A bestimmt. Es erfolgte eine Normierung der Enzymaktivitäten auf die unbehandelte Kontrolle. Der nach 14-tägiger Behandlung und 4-tägiger Auswaschung ausgebliebene BTZ-Effekt konnte erneut beobachtet werden. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3$)

3.6 DGJ und PRs mit unterschiedlichen Effekten auf die proteasomale Aktivität

Da es sich bei drei der effektiven PRs um proteasomale Inhibitoren handelt, sollten die Einflüsse aller effektiven PRs auf die proteasomale Aktivität untersucht werden. Ziel war es, eine Charakterisierung der positiven Wirkung der PRs vorzunehmen, indem der Einfluss der proteasomalen Hemmung auf die Enzymaktivität mutanter α -Gal A untersucht wurde. Hierfür wurden *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten für 2 h mit den effektivsten Konzentrationen der Wirkstoffe behandelt, woraufhin die proteasomale Aktivität der Zellen gemessen wurde (vgl. Abschnitt 2.9). Die Behandlungen mit DGJ bzw. ABX hatten keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität (Abbildung 3.13). Auch EerI bewirkte in seiner effektivsten Konzentration keine proteasomale Inhibition, dafür aber eine signifikante Induktion der Aktivität aller drei proteasomalen Untereinheiten. Der irreversible proteasomale Inhibitor CLC bewirkte eine signifikante Reduktion der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität auf 1,5 % der unbehandelten Zellen und eine Verringerung der Trypsin-ähnlichen Aktivität auf 38,1 %. Die reversiblen proteasomalen Inhibitoren MG132 und BTZ zeigten auf die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität eine inhibierende Wirkung auf 19,8 % bzw. auf 56,5 % der jeweiligen DMSO-Kontrolle.

Es wurde interessanterweise festgestellt, dass die Wirkungen der effektiven Substanzen auf das Proteasom sehr unterschiedlich waren. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass BTZ in höheren Konzentrationen das Proteasom stärker hemmte. Dabei bewirkten 20 nM BTZ bzw. 50 nM BTZ eine Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität auf 7,1 % bzw. auf 3,4 % der jeweiligen DMSO-Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Die fast vollständige Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität mittels BTZ belegt dessen Funktionalität im verwendeten Zellsystem. Gleichzeitig zeigen diese Konzentrationen allerdings keinen positiven Effekt auf die Aktivität der α -Gal A. Dies kann einerseits mit toxischen Effekten auf die Zellen zu tun haben, andererseits auch ein Hinweis darauf sein, dass die Hemmung des Proteasoms zwar ein wichtiger, keinesfalls aber der einzige Aspekt der Substanzwirkung auf die Enzymaktivität ist. Diese These wird dadurch weiter unterstützt, dass für Celastrol ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.13 C), allerdings kein positiver Effekt auf die α -Gal A-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

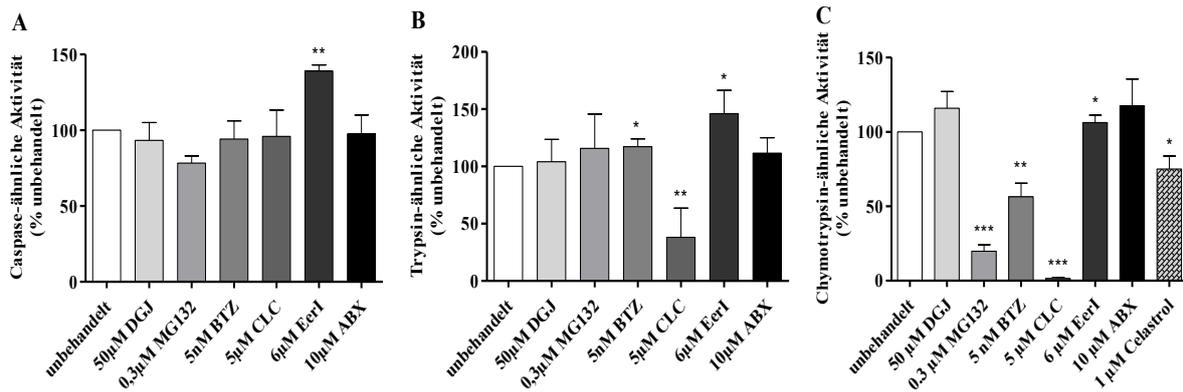


Abbildung 3.13: Einfluss von DGJ und PRs auf die proteasomale Aktivität. *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 2 h mit DGJ bzw. einem PR behandelt, woraufhin die proteolytische Aktivität der drei proteasomalen Untereinheiten gemessen wurden. Dazu gehören die Caspase-ähnliche (A), Trypsin-ähnliche (B) und Chymotrypsin-ähnliche (C) Aktivität des Proteasoms. Es erfolgte eine Normierung der proteasomalen Aktivitäten auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle. MG132, BTZ und CLC bewirkten in den effektiven Konzentrationen eine signifikante Reduktion der proteasomalen Aktivität (Mittelwert ± SD, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 3-6).

3.7 DGJ und PRs mit unterschiedlichen Effekten auf die *GLA*-Expression

Ein möglicher therapeutischer Ansatz, um die Proteinfunktion in genetischen Proteinfaltungserkrankungen zu verbessern, beinhaltet die Expressionserhöhung des mutierten Gens. Daher wurde untersucht, ob die effektiven PRs die *GLA*-Expression in *GLA*^{p.R301Q/o}- bzw. in WT1-Fibroblasten erhöhen. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit den für die Erhöhung der Enzymaktivität effektivsten Konzentrationen der PRs behandelt und der *GLA*-mRNA-Level mittels qRT-PCR bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8). Dabei waren die Effekte der Wirkstoffe auf die Expression des *GLA*-Gens in *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit denen in WT1-Fibroblasten vergleichbar (Abbildung 3.14). DGJ und ABX zeigten keinen Einfluss auf die *GLA*-Expression. Hingegen induzierten MG132 und BTZ gleichermaßen die Expression mutanter bzw. WT-*GLA* auf das 8-Fache bzw. das 7-Fache der DMSO-Kontrolle. CLC bewirkte eine Erhöhung des *GLA*-mRNA-Levels in *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten auf das 9,2-Fache und in WT1-Fibroblasten auf das 6,6-Fache. EerI erhöhte die *GLA*-Expression 5,4-fach in *GLA*^{p.R301Q/o}- und 4,6-fach in WT1-Fibroblasten. Interessant auch hier, dass die Behandlung beider Zelllinien mit dem PR Celestrol, welches keinen positiven Einfluss auf die Aktivität der α-Gal A besitzt, zu einer signifikanten Erhöhung der *GLA*-Expression auf das 2,6-Fache in *GLA*^{p.R301Q/o}- und das 4,6-Fache in WT1-Fibroblasten führte.

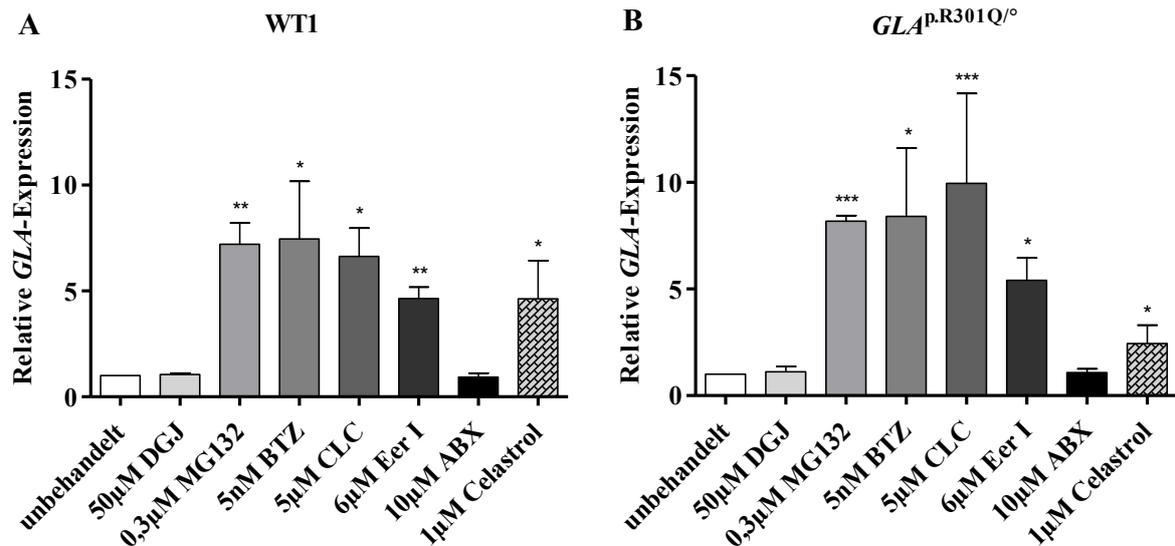


Abbildung 3.14: Einfluss von DGJ und PRs auf die *GLA*-Expression. (A) WT1- und (B) *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 24 h mit DGJ bzw. den effektivsten Konzentrationen der PRs behandelt mit anschließender Bestimmung des *GLA*-mRNA-Levels mittels qRT-PCR. Für das hinsichtlich der Aktivität mutanter α -Gal A negativ getestete Celastrol wurde eine in Fibroblastenzellen von Morbus Gaucher-Patienten als effektiv getestete Konzentration eingesetzt (vgl. Tabelle 2.4). Es erfolgte eine Normierung der behandelten Zellen auf die unbehandelte Kontrolle. MG132, BTZ, CLC, EerI und Celastrol bewirkten in den effektivsten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der *GLA*-Expression (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3-5$).

3.8 Erstellung eines Proteostase-Schemas

Um gezielt den Einfluss der PRs auf die Proteostase zu untersuchen, sollte zunächst ein Überblick über die Proteostasekomponenten und deren Funktion geschaffen werden. Die entsprechende Liste an Proteostasegenen wurde manuell erstellt (vgl. Abschnitt 2.12). Hierfür wurden Proteostase-assoziierte Gene aus der Literatur recherchiert, mittels den Datenbanken UniProt und HGNC sowie den im QuickGO-Browser (EMBL-EBI) enthaltenen *Gene Ontology*-(GO)-Annotationen abgeglichen und für die Herstellung eines Interaktionsnetzwerkes (Abbildung A.1) verwendet (vgl. Abschnitt 2.12). In die Erstellung des Netzwerkes wurden Gene außerhalb der bis dahin bestehenden Proteostasegenliste einbezogen, um die Konnektivität zu verbessern. Diese wiederum wurden auf ihre Proteostase-Zugehörigkeit geprüft und ggf. der Proteostasegenliste zugefügt. Wie im Abschnitt 2.12 erläutert, wurde die Proteostasegenliste über verschiedene zusätzliche Schritte erweitert. Insgesamt konnten 357 Proteostasekomponenten zusammengestellt werden. Sie sind mit ihrem HGNC-Symbol, ihrer HGNC-ID und den

dazugehörigen UniProt-Proteinennamen in Tabelle A.12 aufgelistet. Die 254 eingruppierten Proteine wurden in einem Proteostase-Schema (Abbildung 3.15) dargestellt, welches der späteren visuellen Analyse der Microarray-Ergebnisse diente. Sie wurden hinsichtlich ihrer biologischen Funktion innerhalb der Proteostase gruppiert und umfassen die Synthese, Prozessierung und die Degradation von ER-assoziierten Proteinen.

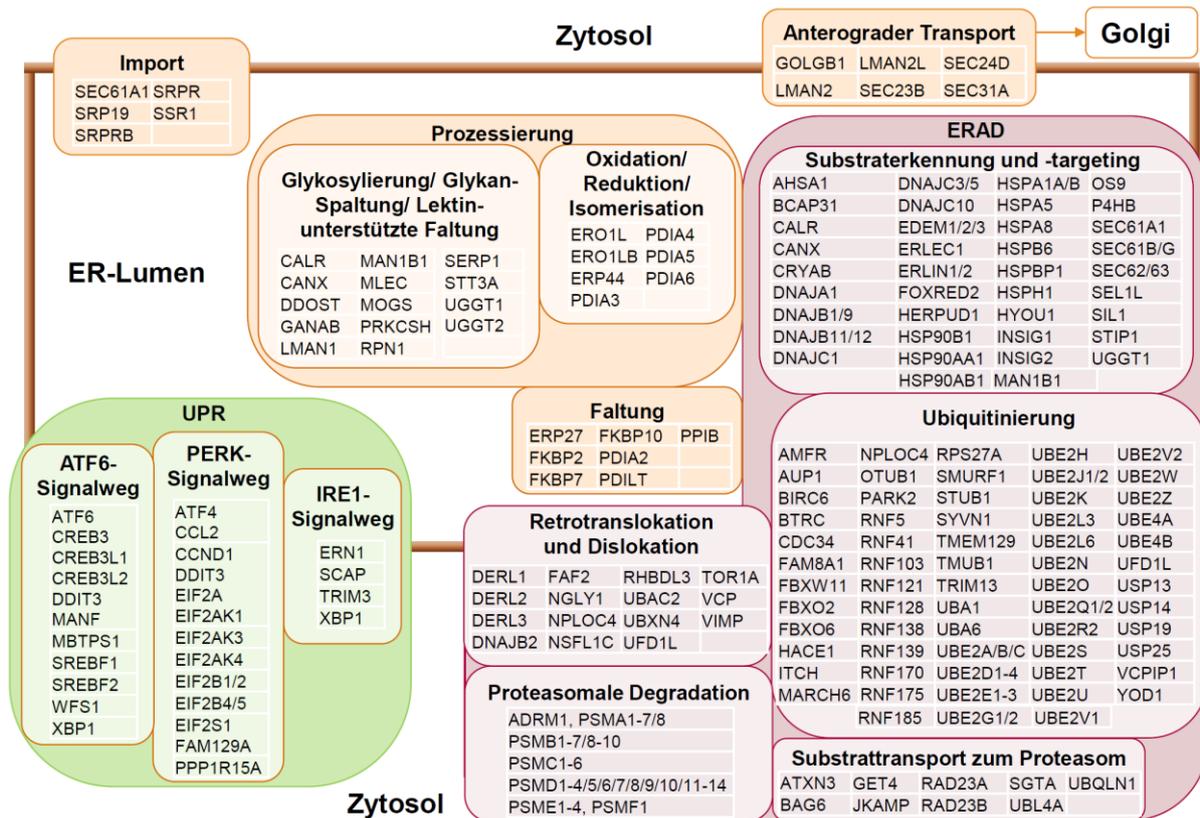


Abbildung 3.15: Proteostase-Schema. Proteostase-assoziierte Gene wurden mittels Literaturrecherche und unter Verwendung verschiedener Datenbanken wie HGNC, UniProt und String sowie den GO-Browsern AmiGO und QuickGO manuell aufgelistet und validiert. Auf Grundlage von Publikationen sowie Datenbankenabfragen wurden die Gene hinsichtlich ihrer biologischen Funktion innerhalb der Proteostase gruppiert. Hierbei traten Redundanzen auf, da viele Gene mehrere biologische Funktionen ausüben.

3.9 Vergleich der Genexpressionen in WT- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten

In einem Vorversuch für die Generierung der transkriptionellen Signaturen der PRs sollten zunächst die Genexpressionen in WT- und in Morbus Fabry-Fibroblasten untersucht und verglichen werden. Hierfür wurde sowohl die globale Genexpression analysiert als auch die Expression Proteostase-assoziiierter Gene. Dabei sollte geklärt werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten spezifische Veränderungen auf Transkriptomebene aufweisen,

welche in der Bewertung des Effektes von PRs auf die Genexpression berücksichtigt werden sollten und ob eine molekulare Schädigung, z. B. in Form von ER-Stress, vorliegt. WT- sowie $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden hierfür für 48 h kultiviert und anschließend für die Bestimmung der mRNA-Level aller Gene mittels Microarray verwendet (vgl. Abschnitt 2.11.1). Um einen ersten Überblick über die Expression der 30.905 auf dem Array annotierten Gene zu erhalten, wurde mittels des Programmes R eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.11.2). Dabei bildeten die Expressionsdaten fünf distinkte Cluster, d. h. eines pro Zelllinie, was auf die Reproduzierbarkeit der Gensignaturen hinweist (Abbildung 3.16). Eine der mit Wildtyp 3 (WT3) hergestellten Proben präsentierte sich während der Qualitätskontrolle der Arrays als Ausreißer und wurde daher aus der Analyse ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass in der globalen Transkriptomanalyse keine klare Trennung zwischen den Morbus Fabry-Fibroblasten und den WT-Linien erkennbar ist.

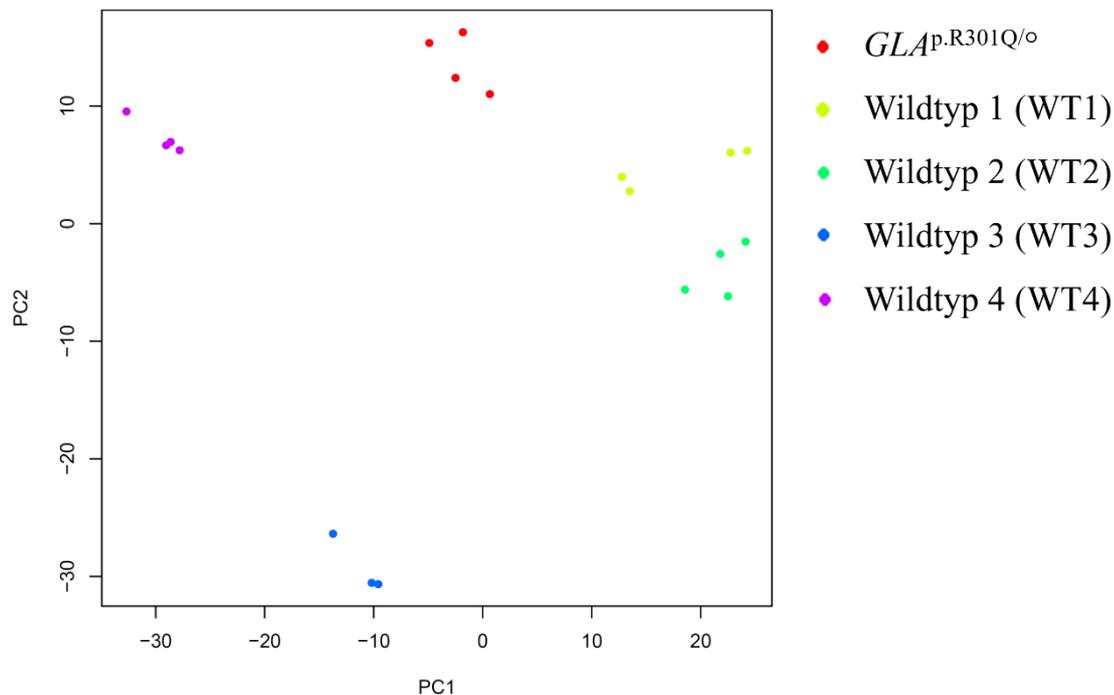


Abbildung 3.16: Vergleich der globalen Genexpression in WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 48 h in Fibroblasten-Medium kultiviert, woraufhin die Bestimmung der mRNA-Level mittels GeneChip[®] Human Transcriptome Arrays 2.0 erfolgte. Die PCA wurde mittels des Programmes R auf Grundlage der 30.905 auf dem GeneChip annotierten Gene durchgeführt. Proben derselben Zelllinie gruppierten sich zusammen. Es wurde keine Separation der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten auf Grundlage einer unterschiedlichen globalen Genexpression im Vergleich zu den vier WT-Linien deutlich. PC: *Principal Component* (dt. Hauptkomponente)

Um einen Überblick darüber zu erhalten, ob und zu welchem Grad die globale Genexpression in Morbus Fabry-Fibroblasten verändert ist, wurde diese mit den Genexpressionen der vier WT-Fibroblastenlinien verglichen. Die insgesamt fünf humanen Fibroblastenlinien waren geschlechts- und altersstandardisiert. Es zeigte sich, dass im Vergleich zur $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblastenlinie in den WT1-Fibroblasten 449 Gene schwächer und 381 Gene stärker exprimiert waren. Eine vergleichbare Anzahl an differenziell exprimierten Genen findet sich auch in den WT2-, WT3- und WT4-Fibroblasten (Tabelle 3.1), so dass diese Expressionsunterschiede zu allen vier WT-Linien auftraten. Eine differenzielle Genexpression wurde dabei definiert als > 1,5-fach verschiedene Expression bei einem adjustierten p-Wert von $p < 0,05$. Der Großteil der globalen Genexpression war unverändert in den WT-Linien im Vergleich zu den Morbus Fabry-Fibroblasten.

Tabelle 3.1: Anzahl differenziell exprimierter Gene in WT-Fibroblasten im Vergleich zu $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Zelllinie \ Genexpression	WT1	WT2	WT3	WT4
Schwächer	449	520	600	511
Unverändert	30075	30068	29846	29885
Stärker	381	317	459	509

Um zu prüfen, ob jeweils die gleichen Gene in den WT-Linien differenziell exprimiert waren im Vergleich zur Morbus Fabry-Zelllinie, wurden die verschieden exprimierten Gene hinsichtlich ihrer Überlappungen untersucht. Die VENN-Diagramme in Abbildung 3.17 zeigen die Anzahl differenziell exprimierter Gene in den WT-Linien im Vergleich zu den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. Hierbei wurde die Anzahl stärker bzw. schwächer exprimierter Gene separat angegeben. Die Summe aus der im entsprechenden VENN-Diagramm angegebenen Anzahl stärker und schwächer exprimierter Gene entsprach nicht exakt der Gesamtzahl aller regulierten Gene, da einige Gene in einer WT-Linie hoch- und in einer anderen WT-Linie herunterreguliert waren. Es wurde deutlich, dass es sowohl bei den stärker als auch bei den schwächer exprimierten Genen zu verhältnismäßig wenig Überlappungen zwischen den WT-Linien kam und der Großteil der differenziell exprimierten Gene individuell von der untersuchten WT-Linie abhing. Dies deutet darauf hin, dass die transkriptionellen Unterschiede zwischen den $GLA^{p.R301Q/o}$ - und den WT-Fibroblasten durch natürliche (epi-)genetische Variationen zwischen humanen Individuen begründet sind.

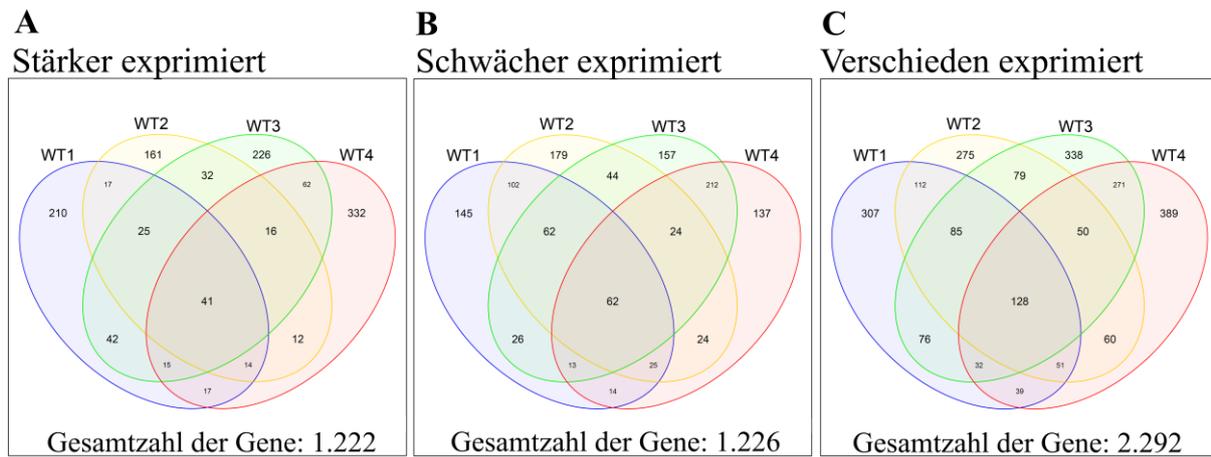


Abbildung 3.17: Vergleich der Expressionsmuster differenziell exprimierter Gene in WT-Fibroblasten. WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 48 h in Fibroblasten-Medium kultiviert, woraufhin die Bestimmung der mRNA-Level mittels GeneChip® Human Transcriptome Arrays 2.0 erfolgte. Die globale Genexpression innerhalb der WT-Linien wurde mit der Genexpression innerhalb der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten verglichen und die jeweils verschieden exprimierten Gene gegenübergestellt. Dabei wurden die in den WT-Linien stärker (A) bzw. schwächer exprimierten Gene (B) sowie alle differenziell exprimierten Gene (C) betrachtet. Differenzielle Genexpression wurde definiert als ein > 1,5-facher Unterschied bei einem adjustierten p-Wert von $p < 0,05$.

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob die verschiedenen Genexpressionen auf der GLA -Mutation in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten basieren oder durch die natürlich vorkommende genetische Variabilität zwischen menschlichen Individuen bedingt sind. Hierfür wurde jede der vier WT-Linien mit den verbleibenden vier Fibroblastenlinien hinsichtlich Genexpressionsunterschiede untersucht. Die VENN-Diagramme in Abbildung 3.18 zeigen die Anzahl differenziell exprimierter Gene in der jeweiligen WT-Linie im Vergleich zu den übrigen vier Fibroblastenlinien. Dabei wurde deutlich, dass die Anzahl differenziell exprimierter Gene mit der vergleichbar ist, welche durch den Vergleich der Morbus Fabry-Fibroblasten mit den vier WT-Linien erhalten wurden. Durch diese Analyse sollte festgestellt werden, ob das für die $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten erhaltene Muster einen Rückschluss auf Morbus Fabry-Spezifität liefern kann. Der Vergleich der Expressionsmuster zeigte, dass die Anzahl differenziell exprimierter Gene aller Linien untereinander vergleichbar war. Hierbei blieb, anders als in der PCA (Abbildung 3.16), die Stärke der Expressionsunterschiede unberücksichtigt. Um diesen Sachverhalt statistisch zu belegen, wurde die Anzahl differenziell exprimierter Gene im Vergleich der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten zu jeder der vier WT-Linien bestimmt. Weiterhin wurde die Anzahl differenziell exprimierter Gene im Vergleich jeder der WT-Linien zu den jeweilig verbleibenden WT-Linien bestimmt. Im nächsten Schritt wurden die drei Werte der differenziell expri-

mierten Gene im Vergleich von z. B. WT1 zu WT2, WT3 und WT4 mit den drei Werten differenziell exprimierter Gene im Vergleich der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten zu WT2, WT3 und WT4 auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft (vgl. Abschnitt 2.14). Der Vorgang wurde für WT2, WT3 und WT4 wiederholt und eine Vergleichbarkeit der Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und allen WT-Linien festgestellt. Daher traten keine transkriptionellen Auffälligkeiten in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten auf und die Zelllinie wies keine epigenetische Abnormalität zu gesunden Probanden auf.

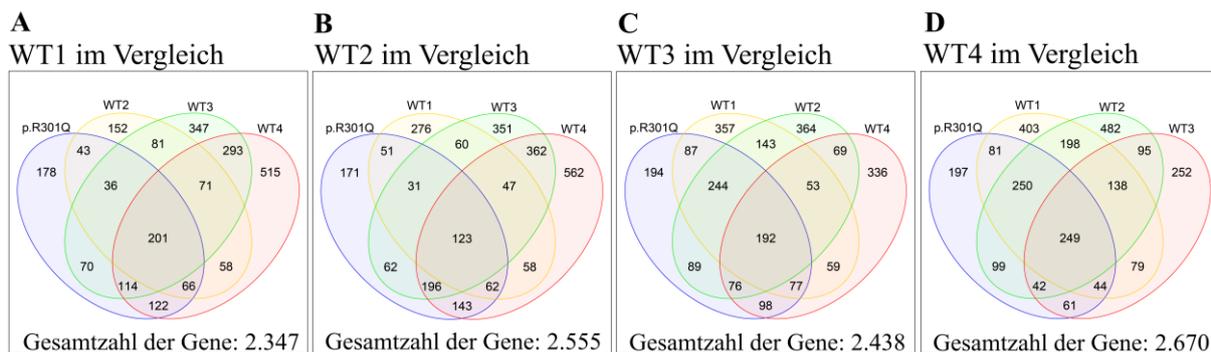


Abbildung 3.18: Vergleich der Expressionsmuster differenziell exprimierter Gene in WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten. WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 48 h in Fibroblasten-Medium kultiviert, woraufhin die Bestimmung der mRNA-Level mittels GeneChip® Human Transcriptome Arrays 2.0 erfolgte. Die globale Genexpression einer WT-Linie wurde mit der Genexpression innerhalb der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und den entsprechend übrigen WT-Linien verglichen, woraufhin die jeweils verschieden exprimierten Gene gegenübergestellt wurden. Dabei wurden die in der Morbus Fabry-Linie und den verbleibenden WT-Linien stärker (A) bzw. schwächer exprimierten Gene (B) sowie alle differenziell exprimierten Gene (C) betrachtet. Die differenzielle Genexpression zwischen den $GLA^{p.R301Q/o}$ - und den WT-Fibroblasten war mit der innerhalb der vier verschiedenen WT-Fibroblasten vergleichbar, so dass keine Morbus Fabry-spezifischen Genexpressionsunterschiede auftraten. Differenzielle Genexpression wurde definiert als ein > 1,5-facher Unterschied bei einem adjustierten p-Wert von $p < 0,05$.

Das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Fehlen von globalen Genexpressionsunterschieden zwischen $GLA^{p.R301Q/o}$ - und WT-Fibroblasten bedeutet nicht, dass nicht durch die Art der Gene (determiniert z.B. durch die Zugehörigkeit zu bestimmten biologischen Prozessen), die in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten unterschiedlich exprimiert sind, doch eine Pathologie vorhanden ist, die auf Grund der Struktur der durchgeführten globalen Expressionsanalyse unentdeckt blieb. Ein möglicher beeinträchtigter biologischer Prozess betrifft die mit ER-Stress assoziierten Gene. Die α -Gal A mit der p.R301Q-Mutation als Stellvertreter der im Proteasom degradierten mutanten α -Gal A-Proteine ist ein potenzieller Auslöser von ER-Stress. Daher sollte

eine genauere Analyse im Hinblick auf die Proteostase-Pathophysiologie durchgeführt werden, unter anderem um möglichen ER-Stress zu identifizieren. Im nächsten Schritt erfolgte also eine vergleichende Analyse zwischen den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und den vier WT-Linien anhand der Expressionsanalyse eines Subclusters von Genen, um eine mögliche spezifische Schädigung der Proteostase der Morbus Fabry-Zellen nachzuweisen, welche in Proteinfaltungserkrankungen phänotypisch auftreten kann. Hierzu wurden 351 der 357 Proteostasegene (vgl. Tabelle A.12) mit ihren Annotationen auf dem GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 identifiziert und für die Analyse verwendet. Abbildung 3.19 zeigt die Anzahl an Proteostasegenen, welche in der jeweiligen WT-Linie stärker bzw. schwächer exprimiert wurden als in den Morbus Fabry-Fibroblasten. Insgesamt wiesen nur 19 Proteostasegene eine unterschiedliche Expression zwischen der Morbus Fabry- und den WT-Linien auf.

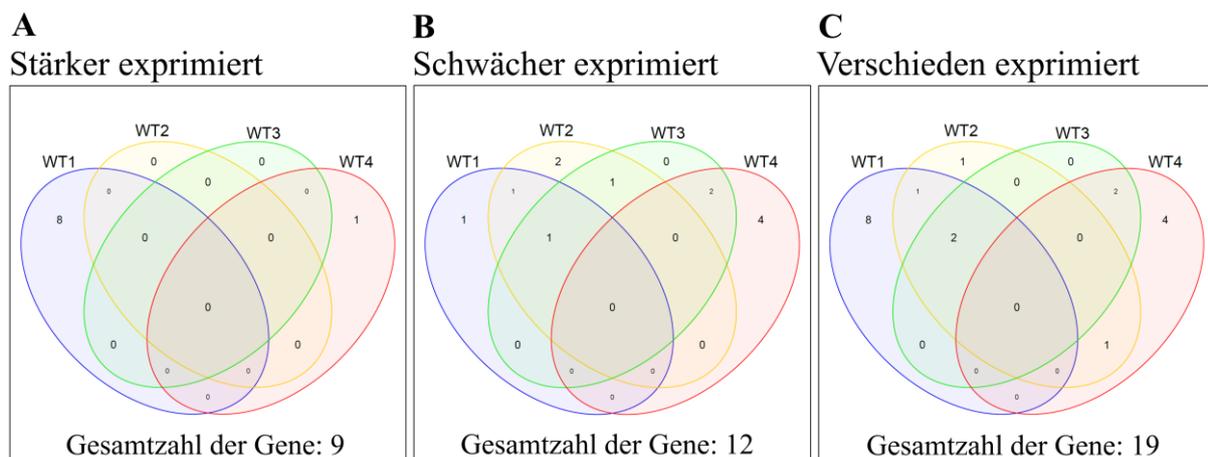


Abbildung 3.19: Vergleich der Expressionsmuster differenziell exprimierter Proteostasegene in WT-Fibroblasten. WT- und $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 48 h in Fibroblasten-Medium kultiviert, woraufhin die Bestimmung der mRNA-Level mittels GeneChip® Human Transcriptome Arrays 2.0 erfolgte. Die Expression von Proteostasegenen wurde zwischen den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und den WT-Linien verglichen. Die jeweils verschieden exprimierten Gene pro WT-Linie wurden gegenübergestellt. Dabei wurden die in den WT-Linien stärker (A) bzw. schwächer exprimierten Gene (B) sowie die Summe aller differenziell exprimierten Gene (C) betrachtet. Keine Proteostasegene waren in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten differenziell exprimiert im Vergleich zu allen WT-Fibroblastenlinien. Differenzielle Genexpression wurde definiert als ein > 1,5-facher Unterschied bei einem adjustierten p-Wert von $p < 0,05$.

Die Namen der mindestens 1,5-fach verschieden exprimierten Gene sind in Tabelle A.13 aufgelistet. Dabei kam es zu keinen einheitlichen Überlappungen der differenziell exprimierten Gene zwischen den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten und den unterschiedlichen WT-Linien. Zieht man in Betracht, dass es sich bei Morbus Fabry um eine Proteinfaltungserkrankung handelt und be-

denkt man die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen pathophysiologischen Veränderungen innerhalb der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten, ist es ein überraschender Befund, dass keine Unterschiede in der Expression Proteostase-assoziiierter Gene zwischen den WT- und den Morbus Fabry-Fibroblasten auftraten. Es konnte mittels dieser Analyse keine Evidenz auf einen genexpressionsbedingten pathophysiologischen Effekt auf die Proteostase gefunden werden. Weitere Analysen, z. B. in Hinblick auf Lipid-Stoffwechsel-assoziierte Gene, wären denkbar.

Weiterhin wurde die Expression des GLA -Gens innerhalb der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit der innerhalb der vier WT-Fibroblastenlinien verglichen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression des GLA -Gens in Bezug auf WT3, allerdings unterhalb des in der vorliegenden Arbeit für die differenzielle Genexpression festgelegten Schwellenwertes von 1,5-fach (Tabelle 3.2). In Bezug auf die übrigen WT-Linien war der Transkriptlevel des GLA -Gens statistisch unverändert. Es wäre denkbar gewesen, dass Kompensationsmechanismen zu einer Hochregulation der GLA -Expression bzw. RNA-Instabilität zu einer Runterregulation der GLA -Expression führen. Diese Analyse zeigt jedoch, dass es zu keiner krankheitsspezifischen Dysregulation der GLA -Expression innerhalb der in der vorliegenden Arbeit verwendeten $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten kam.

Tabelle 3.2: GLA -Expression in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten in Bezug auf WT-Fibroblasten

WT-Fibroblastenlinie	WT1	WT2	WT3	WT4
Relative GLA -Expression in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten	0,89	0,98	1,22	1,06
Adjustierter p-Wert	0,070	0,866	0,008	0,302

3.10 PRs mit starkem Einfluss auf die globale Genexpression

Um die positiven Effekte der PRs auf die α -Gal A detailliert zu charakterisieren, wurden die transkriptionellen Signaturen hinsichtlich der globalen Genexpression (globale transkriptionelle Signaturen, GT-Signaturen) innerhalb der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten nach Behandlung mit DGJ und den PRs untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 50 μ M DGJ und den effektivsten Konzentrationen der PRs behandelt, ihre RNA extrahiert und die mRNA-Menge jeder Probe mittels Microarray-Analyse bestimmt (vgl. Abschnitt 2.11.1/ Tabelle 2.6). Dabei wurden zunächst alle 30.905 auf dem Array annotierten Gene untersucht. Um einen ersten Überblick über die globale Genexpression vor und nach den Behandlungen zu erhalten, wurden

mittels des Programmes R (vgl. Abschnitt 2.11.2) die mindestens 1,5-fach hoch- bzw. herunterregulierten Gene nach Behandlung ermittelt. Dabei hatten DGJ und ABX keinen bedeutsamen Einfluss auf die globale Genexpression (Tabelle 3.3). Währenddessen zeigten MG132 und BTZ mit der Regulation der Expression von 1332 bzw. 1060 Genen den stärksten Einfluss auf das Transkriptom. In den mit CLC und EerI behandelten Zellen wurde eine differenzielle Expression von 471 bzw. 512 Genen beobachtet. Sowohl bei den reversiblen proteasomalen Inhibitoren MG132 und BTZ als auch bei CLC und EerI war dabei die Anzahl der regulierten Gene vergleichbar. Für jede Einzelbehandlung war die Anzahl hochregulierter Gene vergleichbar mit der Anzahl herunterregulierter Gene. Die Kombinationsbehandlung mit DGJ blieb ähnlich der Einzelbehandlung mit DGJ ohne nennenswerten Einfluss.

Tabelle 3.3: Anzahl der regulierten Gene nach Behandlung mit DGJ und/oder PRs

Behandlung Reg. Gene	DGJ	MG132	BTZ	CLC	EerI	ABX	DGJ +MG132	DGJ +EerI	DGJ +ABX
Hochregulierte Gene	0	608	540	247	218	1	731	246	1
Herunterregulierte Gene	0	724	520	224	294	1	668	349	9
Summe aller regulierten Gene	0	1332	1060	471	512	2	1399	595	10

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob und inwieweit die durch die Substanzen ausgelöste Genregulation vergleichbare Muster aufweist, insbesondere in der Fraktion der Proteostase-assoziierten Gene. Zunächst wurden die behandlungsinduzierten globalen Expressionsmuster, d. h. die GT-Signaturen der effektiven Substanzen, hinsichtlich ihrer Überschneidungen an differenziell exprimierten Genen untersucht. Dabei wurde ein hoher Anteil an Genen (515) sowohl von MG132 als auch von BTZ reguliert (Abbildung 3.20 C), wobei es sich um die deutlichste Überschneidung an regulierten Genen handelte. Eindrucksvoller Weise ergab die Analyse, dass 235 Gene in allen GT-Signaturen reguliert waren. Diese Gene wurden zur Durchführung einer WikiPathways-Analyse verwendet (vgl. Abschnitt 2.11.3). Dabei wurden für alle 235 Gene die für sie in Datenbanken annotierten Signalwege aufgelistet. Es sollte geprüft werden, ob in dieser Genliste eine Anreicherung von Genen bestimmter Signalwege auftritt. Hierbei waren 48 Signalwege mit einer höheren Anzahl an Genen vertreten als der theoretisch errechnete Erwartungswert bezogen auf deren Häufigkeit im Gesamtgenom. Tabelle 3.4 enthält davon die 10 Signalwege mit dem niedrigsten p-Wert ihrer Signifikanz. Diese überrepräsentierten Signalwege sind teilweise Proteostase-assoziiert (fett gedruckt), u. a. Signalweg Nr. 1 (Proteasomale Degradation) mit dem niedrigsten p-Wert.

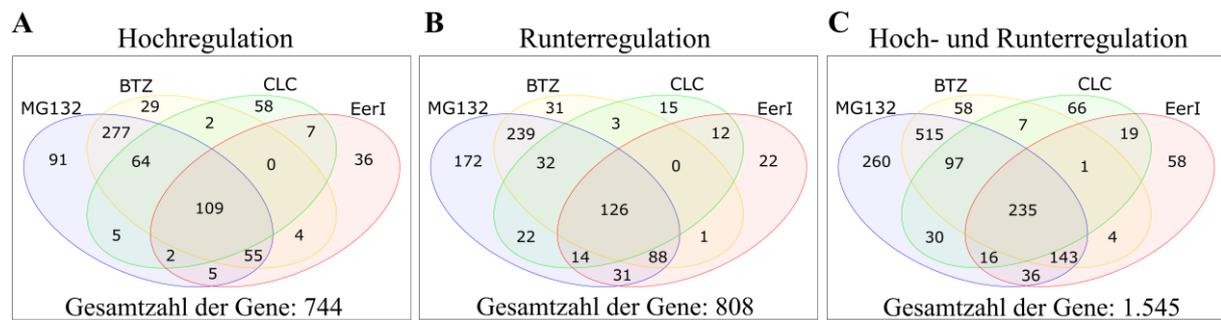


Abbildung 3.20: Vergleich der behandlungsinduzierten globalen Expressionsmuster in *GLA^{p.R301Q/o}*-Fibroblasten. Die Zellen wurden für 24 h mit den effektivsten Konzentrationen der PRs behandelt, woraufhin die Bestimmung der mRNA-Level mittels GeneChip® Human Transcriptome Arrays 2.0 erfolgte. Die globale Genexpression in den unbehandelten Zellen wurde mit der Genexpression in den mit PRs behandelten Zellen verglichen. Dabei entsprach (A) der Anzahl hochregulierter, (B) der Anzahl herunterregulierter und (C) der Summe hoch- bzw. herunterregulierter Gene. Differenzielle Genexpression wurde definiert als ein > 1,5-facher Unterschied bei einem adjustierten p-Wert von $p < 0,05$.

Tabelle 3.4: Überrepräsentierte Signalwege in der Überlappung aller GT-Signaturen

Nr.	p-Wert	Signalweg	WikiPathways-ID
1	0	<i>Hs Proteasome Degradation</i>	WP183
2	$1,2 \times 10^{-12}$	<i>Hs Histone Modifications</i>	WP2369
3	$5,1 \times 10^{-11}$	<i>Hs Retinoblastoma (RB) in Cancer</i>	WP2446
4	$8,0 \times 10^{-11}$	<i>Hs Parkin-Ubiquitin Proteasomal System pathway</i>	WP2359
5	$7,0 \times 10^{-9}$	<i>Hs Gastric Cancer Network 1</i>	WP2361
6	$3,0 \times 10^{-5}$	<i>Hs Pentose Phosphate Pathway</i>	WP134
7	$6,2 \times 10^{-5}$	<i>Hs NRF2 pathway</i>	WP2884
8	$7,1 \times 10^{-5}$	<i>Hs Benzo(a)pyrene metabolism</i>	WP696
9	0,0004	<i>Hs Cell Cycle</i>	WP179
10	0.0005	<i>Hs Polyol Pathway</i>	WP690

Hs... Homo Sapiens

Die WikiPathways-Analyse wurde außerdem mit einer Liste aller Gene der vier GT-Signaturen durchgeführt, d. h. der Summe aller Gene, die nach Behandlung mit MG132, BTZ, CLC bzw. EerI differenziell exprimiert waren. Die angereicherten Proteostase-assoziierten Signalwege innerhalb dieser Genliste waren identisch mit den in Tabelle 3.4 aufgeführten (vgl. Tabelle A.14).

3.11 Einfluss der PRs auf die Expression Proteostase-assoziiierter Gene

Die WikiPathways-Analyse stützt die Ausgangsannahme, dass Proteostase-Assoziation eine wesentliche Rolle in der Wirkweise der Substanzen spielen könnte. Im nächsten Schritt sollte

analysiert werden, ob der beobachtete Effekt auf die α -Gal A in Zusammenhang mit Einflüssen der PRs auf die Proteostase steht. Daher wurden die GT-Signaturen von MG132, BTZ, CLC bzw. EerI hinsichtlich Proteostase-assoziiierter Gene (Tabelle A.12) gefiltert. Die hierbei entstandenen Proteostase-assoziierten transkriptionellen Signaturen (PT-Signaturen) wurden daraufhin vergleichend analysiert. Um einen ersten Überblick über die Expression von Proteostasegenen vor und nach der Behandlung mit MG132, BTZ, CLC bzw. EerI zu erhalten, wurde mittels des Programmes R eine PCA durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.11.2). Insgesamt konnten 351 der 357 Proteostasegene mit ihren Annotationen auf dem GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 identifiziert werden. Hierbei hatte DGJ, analog zu den GT-Signaturen (vgl. Abschnitt 3.10), sowohl in Einzel- als auch in Kombinationsbehandlung keinen bedeutsamen Einfluss auf die PT-Signaturen (Abbildung 3.21). Die Genexpressionsdaten bildeten drei distinkte Cluster. Zum einen clusterten die DGJ- und ABX-spezifischen PT-Signaturen zusammen mit der DMSO-Kontrolle. Weiterhin clusterten die durch Behandlung mit CLC bzw. EerI induzierten PT-Signaturen. Das dritte Cluster bildeten die PT-Signaturen nach Behandlung mit MG132 bzw. BTZ.

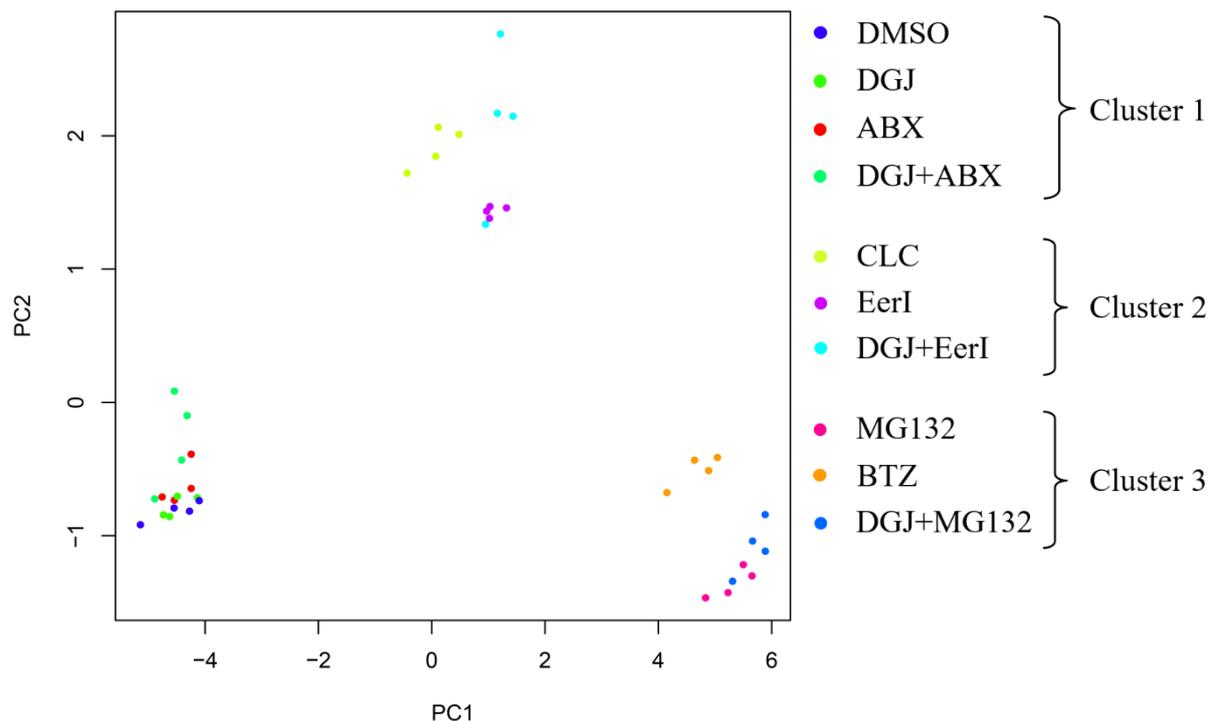


Abbildung 3.21: PT-Signaturen der unterschiedlichen PRs. *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 24 h mit 50 μ M DGJ bzw. den effektivsten Konzentrationen der PRs behandelt. Die Proteostase-assoziierten transkriptionellen Signaturen (PT-Signaturen) der Kontrollzellen und der behandelten Zellen wurden für die PCA verwendet. Diese belegte eine Clusterbildung der verschiedenen Behandlungen in Bezug auf die Regulation Proteostase-assoziiierter Gene.

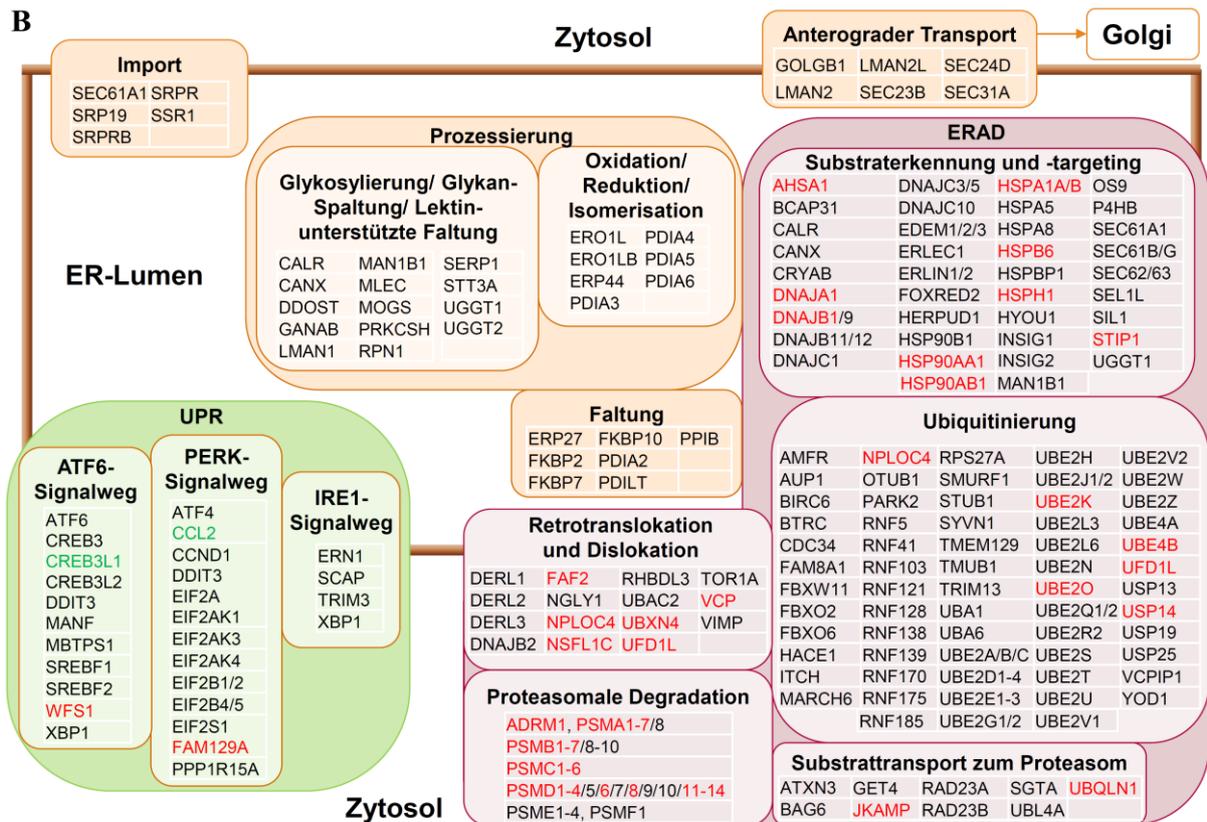
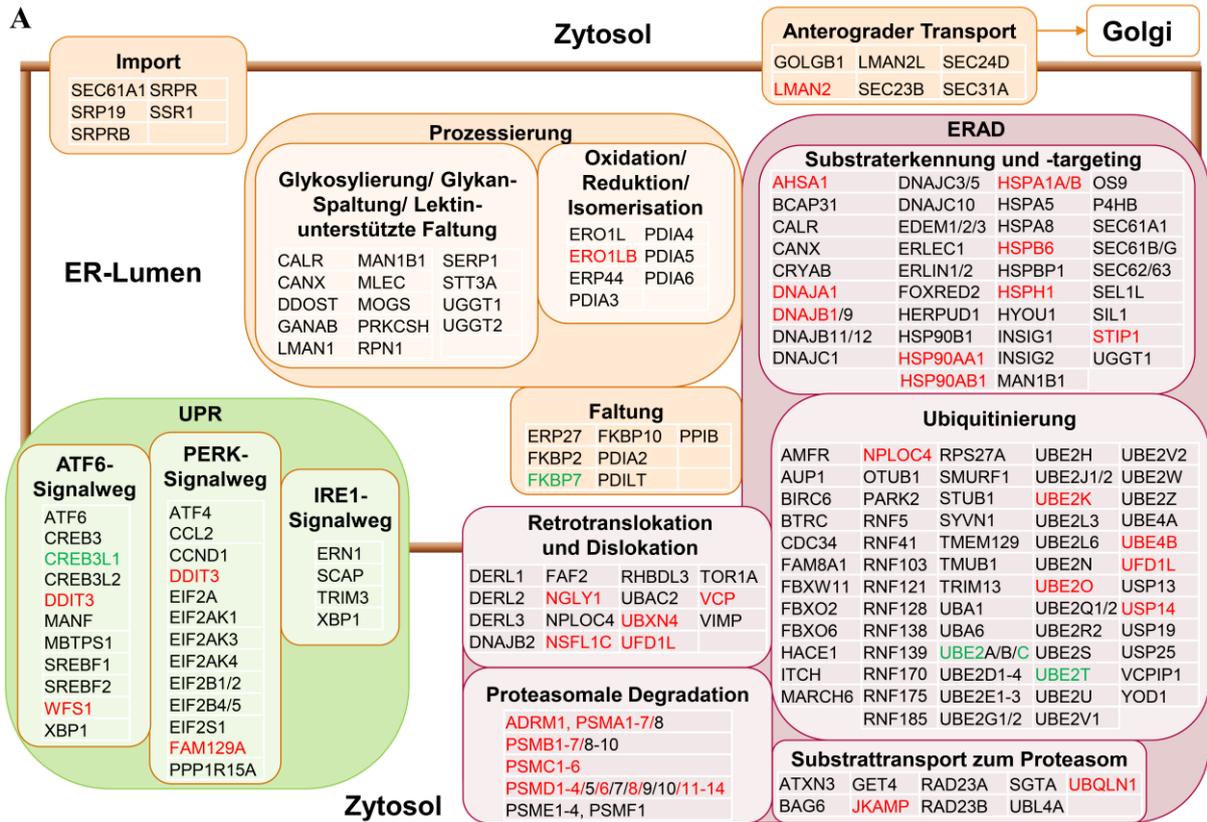
Die in der PCA gezeigte Gruppenbildung ist konsistent mit den Ergebnissen des Vergleiches der Anzahl differenziell exprimierter Proteostasegene nach den unterschiedlichen Behandlungen (vgl. Tabelle 3.5). Dabei hatten DGJ und ABX keinen Einfluss auf die Expression von Proteostasegenen. Währenddessen zeigten MG132 und BTZ mit der Regulation der Expression von 62 bzw. 57 Genen den stärksten Einfluss auf das Proteostase-assoziierte Transkriptom. CLC und EerI hatten einen geringeren, aber deutlichen Effekt auf die Expression von Proteostasegenen und regulierten 36 bzw. 38 Gene. Dabei zeigte der Hauptanteil der regulierten Proteostasegene eine Hochregulation.

Tabelle 3.5: Anzahl der regulierten Proteostasegene nach Behandlung mit DGJ und PRs

Behandlung Reg. Gene	DGJ	MG132	BTZ	CLC	EerI	ABX	DGJ +MG132	DGJ +EerI	DGJ +ABX
Hochregulierte Gene	0	58	55	36	35	0	64	41	0
Herunterregulierte Gene	0	4	2	0	3	0	3	2	0
Summe aller regulierten Gene	0	62	57	36	38	0	67	43	0

Der Vergleich der durch die Behandlung mit PRs erzeugten PT-Signaturen, basierend auf einer mindestens 1,5-fach verschiedenen Genexpression, machte eine starke Überlappung der differenziell exprimierten Proteostase-assoziierten Gene deutlich (Abbildung 3.22). Insgesamt wurden 64 Proteostasegene nach mindestens einer Behandlung mehr als 1,5-fach signifikant verschieden exprimiert (vgl. Tabelle A.15). Vier Gene zeigten nach Behandlung mit einem oder verschiedenen PRs eine verminderte Expression (*CREB3L1*, *FKBP7*, *UBE2C*, *UBE2T*). Ein Gen (*CCL2*) wurde nach Behandlung mit BTZ bzw. EerI herunterreguliert, während die Behandlung mit CLC die Expression von *CCL2* verstärkte. Die Expression der übrigen mindestens 1,5-fach regulierten Proteostasegene wurde nach Behandlung mit einem oder verschiedenen PRs erhöht (Tabelle A.15).

Zusammenfassend zeigten die effektiven PR MG132, BTZ, CLC und EerI starke Einflüsse auf die globale Genexpression, insbesondere auf die Expression von Proteostasegenen. Die quantitative Analyse der Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene zeigte eine starke Vergleichbarkeit nach Behandlung mit MG132 oder BTZ bzw. CLC oder EerI. Während auf globaler Ebene die Anzahl hoch- bzw. herunterregulierter Gene vergleichbar ist, zeigen die Proteostasegene v. a. eine Hochregulation. Hierbei zeigt sich auch eine starke Überschneidung der differenziell exprimierten Gene der einzelnen PT-Signaturen.



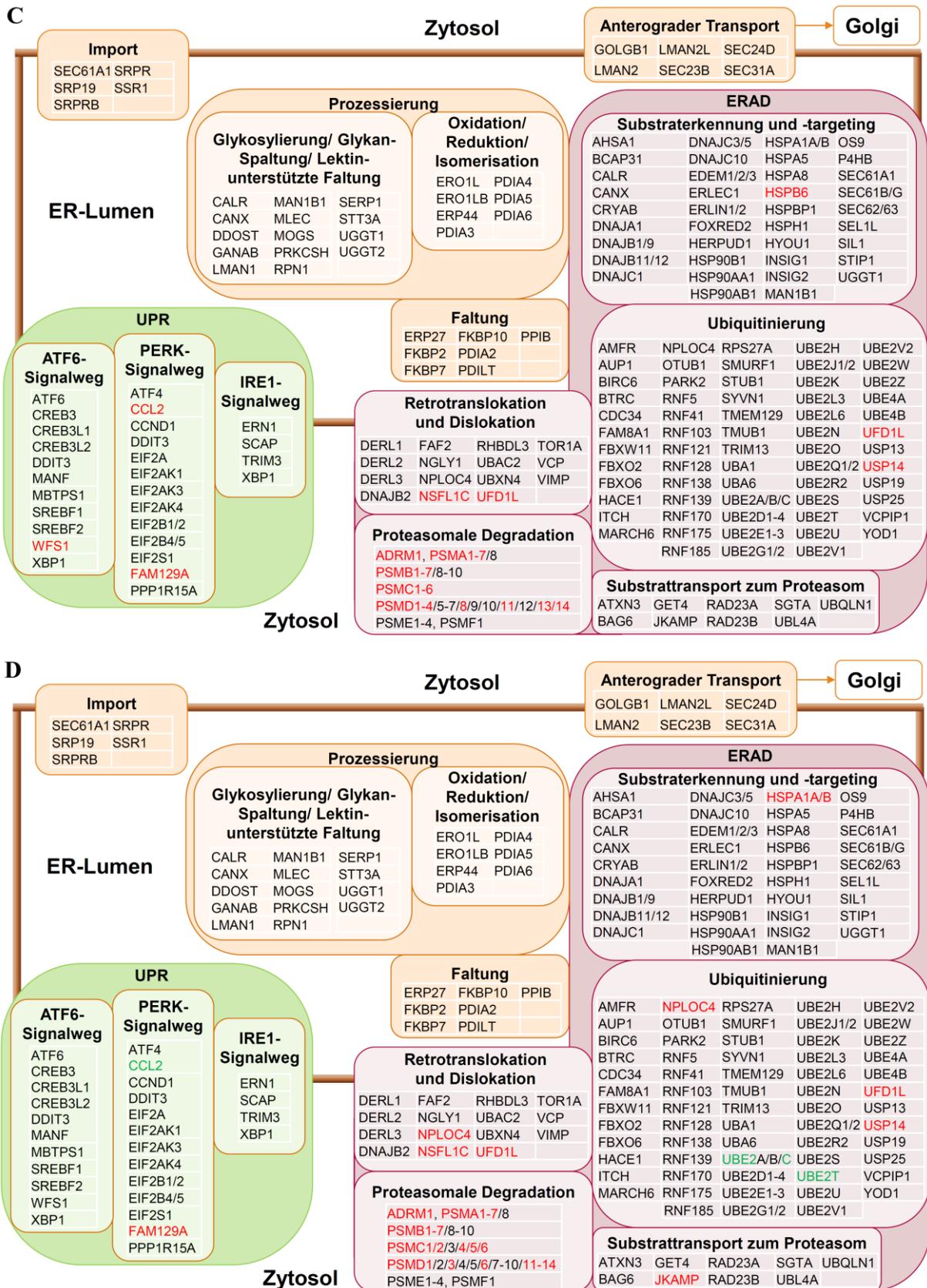


Abbildung 3.23: Visualisierte PT-Signaturen der unterschiedlichen PRs. *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 24 h mit den effektivsten Konzentrationen der PRs behandelt, woraufhin die Bestimmung der mRNA-Level mittels GeneChip® Human Transcriptome Arrays 2.0 er-

folgte. Die Expression von Proteostasegenen in den unbehandelten Zellen wurde mit den Genexpressionen in mit MG132 (**A**), BTZ (**B**), CLC (**C**) bzw. EerI (**D**) behandelten Zellen verglichen. Differenzielle Genexpression wurde definiert als ein $> 1,5$ -facher Unterschied bei einem adjustierten p-Wert von $p < 0,05$. Hochregulierte Gene sind rot und herunterregulierte Gene sind grün dargestellt.

3.12 Potenzielle Zielgene für die Beeinflussung mutanter α -Gal A

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob sich unter den differenziell exprimierten Proteostasegenen solche Gene befinden, deren Expression maßgeblich Einfluss auf die Enzymaktivität mutanter α -Gal A hat. Diese Gene könnten damit als potenzielle Zielgene für die Beeinflussung der Faltung und des Transports mutanter α -Gal A dienen und eine gezieltere Manipulation der Proteostase mutanter α -Gal A mittels spezifischer Wirkstoffe ermöglichen. Im ersten Schritt erfolgte hierbei eine Priorisierung der unterschiedlich exprimierten Proteostasegene. Die in Abbildung 3.24 dargestellte Heatmap zeigt einen Expressionsvergleich der 64 mindestens 1,5-fach differenziell exprimierten Proteostasegene nach Behandlung mit den PRs. Dabei wurden erneut die in Abbildung 3.21 erkennbaren Gruppierungen der Behandlungen deutlich. Demzufolge fallen die Expressionsmuster nach Behandlung mit DMSO, DGJ bzw. ABX in eine Gruppe, was auf den fehlenden Einfluss der Substanzen auf die Expression von Proteostasegenen hinweist. Die PT-Signaturen nach Behandlung mit MG132 bzw. BTZ bilden ein zweites Cluster, während die PT-Signaturen von CLC und EerI ein drittes Cluster bilden. Die kombinierte Behandlung mit DGJ hatte analog der Einzelbehandlung mit DGJ keinen Einfluss auf die Expressionsmuster der PR-Einzelbehandlung. Die 44 mit Sternen markierten Gene treten in mindestens zwei PT-Signaturen auf, wobei die PT-Signaturen von MG132 und BTZ auf Grund ihrer starken Ähnlichkeit zu einer PT-Signatur zusammengefasst wurden, um die Filterung stringenter zu gestalten. Diese 44 Gene stellen potenzielle Zielgene für die Beeinflussung der Enzymaktivität mutanter α -Gal A dar.

ausgeschlossen. Den verbleibenden 14 potenziellen Zielgenen wurden 12 besonders relevant erscheinende Proteostasegene hinzugefügt, welche in nur einer PT-Signatur auftraten, aber eine entscheidende Bedeutung innerhalb der Proteostase einnehmen. Hierzu gehörten AHSA1, CREB3L1, DNAJA1, DNAJB1, HSP90AA1, HSP90AB1, HSPH1, LMAN2L, NGLY1, STIP1, UBXLN4 und VCP. Die dadurch entstandene Liste an 26 potenziellen Zielgenen für die Beeinflussung der Aktivität mutanter α -Gal A ist Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Gene mit potenziellem Einfluss auf die Aktivität der α -Gal A

Gen-Symbol (HGNC)	
ADRM1	JKAMP
AHSA1	LMAN2L
CCL2	NGLY1
CREB3L1	NPLOC4
DNAJA1	NSFL1C
DNAJB1	STIP1
FAM129A	UBE2C
HSP90AA1	UBE2T
HSP90AB1	UBXLN4
HSPA1A	UFD1L
HSPA1B	USP14
HSPB6	VCP
HSPH1	WFS1

3.13 Regulierte Gene mit Einfluss auf die Aktivität von α -Gal A

Um zu prüfen, welchen Einfluss die in Tabelle 3.6 aufgelisteten potenziellen Zielgene auf die Aktivität mutanter α -Gal A haben, wurde ein Knockdown der entsprechenden Gene mittels spezifischer siRNA durchgeführt. Dies wurde von der Firma Thermo Fisher Scientific im Hochdurchsatzverfahren umgesetzt (vgl. Abschnitt 2.13).

3.13.1 Readout-Validierung

Zunächst sollte geprüft werden, ob die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Messungen der Aktivität von α -Gal A sowie der *GLA*-Expression in den von Thermo Fisher hergestellten Proben prinzipiell möglich sind. Dazu wurden die *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten von Thermo Fisher unter den vorher festgelegten optimierten Bedingungen mit randomisierter Kontroll-siRNA bzw. *GLA*-spezifischer siRNA transfiziert (vgl. Abschnitt 2.13.1). Eine Hälfte der Proben

wurde dabei parallel mit DGJ behandelt, um diese hinsichtlich einer besseren Darstellbarkeit der Enzymaktivitätswerte zu testen. Die nach Behandlung der Zellen hergestellten Zellpellets bzw. Zelllysate wurden zur Messung der Enzymaktivität bzw. des *GLA*-mRNA-Levels von Thermo Fisher zurückgesendet. Die Messung der *GLA*-Expression zeigte ohne parallele DGJ-Behandlung einen signifikanten Knockdown des *GLA*-mRNA-Levels auf das 0,21-Fache für *GLA*-siRNA 1 bzw. auf das 0,20-Fache für *GLA*-siRNA 2 (Abbildung 3.25). In den parallel mit DGJ behandelten *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Knockdown auf das 0,30- bzw. 0,14-Fache nach Behandlung mit *GLA*-siRNA 1 bzw. *GLA*-siRNA 2.

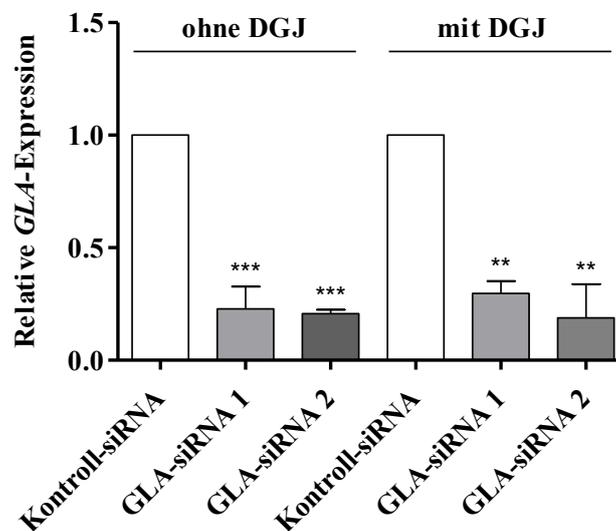


Abbildung 3.25: Effektivität des *GLA*-Knockdowns. *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 48 h mit randomisierter Kontroll-siRNA bzw. *GLA*-siRNA behandelt, woraufhin die Zelllysate zur Bestimmung des *GLA*-mRNA-Levels mittels qRT-PCR verwendet wurden. Eine Hälfte der Proben wurde dabei mit DGJ behandelt. Es erfolgte eine Normierung der *GLA*-Expressionen auf die jeweiligen mit Kontroll-siRNA behandelten Proben, auf welche sich auch die Signifikanzangaben beziehen. (Mittelwert ± SD, ** p < 0,01; *** p < 0,001; n = 4)

Im nächsten Schritt wurde die Aktivität der α -Gal A in den von Thermo Fisher hergestellten Zellpellets gemessen. Nach der Qualitätsanalyse waren für jeden Ansatz mindestens drei Proben analysierbar. Bei der Messung der Aktivität von α -Gal A zeigte sich eine leichte, aber auf Grund der geringen Auflösung nicht signifikante Reduktion der Enzymaktivität nach Behandlung mit *GLA*-siRNA ohne zusätzliche Behandlung mit DGJ (Abbildung 3.26). Die durch die DGJ-Behandlung erzeugte Erhöhung der Aktivität in den mit Kontroll-siRNA behandelten Proben war mit den Ergebnissen bisheriger Untersuchungen in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten vergleichbar (vgl. Abschnitt 3.2). Dadurch verbesserte sich die Darstellbarkeit der Enzymaktivi-

tätsmessung, so dass in den mit DGJ behandelten Proben eine signifikante Reduktion der Aktivität mutanter α -Gal A von 27,9 nmol 4-MU/ mg Protein/ h auf 22,4 bzw. 16,6 nmol 4-MU/ mg Protein/ h nach Behandlung mit *GLA*-siRNA 1 bzw. *GLA*-siRNA 2 bestimmt wurde. Auf Grund der besseren Darstellbarkeit wurde der Versuchsaufbau mit DGJ-Behandlung für Folgeexperimente verwendet. Unbehandelt bewegte sich die Enzymaktivität nahe des *Limit of Quantitation* (LoQ).

Auf Grundlage der signifikanten Reduktion der *GLA*-Expression und der signifikanten Abnahme der Enzymaktivität nach Behandlung mit *GLA*-siRNA, konnte einheitlich gezeigt werden, dass der von Thermo Fisher durchgeführte *GLA*-Knockdown erfolgreich war. Dieser war außerdem erwartbar unabhängig von einer parallelen Behandlung mit DGJ. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass mittels Knockdown potenzieller Zielgene hervorgerufene Veränderungen der Aktivität von α -Gal A in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit den im Albrecht-Kossel-Institut durchgeführten Enzymaktivitätsbestimmungen detektiert werden können.

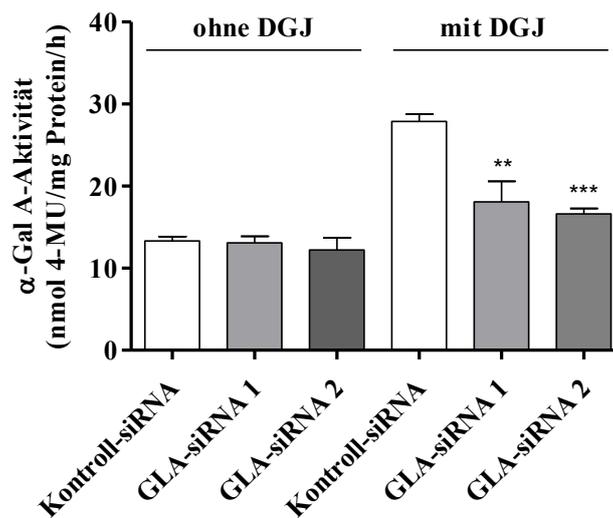


Abbildung 3.26: Aktivität mutanter α -Gal A nach Knockdown des *GLA*-Gens. *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten wurden für 48 h mit randomisierter Kontroll-siRNA bzw. zwei verschiedenen *GLA*-siRNAs behandelt. Eine Hälfte der Proben wurde hierbei zusätzlich mit DGJ behandelt. Die Zellysate wurden hinsichtlich ihrer zellulären Aktivität an α -Gal A getestet. Die Einheit der Enzymaktivität repräsentiert den Substratumsatz pro mg Protein pro Stunde. (Mittelwert \pm SD, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n = 3-4$)

3.13.2 Einfluss potenzieller Zielgene auf die Aktivität mutanter α -Gal A

Um zu prüfen, ob die potenziellen Zielgene einen Einfluss auf die Aktivität mutanter α -Gal A besitzen, wurden $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten für 48 h mit siRNA gegen jedes entsprechende Gen behandelt (vgl. Abschnitt 2.13.2). Da sich im Vorversuch eine verbesserte Darstellbarkeit der Ergebnisse durch die parallele Behandlung der Proben mit DGJ zeigte, wurde diese ebenfalls für diesen Versuch durchgeführt. Zur Normierung wurde randomisierte siRNA mitgeführt. Um den maximalen Effekt eines Knockdowns auf die Aktivität der α -Gal A bestimmen zu können, wurden $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit GLA -spezifischer siRNA behandelt. Der Knockdown des GLA -Gens resultierte in einer Verminderung der Aktivität der α -Gal A auf 53 % der mit randomisierter siRNA behandelten Kontrolle (Abbildung 3.27). Der Knockdown von $CCL2$ führte zu einer signifikanten Verringerung der Aktivität der α -Gal A auf 81,0 % der Kontrolle. Auch der Knockdown des Gens $UFDIL$ bewirkte eine signifikante Verminderung der Aktivität mutanter α -Gal A auf 81,8 % der mit randomisierter siRNA behandelten Kontrolle. Die Reduktion der Aktivität mutanter α -Gal A nach Knockdown von $CCL2$ bzw. $UFDIL$ stellten 40,3 % bzw. 38,7 % des durch den GLA -Knockdown erzielten und als maximal erreichbar definierten Effektes dar.

Auf Grund der signifikanten Reduktion der Aktivität mutanter α -Gal A nach Knockdown von $CCL2$ bzw. $UFDIL$ wurden diese Gene als Kandidaten eingestuft, welche einen positiven Einfluss auf die Aktivität mutanter α -Gal A besitzen. Beide Gene sind Proteostase-assoziiert, wobei $CCL2$ dem PERK-Signalweg zugeordnet wird (vgl. Abbildung 3.15). Die Expression von $CCL2$ wurde nach Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit BTZ und EerI herunterreguliert (vgl. Abbildung 3.23), wohingegen die Behandlung mit CLC eine Hochregulation von $CCL2$ sowie eine Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A bewirkte. In Verbindung mit den Ergebnissen des Knockdown-Versuches deutet dies darauf hin, dass $CCL2$ einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

Währenddessen spielt $UFDIL$ eine Rolle bei der Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine aus dem ER ins Zytosol und wurde nach Behandlung mit allen vier effektiven Wirkstoffen (MG132, BTZ, CLC, EerI) hochreguliert. Die verminderte Enzymaktivität nach Knockdown von $UFDIL$ ist konsistent mit der Aktivitätserhöhung der α -Gal A nach Hochregulation von $UFDIL$ (vgl. Abschnitt 3.2 und Abbildung 3.23) und unterstreicht somit die potenzielle Bedeutung von $UFDIL$ für die Aktivität der α -Gal A.

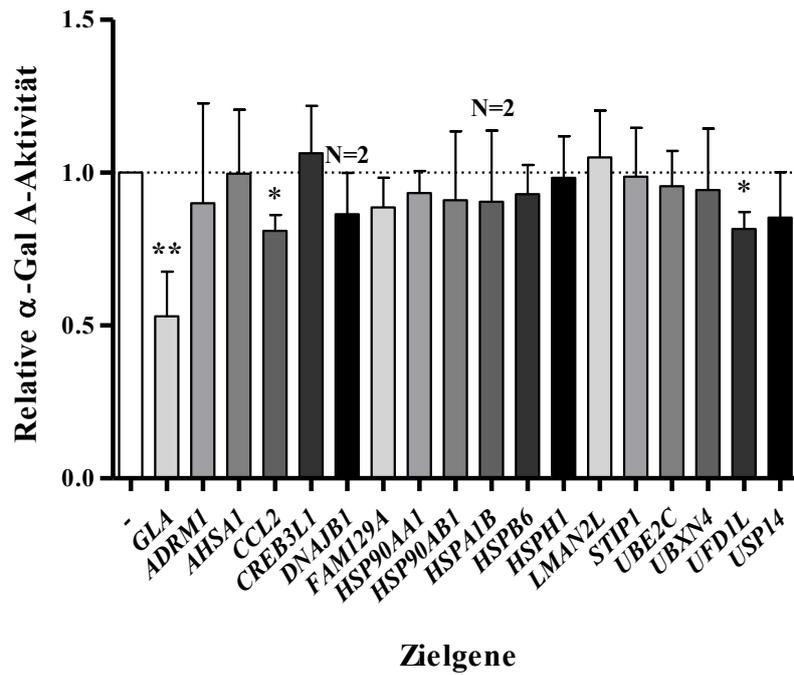


Abbildung 3.27: Einfluss des Knockdowns potenzieller Zielgene auf die Aktivität mutanter α -Gal A. $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten wurden für 48 h mit randomisierter Kontroll-siRNA bzw. siRNA gegen potenzielle Zielgene behandelt. Parallel wurden die Proben mit DGJ behandelt. Die Zelllysate wurden hinsichtlich ihrer zellulären Aktivität an α -Gal A getestet. Es erfolgte eine Normierung der GLA -Expressionen auf die mit Kontroll-siRNA behandelten Proben, auf welche sich auch die Signifikanzangaben beziehen. (Mittelwert \pm SD, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3-5$ außer anderweitig gekennzeichnet)

4 Diskussion

Viele Proteinfaltungserkrankungen werden von Ungleichgewichten innerhalb der Proteostase des entsprechend veränderten Proteins begleitet, wie auch bei Morbus Fabry. Die Synthese un- bzw. fehlgefalteter α -Gal A bewirkt einen vorzeitigen Abbau des häufig noch katalytisch aktiven, aber in seiner Stabilität eingeschränkten Enzyms¹⁴. Dadurch gelangt weniger α -Gal A über den sekretorischen Signalweg in den Golgi-Apparat und weiter in die Lysosomen. Die Folgen sind ein verminderter Abbau der Substrate innerhalb der Lysosomen und deren Ansammlung in den Zellen und im Extrazellularraum^{46,47,48}. Ziel dieser Arbeit war es, durch den Einsatz spezifischer Proteostase-Regulatoren (PRs) einen positiven Einfluss auf die Proteinhomöostase der α -Gal A zu nehmen, um damit die Proteinfaltung und dessen Transport zu verbessern und der vorzeitigen Degradation entgegenzuwirken sowie Hinweise auf mögliche zugrunde liegende Wirkmechanismen von effektiven PRs zu identifizieren.

4.1 Pathophysiologie der Morbus Fabry-Fibroblasten

Zunächst sollte gezeigt werden, inwieweit die Zellphysiologie in den $GLA^{p.R301Q/o}$ - und $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten durch die jeweilige GLA -Mutation beeinträchtigt wird. Dabei zeigten die Microarray-Daten unterschiedliche Tendenzen hinsichtlich der GLA -Expression in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den vier verschiedenen Wildtyp (WT)-Linien. Zwar wurde eine leichte Herunterregulation der GLA -Expression in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den Wildtyp 1 (WT1)-Fibroblasten deutlich, jedoch zeigten sich im Vergleich zu den übrigen drei Wildtyp (WT)-Linien keine Veränderungen bzw. eine Hochregulation im Vergleich zu WT3. Da sich die GLA -Expression in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Mittel der GLA -Expression in den vier WT-Linien bewegte, kann diese als unverändert gewertet werden. Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit waren nur wenige Daten zur endogenen GLA -Expression verfügbar und diese bezogen sich v. a. auf intronische Mutationen^{46,114}. Somit tragen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dazu bei, die limitierten Daten zur endogenen GLA -Expression in Morbus Fabry zu erweitern.

Die Proteinmenge endogener α -Gal A war in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zu den WT1-Fibroblasten um die Hälfte reduziert. Um eine generelle Aussage über die Proteinmenge an α -Gal A in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten treffen zu können, sollten auch die übrigen drei WT-Linien in die Analyse einbezogen werden. Dies war auf Grund der geringen Wachs-

tumsraten der Zellen und der benötigten hohen Proteinmengen nicht möglich. Der in der vorliegenden Arbeit erhobene Befund ist konsistent mit dem bisherigem Wissen zur vorzeitigen Degradation aberranter lysosomaler Enzyme über die ER-assoziierte Degradation (ERAD)¹¹⁵ und mit einer von Benjamin und Kollegen durchgeführten Studie, welche eine Reduktion der Proteinmenge an α -Gal A in Lymphoblasten hemizygoter männlicher Morbus Fabry-Patienten mit der p.R301Q-Mutation feststellte⁹¹. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivität der α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ - und $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten unterhalb des Normalbereiches lag. Die hierbei ermittelten Werte sind konsistent mit bereits publizierten Daten von Fibroblasten hemizygoter männlicher Morbus Fabry-Patienten mit der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Mutation⁹¹. Dass viele *missense*-Mutationen des *GLA*-Gens in Enzyme mit normaler katalytischer Aktivität resultieren^{36,87}, legt nahe, dass die reduzierte Enzymaktivität in den $GLA^{p.R301Q/o}$ - und $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten auf eine vorzeitige Degradation des unreifen Enzyms zurückzuführen ist, was sich in den verminderten Proteinmengen widerspiegelt.

Die verringerte Aktivität mutanter α -Gal A resultiert u. a. in einer Ansammlung von Globotriaosylsphingosin (lyso-Gb3) in Lysosomen und anderen zellulären Kompartimenten⁴⁵. In der vorliegenden Arbeit verwendete $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten zeigten eine 12,5-fach erhöhte lyso-Gb3-Menge im Vergleich zu WT1-Fibroblasten. In einer anderen Studie gemessene lyso-Gb3-Level in Fibroblasten von Morbus Fabry-Patienten zeigten ebenfalls eine Erhöhung der lyso-Gb3-Werte auf vergleichbare Mengen⁴⁹.

Bisher ist der dem Phänotyp der Erkrankung zugrunde liegende molekulare Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt. Neben der durch die verminderte Enzymaktivität hervorgerufenen Ansammlung an Substraten, könnte auch, bedingt durch die ER-Retention fehlgefalteter α -Gal A, ER-Stress auftreten. Evidenzen für eine Beeinträchtigung der Proteostase liegen bereits in anderen Erkrankungen vor, die in der Pathophysiologie Ähnlichkeiten zum Morbus Fabry aufweisen. Beispielsweise kommt es in anderen lysosomalen Speichererkrankungen (*lysosomal storage disorders*, LSDs) wie Morbus Gaucher oder Morbus Tay-Sachs zur veränderten Expression von Genen der Proteostase bzw. des oxidativen Stresses⁷⁹. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die zu verwendenden $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten transkriptionelle Auffälligkeiten aufweisen. Hinsichtlich der Proteostase-assoziierten und der globalen Genexpression zeigten sich jedoch keine pathophysiologischen Veränderungen. Bisherige Daten zur Genexpression in Morbus Fabry zeigten vergleichbare Ergebnisse^{116,117}. Diese bezogen sich jedoch hauptsächlich auf Funktionsverlustmutationen bzw. eine andere *missense*-Mutation. Mit der vorliegenden Arbeit konnten bisherige Expressionsdaten um die Ergebnisse hinsichtlich der p.R301Q-Mutation erweitert werden. Ein Vorteil dieses Befundes ist, dass die in

der vorliegenden Arbeit erzeugten transkriptionellen Signaturen der effektiven PRs weitestgehend als Substanzeffekt interpretiert werden konnten, ohne Einfluss Morbus Fabry-spezifischer transkriptioneller Regulationsmechanismen.

4.2 Verbesserung des Phänotyps von Morbus Fabry durch Proteostase-Regulatoren

Voraussetzung für die positive Beeinflussung der α -Gal A mittels pharmakologischen Chaperonen (PCs) und PRs war, dass das durch eine *missense*-Mutation strukturell veränderte Enzym in noch ausreichender Menge synthetisiert wird und noch katalytische Funktion besitzt. Dies war zutreffend für die α -Gal A in den von uns verwendeten Fibroblastenlinien von hemizygoten männlichen Morbus Fabry-Patienten, welche die $GLA^{p.R301Q/o}$ - bzw. die $GLA^{p.R301G/o}$ -Mutation trugen. Es wurden WT- und Morbus Fabry-Fibroblasten mit dem PC DGJ und einer Reihe von PRs behandelt. Ziel war es, PRs zu identifizieren, welche die Aktivität mutanter α -Gal A erhöhen und intrazelluläre lyso-Gb3-Akkumulationen vermindern.

4.2.1 Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A durch PRs

Es ist bereits bekannt, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten GLA -Mutationen ($GLA^{p.R301Q/o}$ bzw. $GLA^{p.R301G/o}$) DGJ-responsiv sind^{43,85,87}. Auch in dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ - bzw. $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten durch Behandlung mit DGJ erzielt werden. Die Behandlung mit 50 μ M DGJ für eine Behandlungsdauer von 5 Tagen erzielte in beiden Zelllinien eine Erhöhung der Enzymaktivität. Damit konnte die bereits in anderen Studien beschriebene Erhöhung der Aktivität endogener α -Gal A mit der p.R301Q-Mutation mittels DGJ reproduziert und das in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellsystem validiert werden. Trotz der mutationsspezifischen Wirkung von DGJ^{85,91}, verhalten sich die p.R301Q- und die p.R301G-Mutation in den verwendeten Probandenzelllinien vergleichbar.

Bisher konnten aktivitätssteigernde Effekte von PRs hinsichtlich mutanter α -Gal A vor allem im Überexpressionssystem gezeigt werden^{14,85}. Neben dem pharmakologischen Chaperon DGJ sowie DGJ-Derivaten konnten positive Effekte des chemischen Chaperons und Histon-Deacetylase-Inhibitors Phenylbutyrat (PBA) auf die Aktivität endogener α -Gal A in Morbus Fabry gezeigt werden^{118,119}. Allerdings limitiert die sehr hohe Dosierung von PBA dessen therapeutischen Einsatz¹¹⁹. Zudem zeigte eine weitere Studie, dass PBA im Gegensatz zu DGJ weder die Maturierung der α -Gal A noch die Reduktion von Gb3-Ablagerungen unterstützt⁸⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals weitere PRs identifiziert werden, welche die Aktivität endogener α -Gal A signifikant steigern. Hierzu gehört der proteasomale Inhibitor MG132. Eine 2008 veröffentlichte Studie zeigte eine Erhöhung der Aktivität endogener α -Gal A in WT-Fibroblasten durch MG132-Behandlung²⁵. In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus der positive Effekt auf mutante endogene α -Gal A in den Mutationen p.R301Q und p.R301G belegt werden.

Außerdem konnte erstmalig gezeigt werden, dass der proteasomale Inhibitor BTZ einen positiven Einfluss auf die Aktivität der α -Gal A hat. BTZ erhöhte die endogene Enzymaktivität in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten auf das Doppelte und in $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten auf das über 8-Fache. Die von uns ermittelte optimale Konzentration an BTZ für die Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A lag bei 5 nM und damit unter den in Studien zu NPC1 und Morbus Pompe eingesetzten BTZ-Mengen von 30 nM bzw. 100 nM^{63,35}. Dies weist darauf hin, dass beim Morbus Fabry bereits niedrigere BTZ-Konzentrationen ausreichen, um den pathologischen Phänotyp zu verbessern. Auch der irreversible proteasomale Inhibitor Clasto-Lactacystin- β -lacton (CLC) zeigte einen positiven Einfluss auf die Aktivität der α -Gal A. Zwar wurde der positive Effekt von CLC auf die Proteinmenge endogener α -Gal A bereits belegt^{14,60}, allerdings wurde dieser bisher nicht hinsichtlich endogener Enzymaktivität untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine aktivitätssteigernde Wirkung von CLC auf endogene α -Gal A sowohl für die p.R301Q- als auch für die p.R301G-Mutation gezeigt werden. EerI hatte keinen reproduzierbaren positiven Effekt in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten, konnte aber die endogene Enzymaktivität in den $GLA^{p.R301G/o}$ -Zellen reproduzierbar und signifikant steigern. Auch der Effekt von EerI auf mutante α -Gal A konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden.

In den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten waren die Effekte von MG132, BTZ und CLC mit dem von DGJ vergleichbar bzw. etwas geringer (CLC). In Fibroblasten mit der $GLA^{p.R301G/o}$ -Mutation konnte durch die Behandlung mit MG132, CLC und BTZ eine stärkere als die durch DGJ induzierte Enzymaktivitätserhöhung gezeigt werden. Statt einer Verdopplung der Ausgangsaktivität in den unbehandelten Morbus Fabry-Fibroblasten bewirkte die Behandlung mit MG132, BTZ bzw. CLC eine Steigerung der α -Gal A-Aktivität auf das über 6-, 8- bzw. 4-Fache. Die unterschiedlich starken Effekte der ERAD-Inhibitoren in den in dieser Arbeit verwendeten Morbus Fabry-Fibroblasten deuten auf eine unterschiedliche Responsivität der Mutationen hin. Dass im Gegensatz dazu der Effekt von DGJ in beiden Zelllinien vergleichbar war, unterstreicht den unterschiedlichen Wirkmechanismus von DGJ und den PRs.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von BTZ und MG132 (Abbildungen 3.3 und 3.6) lassen einen glockenförmigen Kurvenverlauf für den positiven Effekt auf die Aktivität mutanter α -Gal A erkennen. Neben den Sättigungskurven, wie sie in der vorliegenden Arbeit für CLC und EerI

auftraten, wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass viele Substanzen glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurven aufweisen^{120,121}. Diese entstehen z. B. dadurch, dass die Substanzen gleichzeitig auf mehrere Zielmoleküle wirken bzw. an verschiedene Stellen eines Zielmoleküls binden¹²⁰. Mu und Kollegen zeigten einen glockenförmigen Kurvenverlauf bei der aktivitätssteigernden Wirkung von MG132 auf die Glucocerebrosidase (GCase) in Morbus Gaucher²⁵. Für BTZ wurde ebenso ein glockenförmiger Dosis-Wirkungs-Verlauf für die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors beschrieben¹²². Der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte enge Wirkungsbereich von BTZ (2,5 - 10 nM) lässt erkennen, wie kompliziert es sein kann, für solche Dosis-Wirkungs-Beziehungen den effektiven Konzentrationsbereich einer wirksamen Substanz zu identifizieren. Dies ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit sowohl für BTZ als auch für MG132 gelungen. Der enge Wirkungsbereich könnte allerdings eine Limitation in der *In-vivo*-Behandlung darstellen, da er Hinweise auf eine enge therapeutische Breite liefert.

Andere Arbeiten konnten zeigen, dass die Kombination eines PC und eines PR zu synergistischen Wirkungen in der Verbesserung der Pathophysiologie von LSDs führen²⁵. Dabei bewirkt das PC eine Erhöhung der Konzentration an transportfähigem mutantern Protein, welches funktionsfähig ist, aber durch Beeinträchtigungen in der Stabilität und Faltung vorzeitig abgebaut würde. Auf der anderen Seite verändert der PR die Komposition des Proteostase-Netzwerkes im ER, was zur Erhöhung der Faltungskapazitäten führt, wodurch mehr gefaltetes Protein für den Transport zu den Lysosomen zur Verfügung steht²⁵. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die Kombinationen aus dem PC DGJ und den effektiven PRs auch synergistische Effekte hinsichtlich der endogenen α -Gal A zeigen. Hierbei konnten erstmals Synergien zwischen DGJ und den PRs MG132, BTZ, CLC bzw. EerI beschrieben werden. Die kombinierte Behandlung mit DGJ und MG132, BTZ bzw. CLC verstärkte die Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in $GLA^{p.R301Q/o}$ - und $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten nach Einzelbehandlung synergistisch, so dass die Enzymaktivität teilweise über den Level der WT-Aktivität angehoben wurde. Da sowohl DGJ (Freiname: Migalastat; Handelsname: Galafold) als auch BTZ (Handelsname: Velcade) klinisch zugelassen sind^{58,123}, bietet deren Synergie gute Voraussetzungen, um das Potential der Kombinationstherapie von Morbus Fabry-Patienten mit DGJ und PRs zu erforschen. Es wurde unter anderem deutlich, dass die Behandlung von $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten bereits mit der Kombination aus 10 μ M DGJ und 5 nM BTZ eine Steigerung der Enzymaktivität auf das 5,4-Fache der unbehandelten Zellen bewirkt. Die annähernde maximale Plasmakonzentration der therapeutisch eingesetzten Formulation von DGJ bei der Behandlung von Morbus Fabry-Patienten liegt ebenfalls bei 10 μ M¹²⁴. Weiterhin beträgt die maximal erreichte Plasmakonzentration an BTZ bei Standardtherapie von Patienten mit Multiplem Myelom ca. 290 nM^{123,125}. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte effektivste Konzentration an BTZ für

die Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A beträgt 5 nM. Daher sollte in den nächsten Schritten geprüft werden, ob BTZ eine gute Möglichkeit darstellt, die DGJ-Behandlung von Morbus Fabry-Patienten sinnvoll zu ergänzen. Erste Schritte hierfür sollten die Verwendung eines entsprechenden Tiermodells beinhalten.

In $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten konnten synergistische Effekte außerdem für die Kombination aus DGJ und dem PR EerI gezeigt werden. Auch Ambroxol (ABX), welches keinen Einzeleffekt auf die Aktivität mutanter α -Gal A hatte, konnte in der Kombinationsbehandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ - und $GLA^{p.R301G/o}$ -Fibroblasten mit DGJ, den DGJ-Einzeleffekt signifikant steigern. Eine 2015 veröffentlichte Studie zeigte bereits im HEK293H-basierten Überexpressionssystem eine signifikante Erhöhung des DGJ-Effektes auf die Aktivität mutanter α -Gal A mit der p.R301Q- bzw. p.R301G-Mutation durch die gleichzeitige Behandlung mit ABX⁸⁵. Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit reproduziert und darüber hinaus auf die endogene α -Gal A übertragen werden.

Bisher wurde nur in einer Studie die Synergie zwischen einem PC (N⁴-p-methoxyphenyl-DGJ-Aryl-Thioharnstoff) und einem PR (PBA) im Hinblick auf die Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A in Fibroblasten von Morbus Fabry-Patienten verdeutlicht¹¹⁸. Wie bereits erwähnt ist jedoch der therapeutische Einsatz von PBA durch die notwendige sehr hohe Dosierung stark limitiert¹¹⁹. Dagegen befinden sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen DGJ und BTZ bereits in der klinischen Anwendung^{58,123}. Darüber hinaus untersuchte die vorliegende Arbeit weitere *Readouts* als die Aktivität mutanter α -Gal A und liefert eine mechanistische Beschreibung der Wirkung der effektiven PRs.

4.2.2 Steigerung der Proteinmenge mutanter α -Gal A durch BTZ

Um den Einfluss der *GLA*-Mutation bzw. der Behandlungen auf die Proteinmenge der α -Gal A zu prüfen, wurde aus $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten isolierte endogene α -Gal A mittels Western Blot visualisiert und quantifiziert. Die Banden für endogene α -Gal A im Western Blot umfassen einen Größenbereich zwischen 39 und 46 kDa. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um unterschiedlich glykosylierte Formen der α -Gal A. Jedes Monomer der α -Gal A besitzt drei mögliche N-Glykosylierungsstellen (N139, N192 und N215)¹²⁶. Die Glykosylierung der α -Gal A ist sehr wahrscheinlich nicht affektiert, da die drei nachgewiesenen N-Glykosylierungsstellen von der Mutation nicht betroffen sind. An die N139-Bindungsstelle knüpfen sich komplexe Kohlenhydrate. Die Asparagine N192 und N215 dienen als Bindungsstellen für mannosereiche Oligosaccharide und sind damit in den Weitertransport des Proteins zu den Lysosomen involviert. Daher existieren zahlreiche physiologische Glykosylierungsformen der

α -Gal A¹²⁶. Auch in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Banden für α -Gal A im Western Blot einen ähnlichen Größenbereich umspannen können, u.a. für die p.R301Q-Mutante der α -Gal A^{86,91}. Um zu prüfen, ob es sich bei den visualisierten Banden ausschließlich um die α -Gal A handelt und um die Quantifizierung unspezifischer Banden zu vermeiden, wurde ein Verdau der Zelllysate mit PNGase F vor dem Western Blot durchgeführt. Dadurch wurden alle N-assoziierten Zuckerreste des Proteins abgespalten. Erwartungsgemäß entstand eine distinkte Bande im Western Blot, die das deglykosylierte Protein repräsentierte. Diese Bande wurde für die Quantifizierung der α -Gal A verwendet. Dabei wurde eine um die Hälfte verminderte Menge an α -Gal A in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten im Vergleich zur WT1-Fibroblastenlinie deutlich. Benjamin und Kollegen konnten ebenfalls eine stark verminderte Proteinmenge an endogener α -Gal A mit der p.R301Q-Mutation in Lymphoblasten von Morbus Fabry-Patienten zeigen⁹¹. Die Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit 50 μ M DGJ bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der Menge endogener α -Gal A. Vergleichbares wurde in einer anderen Studie in Lymphoblasten von Morbus Fabry-Patienten mit der p.R301Q-Mutation demonstriert⁹¹. Damit konnten im verwendeten Zellsystem der vorliegenden Arbeit bisherige Ergebnisse hinsichtlich endogener α -Gal A in humanen Patientenlymphoblasten reproduziert werden.

BTZ ist der einzige klinisch zugelassene PR unter den in der vorliegenden Arbeit als effektiv identifizierten PRs. Es befindet sich in klinischer Anwendung für die Behandlung des Multiplen Myeloms und des Mantelzelllymphoms¹²³ und zeigte noch dazu den stärksten Effekt im verwendeten Zellsystem. Daher fokussierten sich Untersuchungen bezüglich der Verbesserung der Proteinmenge an α -Gal A in Morbus Fabry-Fibroblasten auf die Behandlung mit BTZ. Die Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit 5 nM BTZ bewirkte eine 1,5-fache Erhöhung der endogenen Menge an α -Gal A im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bisher wurde durch Ishii und Kollegen gezeigt, dass der proteasomale Inhibitor Lactacystin die Proteinmenge an α -Gal A mit der p.R301Q-Mutation erhöhen kann, dabei handelte es sich jedoch um überexprimiertes Protein¹⁴. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass BTZ einen positiven Einfluss auf die Proteinmenge mutanter endogener α -Gal A besitzt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der molekulare Defekt der $GLA^{p.R301Q/o}$ - und $GLA^{p.R301G/o}$ -Varianten offenbar auf einer vorzeitigen proteasomalen Degradation beruht. Diese Hypothese wird durch den positiven Effekt des proteasomalen Inhibitors BTZ auf die Proteinmenge mutanter α -Gal A unterstützt, was einerseits einen Hinweis zur Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems an der Degradation von α -Gal A darstellt und andererseits das Ubiquitin-Proteasom-System als interessantes Ziel für eine therapeutische Intervention bei Morbus Fabry markiert. Die Behand-

lung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit einer Kombination aus 50 μ M DGJ und 5 nM BTZ bewirkte eine 2,5-fache Erhöhung endogener α -Gal A. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Kombination aus DGJ und einem PR einen synergistischen Effekt bei der Erhöhung endogener α -Gal A in Fibroblasten von Morbus Fabry-Patienten hervorruft.

4.2.3 Senkung von lyso-Gb3-Ansammlungen in $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten durch BTZ

Die verminderte Aktivität der α -Gal A bei Morbus Fabry führt neben intrazellulären Gb3-Akkumulationen auch zur Ansammlung von lyso-Gb3, d. h. dem deacetylierten Derivat von Gb3⁴⁵. Es wurde bereits umfassend gezeigt, dass lyso-Gb3 zur Pathophysiologie des Morbus Fabry beiträgt^{39,49}, was wiederum verdeutlicht, welche Bedeutung der Reduktion von lyso-Gb3 bei der Verbesserung der Symptomatik des Morbus Fabry zukommt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass BTZ intrazelluläre lyso-Gb3-Ansammlungen in den $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten deutlich stärker reduziert als DGJ. Hierfür wurden die Zellen für 7 Tage bzw. 14 Tage mit 50 μ M DGJ, 5 nM BTZ bzw. einer Kombination beider Wirkstoffkonzentrationen behandelt, gefolgt von einer Auswaschung der Substanzen für 4 Tage. Dabei zeigte sich eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion des lyso-Gb3-Levels durch die DGJ-Behandlung. Da Gb3-Akkumulationen nicht notwendigerweise mit der Manifestation von Morbus Fabry korrelieren³⁹ und es sich bei lyso-Gb3 um einen validen Biomarker für die Erkrankung handelt^{48,50} wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich lyso-Gb3- und keine Gb3-Werte analysiert. Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass rekombinante α -Gal A pures lyso-Gb3 50-mal langsamer abbaut als Gb3³⁹. Dieser Zusammenhang könnte erklären, warum in der von Benjamin und Kollegen durchgeführten Studie⁹¹ die Reduktion von Gb3 mittels DGJ stärker ausfiel als die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Reduktion der lyso-Gb3-Level durch DGJ. Die gleiche Studie zeigte auch, dass hohe Konzentrationen von DGJ außerhalb des therapeutischen Bereiches benötigt werden, um *in vitro* eine signifikante Clearance von Gb3 herbeizuführen⁹¹. Dies kann sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die klinische Wirksamkeit haben. Es besteht die Notwendigkeit effizientere Wege zur (lyso-) Gb3-Clearance zu finden. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten *In-vitro*-Zellkultur-Daten zu BTZ als Einzelgabe zeigen, dass die Clearance von lyso-Gb3 ein effektiverer Therapieansatz sein könnte, da die 7- bzw. 14-tägige Behandlung der $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten mit 5 nM BTZ zu einer starken und signifikanten Reduktion der lyso-Gb3-Ansammlungen in den Fibroblasten führte. Die Behandlung wurde zum Zwecke der Vergleichbarkeit mit der DGJ-Behandlung ebenfalls mit 4 Tagen Auswaschung von BTZ kombiniert. Hierbei konnte der Effekt von BTZ nach 7 Tagen Behandlung

durch Verlängerung der Behandlung auf 14 Tage deutlich verstärkt werden. Der lyso-Gb3-Level in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten konnte nach 14 Tagen Behandlung und 4 Tagen Auswaschung von einer 12,5-fachen auf eine 5-fache Erhöhung im Vergleich zur WT1-Linie reduziert aber nicht normalisiert werden. Dennoch lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass das Potential von BTZ zur lyso-Gb3-Clearance noch nicht vollständig ausgeschöpft ist.

Darüber hinaus konnte die Effizienz von BTZ durch die Kombination mit DGJ noch gesteigert werden. Die Kombinationsbehandlung von 50 µM DGJ und 5 nM BTZ konnte die lyso-Gb3-Ansammlungen in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten nach 14 Tagen Behandlung und 4 Tagen Auswaschung der Substanzen auf 30 % der unbehandelten Zellen reduzieren, was dem 3,75-Fachen des lyso-Gb3-Levels in den WT1-Fibroblasten entsprach. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass BTZ den lyso-Gb3-Level in Morbus Fabry-Zellen reduziert und hierbei zudem additive Effekte in der Kombination mit DGJ aufweist.

Die von Benjamin und Kollegen als notwendig demonstrierte Auswaschung von DGJ für mehrere Tage zur Reduktion von Gb3 in Morbus Fabry-Fibroblasten⁹¹ fand auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung, bei welcher die erzielten Vorergebnisse nach unterschiedlichen Auswaschungszeiten ähnliches zeigten. Die Notwendigkeit der Auswaschung von DGJ könnte auf dessen inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der α -Gal A⁵⁹ zurückzuführen sein. Dies könnte auch erklären, warum eine Verdopplung der Behandlungsdauer von 7 auf 14 Tage keine Verstärkung der lyso-Gb3-Clearance mittels DGJ erzielte. Der DGJ-Effekt auf lyso-Gb3-Ansammlungen könnte wahrscheinlich nur durch Anpassungen der Auswaschungsdauer statt der Behandlungsdauer optimiert werden. Dieser Zusammenhang liefert den Hinweis auf eine therapeutische Limitation hinsichtlich der lyso-Gb3-Clearance in Morbus Fabry-Patienten. Dabei verdeutlichten auch Studien im Morbus Fabry-Maus-Modell, dass signifikant stärkere Reduktionen an lyso-Gb3 im Gewebe mit einer intermittierenden DGJ-Therapie im Vergleich zur täglichen Anwendung erreicht wurden¹²⁷. Dagegen zeigten die in dieser Arbeit im Rahmen der Optimierung der Behandlungs- und Auswaschungszeiten durchgeführten Vorversuche, dass die BTZ-Behandlung der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten auch ohne Auswaschung den lyso-Gb3-Level nach 7 Tagen (n=1) bzw. 10 Tagen (n=2) jeweils auf das 0,7-Fache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen reduzieren konnte (Daten nicht gezeigt). Trotz der niedrigen Gruppengröße suggerieren die Ergebnisse, dass, um den optimalen BTZ-Effekt auf die lyso-Gb3-Clearance darzustellen, von einer Auswaschung dieser Substanz abgesehen werden kann. Die Unabhängigkeit von einer Auswaschung stellt möglicherweise einen Vorteil in der therapeutischen Anwendung von BTZ im Vergleich zu DGJ bei Morbus Fabry-Patienten dar.

Um einen direkten Vergleich der Effekte von DGJ und BTZ auf die Aktivität der α -Gal A und den intrazellulären lyso-Gb3-Level zu erhalten, wurden die Enzymaktivitäten ebenfalls nach

14 Tagen Behandlungszeit und 6 h bzw. 4 Tagen Auswaschung bestimmt. Dabei konnte der BTZ-Effekt auf die Enzymaktivität nach 4 Tagen Auswaschung nicht mehr nachgewiesen werden. Da trotz Auswaschung eine massive lyso-Gb3-Clearance auftrat, lässt dies darauf schließen, dass die lyso-Gb3-Neubildung langsam genug abläuft, um einen stabilen Effekt von BTZ auf den lyso-Gb3-Level zu gewährleisten. Nach 14 Tagen Behandlung und 6 h Auswaschung war der Effekt von BTZ vergleichbar mit dem 5-tägigen Behandlungsschema, das ebenfalls 6 h Auswaschung beinhaltet. Obwohl DGJ und BTZ ähnlich starke Effekte auf die Enzymaktivität hatten, erfolgte mittels BTZ eine deutlich stärkere lyso-Gb3-Clearance. Wie bereits erwähnt, kann DGJ im vorliegenden System als Inhibitor des Enzyms agieren, wodurch die Aktivität der α -Gal A und die lyso-Gb3-Clearance gleichermaßen beeinflusst wären. Andererseits könnte die unterschiedliche Wirkung auf lyso-Gb3 darauf hinweisen, dass ein von der Enzymaktivitätssteigerung unabhängiger Effekt von BTZ auf die lyso-Gb3-Ansammlungen vorliegt. Beispielsweise könnte BTZ einen regulatorischen Effekt auf bestimmte Gene des CLEAR (*coordinated lysosomal expression and regulation*)-Netzwerkes¹²⁸ haben, deren Wirken zu erhöhtem Abbau oder zur verstärkten Exozytose¹²⁹ des lysosomalen lyso-Gb3 führen. Die Kombinationsbehandlung mit DGJ und BTZ für 14 Tage mit anschließender 6-stündiger Auswaschung bewirkte eine überraschend hohe Aktivitätssteigerung der α -Gal A auf das 24-Fache der Kontrolle. Dies ist konsistent mit der beobachteten starken lyso-Gb3-Clearance mittels Kombinationsbehandlung zu diesem Zeitpunkt. Allerdings ist der Clearance-Effekt im Vergleich zur BTZ-Einzelbehandlung nicht so dramatisch wie bei der Enzymaktivitätssteigerung. Es ist nach jetzigem Kenntnisstand noch unklar, worauf diese verhältnismäßig starke Aktivitätserhöhung basiert.

Die Kinetik von lyso-Gb3 ist bisher wenig beschrieben. Es ist bereits bekannt, dass lyso-Gb3 durch Umwandlung von Gb3, katalysiert durch die saure Ceramidase (kodiert vom *AHSA1*-Gen), entsteht⁴⁹. Es sind noch Untersuchungen notwendig, um weitere Synthesewege auszuschließen. Der Abbau von lyso-Gb3 bzw. Gb3 erfolgt über hydrolytische Spaltung durch die α -Gal A unter Bildung von Lactosylsphingosin³⁹ bzw. Lactosylceramid¹³⁰. Man geht davon aus, dass die Synthese von lyso-Gb3 einen positiven Sachverhalt darstellt, da es im Gegensatz zu Gb3 wasserlöslich ist und vom Körper ausgeschieden werden kann. Auf diese Weise schützt die lyso-Gb3-Synthese vor einer Überladung der Lysosomen mit Gb3. Tatsächlich kommt es zu einer ca. 100-fachen Erhöhung an lyso-Gb3 im Plasma von männlichen Patienten mit klassischem Morbus Fabry und zu einer mehr als 100-fachen Erhöhung an lyso-Gb3 in der Gallenflüssigkeit von Morbus Fabry-Mäusen⁴⁹. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Expressionsdaten zeigten eine Erhöhung der *AHSA1*-Expression nach Behandlung mit PRs, welche signifikant nach Behandlung mit MG132- bzw. BTZ war (MG132: 2,19-fach, BTZ: 1,89-fach,

CLC: 1,12-fach, EerI: 1,37-fach erhöht; Daten nicht gezeigt). Diese könnte eine Funktionserhöhung der sauren Ceramidase und damit einen schnelleren Abbau von Gb3 und lyso-Gb3 bewirken. Da die lyso-Gb3-Level nach Behandlung mit BTZ dennoch abnehmen, ist die lyso-Gb3-Clearance wahrscheinlich effektiver als dessen, möglicherweise verstärkte, Synthese. Die Kinetik der Synthese und des Abbaus von lyso-Gb3 weist damit eine hohe Komplexität auf und stellt ein wichtiges zukünftiges Projekt dar.

4.3 Wirkmechanismen der effektiven PRs

Ein weiteres grundlegendes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkmechanismen der effektiven PRs zu charakterisieren. Für DGJ ist bereits beschrieben, dass es an das aktive Zentrum der α -Gal A bindet, dadurch die Stabilität und Faltung des Proteins fördert und den Transport aus dem ER in die Lysosomen verstärkt⁴⁴. Im Vordergrund stand hierbei, die Einflüsse der Wirkstoffe auf Degradations- und transkriptionelle Regulationsmechanismen als mögliche Grundlage ihres Effektes auf die α -Gal A zu untersuchen.

4.3.1 *GLA*-Expressionserhöhung als ein Wirkmechanismus der PRs

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten machen deutlich, dass MG132, BTZ, CLC und EerI im Gegensatz zu DGJ die mRNA-Expression von WT- und mutanter *GLA* erhöhen. Der ausbleibende Effekt von DGJ auf die *GLA*-Expression in den WT1- und *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Ishii und Kollegen, welche zeigten, dass die Behandlung von Lymphoblasten mit DGJ keinen Einfluss auf den *GLA*-mRNA-Level besaß⁵⁹. Eine 2010 veröffentlichte Übersichtsarbeit verwies auf die Möglichkeit, über ein Hochdurchsatz-Screening Leitsubstanzen für die Aktivierung des *GLA*-Promotors zu identifizieren, welche chemisch optimiert und zur Wirkstoffentwicklung verwendet werden können³⁶. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Wirkstoffe identifiziert, die in der Lage sind, die *GLA*-Expression zu induzieren. Allerdings ist die Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A wahrscheinlich nicht ausschließlich auf die verstärkte *GLA*-Expression zurückzuführen. Der Wirkstoff Celastrol erhöhte ebenfalls die Expression von WT- und mutanter *GLA*, hatte jedoch keinen positiven Einfluss auf die Aktivität der α -Gal A. Celastrol bewirkte auch in einer 2014 veröffentlichten Studie keine Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A in Fibroblasten von Morbus Fabry-Patienten¹¹⁸, was in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden konnte.

Motabar und Kollegen diskutierten bereits 2010 den Nutzen von Substanzen, welche den *GLA*-Promotor aktivieren, so die Transkription des *GLA*-Gens verstärken und die Menge an α -Gal A in den Lysosomen erhöhen³⁶. In einem weiterführenden Projekt soll geprüft werden, ob ein direkter Einfluss der effektiven PRs auf den *GLA*-Promotor besteht bzw. soll der Effekt dieser Wirkstoffe auf die *GLA*-Promotor-Aktivität näher charakterisiert werden. Es ist bereits bekannt, dass eine Interaktion zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System und dem Autophagie-Lysosomen-System besteht. Dabei führt die proteasomale Inhibition, u. a. mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten BTZ, zu einer kompensatorischen Aktivierung des Autophagie-Lysosomen-Systems^{131,132}. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Erhöhung der *GLA*-Expression könnte daher über diese Interaktion erklärt werden.

4.3.2 Einfluss der proteasomalen Inhibition auf die Aktivität der α -Gal A

Es wurde bereits gezeigt, dass proteasomale Inhibitoren die Degradation fehlgefalteter lysosomaler Proteine vermindern und diese dadurch vermehrt in die Lysosomen transportiert werden^{25,63,35}. Da es sich bei den meisten unserer effektiven PRs um proteasomale Inhibitoren handelt, sollten die inhibitorischen Eigenschaften der PRs untersucht werden. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die PRs MG132, BTZ und CLC, welche sowohl in den *GLA*^{p.R301Q/o}- als auch in den *GLA*^{p.R301G/o}-Fibroblasten die Aktivität mutanter α -Gal A erhöhten, in ihren effektivsten Konzentrationen gleichzeitig die proteasomale Aktivität inhibierten. Da die Chymotrypsin-ähnliche proteasomale Aktivität die größte Bedeutung im Proteinabbau einnimmt¹⁹, wird diese in den folgenden Ausführungen allgemein als proteasomale Aktivität bezeichnet. Eine klinische Studie zur Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom zeigte, dass eine proteasomale Inhibition von ca. 69 % bereits biologisch relevant ist¹³³. Diese wird mit den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von 0,3 μ M MG132 bzw. 5 μ M CLC und einer Inhibition um 80 % bzw. 99 %, überschritten. Die zur Aktivitätserhöhung optimale Konzentration an BTZ von 5 nM erzielte eine Inhibition um 44 %. Daher könnte auch die proteasomale Inhibition die erhöhte Aktivität und Proteinmenge mutanter α -Gal A in den Morbus Fabry-Fibroblasten nach Behandlung mit den effektiven PRs erklären.

Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die proteasomale Hemmung zwar eine zentrale Rolle für den beobachteten Effekt auf die α -Gal A spielt, aber nicht die vollständige Erklärung für diesen liefert. Die proteasomale Inhibition verläuft konzentrationsabhängig für die verwendeten Wirkstoffe (siehe Dosis-Wirkungs-Kurven in Strauss und Kollegen¹³⁴ sowie Felsenberg und Kollegen¹³⁵). Dies belegen auch eigene Daten, bei denen beispielsweise 50 nM BTZ in unserem

Zellsystem eine nahezu vollständige Hemmung der proteasomalen Aktivität um 97 % bewirkten (Daten nicht gezeigt). Der maximale Effekt auf die Aktivität der α -Gal A wurde für BTZ allerdings in niedrigeren Konzentrationen gemessen mit schwächerem Effekt auf die proteasomale Aktivität. Weiterhin zeigte der effektive PR EerI keine inhibitorische Wirkung auf das Proteasom und ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht als proteasomaler Inhibitor bekannt. Zum anderen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der proteasomale Inhibitor Celastrol in einer Konzentration von 1 μ M zwar die proteasomale Aktivität auch in unserem Zellsystem signifikant um 25 % reduzierte, allerdings ohne einen Effekt auf die Aktivität mutanter α -Gal A zu zeigen. Es besteht also keine Korrelation zwischen der Stärke der proteasomalen Inhibition und dem Ausmaß der Aktivitätssteigerung der α -Gal A. Diese Hypothese wird durch eine Studie von Mu und Kollegen unterstützt. Hierbei zeigten MG132 und Celastrol aktivitätssteigernde Effekte auf mutante GCase in Fibroblasten von Morbus Gaucher-Patienten²⁵. Beide Wirkstoffe inhibierten außerdem die Chymotrypsin-ähnliche proteasomale Aktivität. Da weitere gleichermaßen potente proteasomale Inhibitoren jedoch keinen positiven Einfluss auf die GCase-Aktivität zeigten, wurde postuliert, dass die proteasomale Inhibition allein nicht ausreicht, um die Funktion der PRs zu erklären.

Die Behandlung des Multiplen Myeloms mit BTZ basiert auf dessen proteasomaler Inhibition¹²³. Da die Stärke der proteasomalen Inhibition für die Aktivitätserhöhung der α -Gal A nicht ausschlaggebend zu sein scheint, liegt es nahe, dass für eine Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A *in vivo*, niedrigere Konzentrationen als der für die Behandlung von Myelom-Patienten verwendeten ausreichen sollten, wobei die in hohen Dosen auftretenden Nebenwirkungen minimiert werden könnten. Beispielsweise liegt die maximal erreichte Plasmakonzentration an BTZ bei Standardtherapie von Patienten mit Multiplem Myelom bei ca. 290 nM^{123,125}. Währenddessen beträgt die innerhalb der vorliegenden Arbeit ermittelte effektivste Konzentration an BTZ für die Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A 5 nM. Da es sich bei Morbus Fabry um eine progredient verlaufende genetische Erkrankung handelt, müsste eine (Intervall-) Behandlung mit BTZ lebenslang durchgeführt werden. Um den klinischen Einsatz von BTZ für Langzeittherapien von Morbus Fabry-Patienten hinsichtlich Nutzen und Risiken beurteilen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen u. a. im Tiermodell erforderlich.

4.3.3 Transkriptionelle Einflüsse der PRs

Es wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben, dass die Funktion von PRs, wie proteasomalen Inhibitoren oder anderen ERAD-Inhibitoren, u. a. auf einer Regulation der Expression von Proteostasegenen basiert^{25,64,76}. Darüber hinaus ist bekannt, dass die proteasomale Aktivität einen essenziellen Einfluss auf die Genexpression hat. Dies gilt sowohl für proteolytische als auch für nicht-proteolytische Funktionen des Proteasoms¹³⁶. Um zu prüfen, ob die Wirkung der in der vorliegenden Arbeit identifizierten effektiven PRs ebenfalls auf einer Regulation von Proteostasegenen basiert, wurde eine Transkriptomanalyse nach Behandlung der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit DGJ bzw. den PRs durchgeführt. Eine 2006 veröffentlichte Studie zeigte, dass DGJ keinen Einfluss auf die Expression einiger Gene besitzt, welche in den Zellstress-Signalweg, die Hitzeschock-Antwort, die Antwort auf ungefaltete Proteine (*unfolded protein response*, UPR) und die ERAD involviert sind⁴². Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit weit mehr Proteostasegene untersucht. Die ermittelten Transkriptomdaten belegen, dass DGJ innerhalb der festgelegten Grenzwerte (> 1,5-fach verschiedene Expression, $p < 0,05$) keine transkriptionellen Änderungen von Proteostasegenen bzw. generell auf globaler Genexpressionsebene bewirkt.

Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit ein starker Einfluss der effektiven PRs auf die globale Genexpression und im speziellen die Expression Proteostase-assoziiierter Gene nach Behandlung der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit MG132, BTZ, CLC bzw. EerI gezeigt werden. Die in dieser Arbeit erstellten transkriptionellen Signaturen der effektiven PRs sind erstmalig für Morbus Fabry-Fibroblasten untersucht worden. Sie beeinflussen sehr wahrscheinlich den Effekt der PRs auf die Aktivität mutanter α -Gal A. Dabei kommt es möglicherweise auf Grund der Integration verschiedener Faktoren zum Auftreten sowie positiver als auch negativer Einflüsse. Um positive Aspekte innerhalb der globalen transkriptionellen Signaturen (GT-Signaturen) zu identifizieren, ist es sinnvoll, einzelne Netzwerke, wie das Proteostase-Netzwerk, gezielt zu analysieren und schließlich die Effekte von Unternetzwerken und einzelnen Genen isoliert zu betrachten. Hinsichtlich der globalen Genexpression zeigten die GT-Signaturen von CLC und EerI große Übereinstimmungen, u. a. im Hinblick auf die Anzahl an differenziell exprimierten Genen nach Behandlung mit diesen Wirkstoffen. Auf Grund der Tatsache, dass EerI und CLC sehr unterschiedliche Primärfunktionen aufweisen, ist davon auszugehen, dass der Effekt auf Art und Anzahl der regulierten Gene auf einem sekundären Eingriff in das Proteostase-Netzwerk beruht, der auf Grund einer ähnlichen inneren Verschaltung der Signalwege zustande kommt. Durch die Filterung der GT-Signaturen von MG132, BTZ, CLC und EerI hinsichtlich

der Proteostasegene entstanden Proteostase-assoziierte transkriptionelle Signaturen (PT-Signaturen). Diese zeigten eine durch die Behandlung mit den vier PRs erzeugte Regulation zahlreicher ERAD-Gene, welche vorrangig hochreguliert wurden. Weiterhin wurde deutlich, dass in allen vier PT-Signaturen die Hochregulation einer Vielzahl von proteasomalen Untereinheiten auftrat. Diese lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass die Expression der proteasomalen Untereinheiten durch die Transkriptionsfaktoren Nrf1 oder Nrf2 erhöht wird. Diese wiederum werden proteasomal degradiert. Eine Inhibition der proteasomalen Aktivität führt daher zum verminderten Abbau von Nrf1 und Nrf2 und dies wiederum zur Induktion der Expression proteasomaler Gene²⁴. Dieser Mechanismus kann jedoch nicht der einzige zur Induktion proteasomaler Untereinheiten durch die Behandlung mit den effektiven PRs sein. Anders als bei MG132, BTZ und CLC handelt es sich bei EerI nicht um einen proteasomalen Inhibitor. EerI bewirkte stattdessen in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten eine signifikante Aktivierung aller proteasomalen Aktivitäten. Höchstwahrscheinlich ist dies bedingt durch die ebenfalls erzeugte Expressionserhöhung der proteasomalen Untereinheiten, wobei EerI ähnlich viele proteasomale Untereinheiten hochregulierte wie CLC. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt ein von der proteasomalen Aktivität unabhängiger Regulationsmechanismus der Expression proteasomaler Untereinheiten weder ausgeschlossen noch experimentell begründet werden.

Mu und Kollegen stellten 2008 heraus, dass PRs sowohl die Hitze-Schock-Antwort (*heat-shock response*, HSR) und damit die zytoplasmatische Proteostase als auch die UPR und damit die Proteostase des sekretorischen Signalweges aktivieren können. Auf Grund der Befunde schlossen die Autoren, dass die Aktivierung der UPR ausreichte, um die Proteostase innerhalb von LSDs mittels PR zu verbessern²⁵. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Proteostase des sekretorischen Signalweges. Auffällig war dabei die Regulation des PERK- bzw. ATF6-Signalweges, wohingegen IRE1-assoziierte Gene nicht beeinflusst wurden. Vorrangig ist der IRE1-Signalweg mit der ERAD assoziiert. Der PERK- und der ATF6-Signalweg stehen in Verbindung mit der Förderung der Faltungskapazität im ER²⁹. Es kann daher geschlossen werden, dass sich dieses Muster vorteilhaft auf die Faltung der α -Gal A auswirkt. Die in der vorliegenden Arbeit erstellten PT-Signaturen von MG132, BTZ, CLC und EerI zeigten sowohl Induktion als auch Herunterregulation des PERK- bzw. ATF6-Signalweges. Es ist schwer vorherzusagen, inwieweit eine UPR-Regulation den Abbau eines fehlgefalteten Proteins fördert bzw. dessen Faltung und Prozessierung²⁶. Die Aktivierung von Signalwegen der Proteinfaltung durch die Hochregulation von ER-Chaperonen und anderen Faltungskomponenten kann der Markierung von fehlgefalteten Proteinen zur Degradation entgegenwirken und die Faltung dieser Proteine durch wiederholte Chaperon-Zyklen ermöglichen. Im Gegensatz dazu vermindert die Aktivierung von ERAD-Signalwegen die Chaperon-assistierte Faltung von Proteinen²⁶.

Die bereits erläuterte Interaktion zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System als Teil der ER-assoziierten Proteostase und dem Autophagie-Lysosomen-System^{131,132} (vgl. Abschnitt 4.3.1) sowie der starke Einfluss der proteasomalen Inhibitoren auf die *GLA*-Expression legen nahe, die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Transkriptomdaten auch hinsichtlich des CLEAR-Netzwerkes¹²⁸ zu untersuchen. Dabei könnte eine Analyse der Expression von CLEAR-Genen nach Behandlung mit den effektiven PRs Aufschluss über einen systematischen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit PRs und der Regulation von CLEAR-Genen liefern. Unter Einbeziehung des in dieser Arbeit erstellten Workflows zur Identifizierung potenzieller Zielgene könnten Gene, z. B. Transkriptionsfaktoren, ermittelt werden, die weitere Einblicke in den Wirkmechanismus der PRs geben.

Zusammenfassend erhöhten die PRs die *GLA*-Expression sowie die Aktivität und Proteinmenge der α -Gal A, was wiederum eine Verminderung der lyso-Gb3-Ansammlungen zur Folge hatte. Dabei traten Synergien zwischen den PRs und DGJ auf. Während DGJ die Prozessierung und den Transport der α -Gal A in die Lysosomen verstärkt und damit dessen Abbau verhindert⁵⁹, kann die Wirkung von beispielsweise BTZ anhand unterschiedlicher Mechanismen erklärt werden (Abbildung 4.1). Unter anderem wird durch die erhöhte *GLA*-Expression mehr Protein synthetisiert und im ER zur Faltung und Prozessierung bereitgestellt. Die proteasomale Inhibition verhindert den vorzeitigen Abbau der α -Gal A. Weiterhin übt BTZ einen starken Einfluss auf die transkriptionelle Regulation innerhalb der Proteostase aus, dessen Auswirkung noch geprüft werden muss.

4.4 Neue Zielgene für die Verbesserung der Pathophysiologie des Morbus Fabry

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob die effektiven PRs die Proteostase insofern beeinflussen können, dass die Degradation mutanter α -Gal A vermindert und deren Faltung verstärkt wird. Daher wurden nach Behandlung der *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten mit den effektiven PRs die transkriptionell regulierten Gene hinsichtlich des Auftretens in verschiedenen PT-Signaturen, der Stärke der hervorgerufenen Regulation und ihrer Relevanz innerhalb der Proteostase gefiltert. Dabei wurden besonders Funktionen im Rahmen der UPR-Signalwege, der Faltung von Proteinen bzw. deren Ubiquitinierung und Retrotranslokation repräsentiert. Die resultierende Liste an potenziellen Einflussfaktoren für die Faltung der α -Gal A wurde mittels RNA-Interferenz validiert. Dabei zeigte sich, dass der Knockdown von *CCL2* und *UFDIL* eine signifikante Verminderung der Aktivität mutanter α -Gal A bewirkte. In den PT-Signaturen hingegen wurde eine Hochregulation dieser Gene beobachtet. Kombiniert mit der gleichzeitigen

Aktivitätserhöhung der α -Gal A, lässt dies darauf schließen, dass die Proteine CCL2 und UFD1L wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Faltung und Prozessierung der α -Gal A einnehmen.

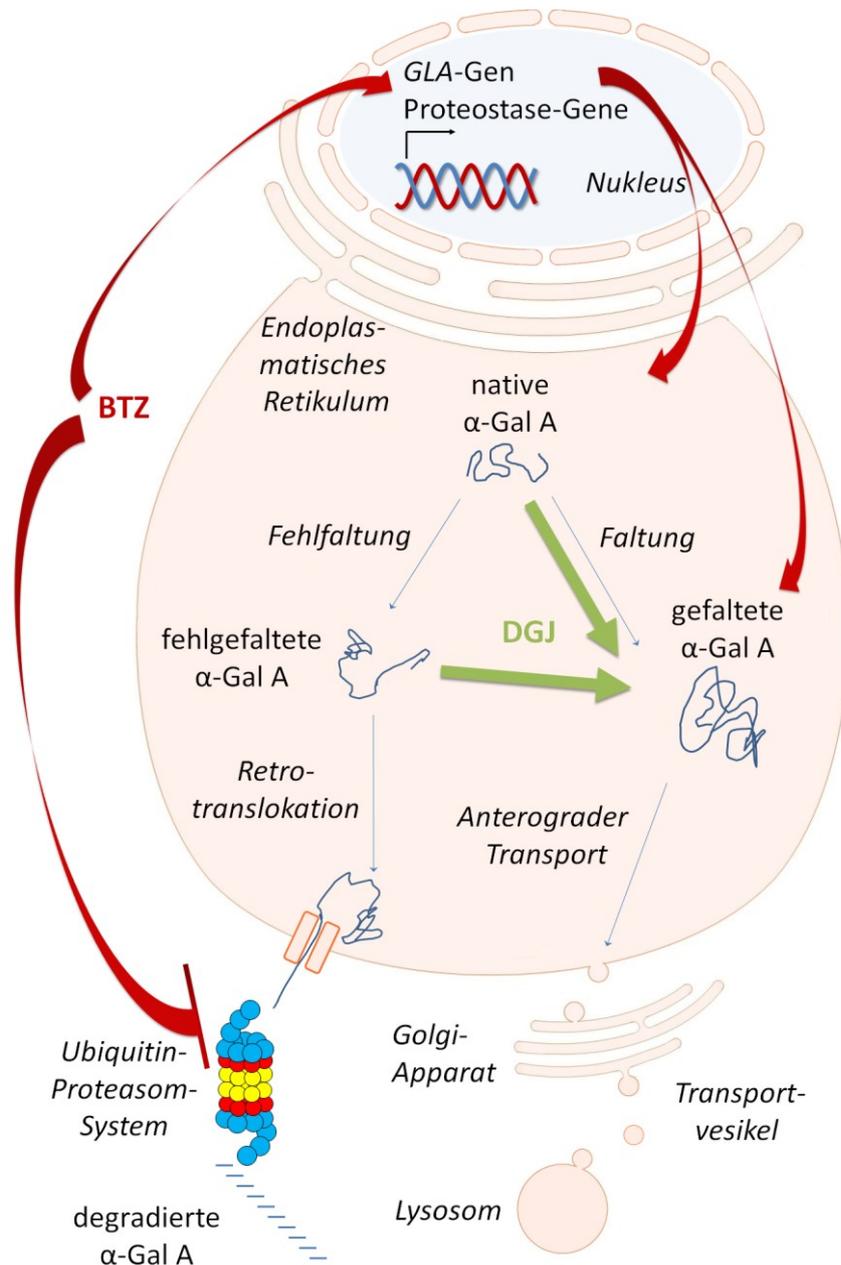


Abbildung 4.1: Synergie von DGJ und BTZ bei der Wiederherstellung der Funktion mutanter α -Gal A. BTZ hemmt zum einen die proteasomale Aktivität und induziert zum anderen die Expression des *GLA*-Gens. Beides erhöht den Pool mutanter α -Gal A im ER. Dadurch steht dem pharmakologischen Chaperon DGJ eine größere Menge an Enzym zur Faltung und Stabilisierung zur Verfügung, so dass mehr α -Gal A das ER verlässt und in die Lysosomen transportiert wird. Außerdem reguliert BTZ die Transkription von Proteostasegenen, z. B. von Chaperonen. Hierdurch kann die Faltung der α -Gal A zusätzlich verstärkt und noch mehr Enzym in die Lysosomen transportiert werden.

Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits in anderen Studien verfolgt. Christianson und Kollegen führten einen umfangreichen Knockdown von ERAD-Komponenten durch, über welchen gezeigt werden konnte, welche ERAD-Gene zum Abbau des entsprechend mutanten Proteins beitragen¹¹. In einer anderen Studie wurde untersucht, welchen Effekt der Knockdown einzelner Proteostasegene auf die Prozessierung von mutantern ATP7B, einem membranständigen Kupfer-Transporter, hat⁸⁰. In beiden Studien wurden die fehlgefalteten Proteine an ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) gekoppelt und die Menge an intrazellulärem Protein bzw. dessen Transport zum Zielort nach Knockdown einzelner Proteostasekomponenten untersucht. Darüber hinaus wurde im experimentellen Ansatz der vorliegenden Arbeit die Aktivität der α -Gal A als funktionalen *Readout* verwendet, so dass die Ergebnisse eine höhere Aussagekraft über die Auswirkung des Knockdowns liefern. In der letzteren beschriebenen Studie hatte der Knockdown von 7 der 11 herunterregulierten Gene einen negativen Effekt auf den Transport von ATP7B⁸⁰. Dass in der vorliegenden Arbeit nur zwei Gene identifiziert wurden, kann auf technischen Problemen bei der Durchführung basieren. Auf Grund dessen mussten 9 von 26 Kandidatengenomen wegen nicht bestandener Qualitätskontrolle aus der Auswertung genommen werden. Dabei könnten einige Proben u. a. durch den mehrwöchigen Transport Schaden genommen haben.

CCL2, dessen Knockdown die Aktivität mutanter α -Gal A vermindert und welches damit wahrscheinlich einen positiven Einfluss auf die Prozessierung und den Transport der α -Gal A besitzt, wurde über die unter Abschnitt 2.12 beschriebene Anreicherung von Genen mit Proteostase-assoziierten GO-Annotationen der Liste an Proteostasegenen hinzugefügt. Dabei wurde das *CCL2*-Gen, basierend auf den GO-Annotationen, dem PERK-Signalweg zugeordnet. Es ist bereits bekannt, dass *CCL2* den Calcium-Einstrom in Monozyten induziert¹³⁷. Dies lässt vermuten, dass *CCL2* auch in anderen Zellen mit dem Calciumhaushalt in Verbindung steht. Da die Proteinfaltung sehr stark vom Calcium-Spiegel im ER abhängt¹³, könnte die Hochregulation von *CCL2* die Faltungskapazitäten im ER dadurch indirekt erhöhen. Dies wiederum könnte dessen Wirkung auf die Aktivität der α -Gal A begründen. Die Analyse der Microarray-Daten der vorliegenden Arbeit zeigte eine Herunterregulation von *CCL2* nach Behandlung mit BTZ und eine Hochregulation nach Behandlung mit CLC und EerI. Alle drei Behandlungen erzielten eine Erhöhung der Aktivität mutanter α -Gal A. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der PRs auf die Expression von *CCL2* zukünftig systematisch untersucht werden. Weiterhin ist es möglich, dass nicht Änderungen in der Expression, sondern in der Aktivität des *CCL2*-Proteins für dessen Einfluss auf die α -Gal A verantwortlich sind. *CCL2* ist bereits umfangreich beschrieben¹³⁸. Dabei handelt es sich um ein proinflammatorisches Chemokin, wobei *CCL2* außerdem

Insulin-Resistenz vermittelt. Es spielt eine Rolle als potentiell Zielmolekül in vielen Krankheitsbildern. Weiterhin wurde bereits im Maus-Modell gezeigt, dass eine Erhöhung der CCL2-Level die Expression von ER-Chaperonen induziert, v. a. HSPA5¹³⁹. Auf Grundlage dessen könnte CCL2 sowohl für Hoch- als auch für Herunterregulationen ein interessantes Target für die Untersuchung der Prozessierung der α -Gal A sein. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte BTZ-induzierte Herunterregulation der CCL2-Expression könnte einen positiven Einfluss auf inflammatorische Prozesse bei Morbus Fabry besitzen, nicht zuletzt da CCL2 bereits als gewebespezifischer (Herz) pro-inflammatorischer Biomarker für Morbus Fabry bekannt ist^{140,141} und durch lyso-Gb3 induziert wird¹⁴². Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten zeigten allerdings trotz des stark erhöhten lyso-Gb3-Levels keine Hochregulation der CCL2-Expression.

Auch der Knockdown von *UFD1L* verringerte die Aktivität mutanter α -Gal A. Das Protein UFD1L bildet zusammen mit VCP und NPLOC4 einen Komplex, welcher fehlgefaltete Proteine aus dem ER ins Zytoplasma transportiert, wo sie proteasomal degradiert werden¹⁴³. Die Expression des *UFD1L*-Gens wurde durch die Behandlungen mit MG132, BTZ, CLC und Eerl annähernd verdoppelt. Hierzu passt der Befund, dass eine Herunterregulation von UFD1L in einer verminderten Aktivität von α -Gal A resultierte. Da UFD1L in den Abbau fehlgefalteter Proteine involviert ist, liegt hier ein interessanter Befund vor, der eine neue Funktionalität von UFD1L in Bezug auf die Maturierung der α -Gal A nahelegen könnte. Es besteht u. a. die Möglichkeit, dass sekundäre Mechanismen von UFD1L bzw. ein negativer Feedback-Mechanismus für dessen Effekt verantwortlich sein könnten. CCL2 und UFD1L können auf Grund der vorliegenden Untersuchungen für zukünftige Studien zur gezielten pharmakologischen Beeinflussung vorgeschlagen werden, um den Mechanismus des Einflusses auf die Aktivität der α -Gal A genauer zu untersuchen. Die durch das Hochdurchsatz-Screening eingegrenzten potenziellen Zielgene für die Beeinflussung der Aktivität der α -Gal A müssen weiter validiert und der genaue Einfluss der Zielgene charakterisiert werden.

Allgemein sind Proteostasekomponenten, vor allem Chaperone, in Abhängigkeit vom Zielprotein entweder für die Faltung oder die Degradation des entsprechenden Proteins verantwortlich^{10,102}. Außerdem werden bei jedem ERAD-assoziierten Abbauprozess weitere spezifische Proteostasekomponenten für die Degradation benötigt^{10,11}. Daher lässt sich schwer vorhersagen, welche Proteostasekomponenten in die Faltung oder Degradation eines Substrates involviert sind, wodurch die Beeinflussung von Zielgenen innerhalb der Proteostase immer substratspezifisch erfolgen sollte. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten liefern einen ersten Schritt zur Aufklärung des substratspezifischen ERAD-Netzwerkes der α -Gal A, wie es bereits für andere Proteine identifiziert wurde¹¹.

4.5 Klinische Aspekte

Wie bereits beschrieben, resultiert die fehlende oder stark reduzierte Aktivität der α -Gal A bei Morbus Fabry-Patienten in einer Ansammlung von lyso-Gb3 im Blutplasma, Urin und den Lysosomen⁵². Die orale Applikation von DGJ bewirkt bei der Mehrzahl an Patienten mit DGJ-responsiven *GLA*-Mutationen eine Erhöhung der Aktivität von α -Gal A und eine Abnahme von lyso-Gb3 im Plasma⁴³. In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus deutlich, dass die Reduktion von lyso-Gb3 in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten nach DGJ-Behandlung im Vergleich zur BTZ-Behandlung nur gering ausfiel. Dabei ist die lyso-Gb3-Clearance vordergründig bei der Behandlung von Morbus Fabry, da ihm eine ursächliche Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung zugesprochen wird. Beispielsweise induziert lyso-Gb3 in Konzentrationen, welche im Plasma von symptomatischen Morbus Fabry-Patienten auftreten, die Proliferation von glatter Muskulatur *in vitro*³⁹. Außerdem inhibiert lyso-Gb3 das Wachstum und die Differenzierung von Fibroblasten sowie deren Kollagensynthese¹⁴⁴. Lyso-Gb3 trägt weiterhin zur Sensibilisierung peripherer nozizeptiver Neurone bei, wobei Plasma-lyso-Gb3-Level und Schmerzen in Morbus Fabry-Patienten korrelieren⁴⁹. Aerts und Kollegen zeigten darüber hinaus, dass lyso-Gb3 durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Gb3, dessen Abbau in Fibroblasten durch die α -Gal A inhibiert und damit zu verstärkten Gb3-Ablagerungen in Fibroblasten führt. In der entsprechenden Studie wurde ebenfalls eine direkte Inhibition rekombinanter α -Gal A durch lyso-Gb3 demonstriert³⁹. Dies legt nahe, dass bei Patienten mit weit fortgeschrittenem Morbus Fabry und hohen lyso-Gb3-Werten die Effizienz einer ERT bzw. DGJ-Behandlung, zumindest in einigen Geweben, limitiert sein könnten. Sollte BTZ die intrazellulären lyso-Gb3-Ansammlungen unabhängig von der α -Gal A reduzieren, beispielsweise über eine verstärkte Autophagie^{131,132} oder lysosomale Exozytose¹²⁹, dann könnte der Wirkstoff eine mögliche vielversprechende therapeutische Option für die Verbesserung der Pathophysiologie besonders bei weiter fortgeschrittenem Morbus Fabry darstellen. Mit BTZ konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein PR identifiziert werden, welcher den lyso-Gb3-Level in Morbus Fabry-Fibroblasten auf ca. 40 % reduzieren konnte. Die experimentellen Daten weisen somit darauf hin, dass mit der DGJ-Einzelbehandlung noch nicht das Optimum der möglichen lyso-Gb3-Reduktion im Patienten erreicht werden kann. Daher ist es wahrscheinlich, dass eine Kombination mit BTZ und eine damit erzeugte stärkere Clearance von lyso-Gb3 (vgl. Abbildung 3.10), die Erfolgsaussichten der DGJ-Behandlung verbessern könnten.

Es ist bereits bekannt, dass die Kombinationsbehandlung von Morbus Fabry-Patienten mit DGJ und ERT die Aktivität von α -Gal A im Plasma, in der Haut und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) im Vergleich zur ERT-Einzelbehandlung erhöht¹⁴⁵. In Morbus

Fabry-Fibroblasten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung aus MG132 und rekombinanter α -Gal A zu einer Verdopplung der Enzymaktivität bei gleichzeitiger verstärkter Abnahme an Gb3 im Vergleich zur Einzelbehandlung mit dem rekombinanten Enzym führt. Als ursächlich wurden eine Stabilisierung des Enzyms und eine verminderte proteasomale Degradation der rekombinanten α -Gal A betrachtet¹⁴⁶. Auf Grundlage dieser Befunde und unter Einbeziehung der positiven Effekte von BTZ im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie der strukturellen Ähnlichkeit von MG132 und BTZ liegt es nahe, dass die Kombinationsbehandlung mit BTZ und rekombinanter α -Gal A in Morbus Fabry-Fibroblasten einen gleichermaßen positiven Effekt auf die Aktivität der α -Gal A im Vergleich zur Einzelbehandlung mit rekombinanter α -Gal A haben könnte. Ein positiver Befund würde auf die Möglichkeit der kombinierten Behandlung von Morbus Fabry-Patienten mit einer ERT und BTZ hinweisen. Weiterhin unterstreicht dieser Zusammenhang die Hypothese, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Erhöhung der *GLA*-Expression durch die effektiven PRs nicht deren alleiniger Wirkmechanismus darstellen kann. Vielmehr scheinen ebenfalls die Stabilisierung der α -Gal A sowie eine verminderte Degradation durch die proteasomale Inhibition verantwortlich zu sein. Der Einfluss der transkriptionellen Regulationen kann in seiner Komplexität nur in Form von Analysen singulärer Komponenten erfolgen. Es kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass ein Effekt auf die Faltung, den Transport und die Aktivität der α -Gal A durch die Signaturen besteht.

Unklar ist weiterhin, ob und in welchem Maße, die in der vorliegenden Arbeit identifizierten effektiven PRs die Aktivität mutanter α -Gal A in Patientenzellen mit anderen *missense*-Mutationen steigern können. Dies gilt unter anderem für Mutationen, die nicht zugänglich für eine therapeutische Behandlung mittels DGJ sind^{143,127,147}. In einer anderen Studie wurde bereits gezeigt, dass BTZ die Aktivität sowohl PC-responsiver als auch nicht PC-responsiver α -Glucosidase (GAA) in Morbus Pompe erhöht⁶³. Dies unterstützt die Hypothese, dass auch nicht-DGJ-responsive *GLA*-Mutationen mittels BTZ positiv beeinflusst werden können. Ursache hierfür könnte eine von der α -Gal A unabhängige Reduktion intrazellulärer lyso-Gb3-Level sein und die damit verringerte Inhibition des Enzyms. Ebenfalls denkbar wäre, dass Enzyme, die für eine Chaperon-Wirkung unzugänglich sind, dennoch durch BTZ der vorzeitigen Degradation entgehen, zu den Lysosomen transportiert werden und dort ein (geringes) enzymatisches Potential aufweisen. Der zweite skizzierte Wirkmechanismus ist wahrscheinlicher, wobei der α -Gal A-unabhängige Prozess nach heutigem Kenntnisstand nicht auszuschließen ist.

Es wurden bereits proteasomale Inhibitoren der zweiten Generation entwickelt, welche die Nebenwirkungen von BTZ in der klinischen Anwendung reduzieren können¹⁴⁸. Hierzu gehören Carfilzomib und das oral verfügbare Ixazomib, welche 2012 bzw. 2016 für die Behandlung von

Patienten mit Multiplem Myelom zugelassen wurden^{149,150}. Ein weiterer proteasomaler Inhibitor der zweiten Generation ist das oral verfügbare Oprozomib. Dieses befindet sich zur Zeit in klinischen Studien für die Behandlung von malignen hämatologischen Erkrankungen sowie soliden Tumoren¹⁵¹. In Folgeexperimenten sollten auch diese proteasomalen Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aktivität endogener, mutanter α -Gal A untersucht werden, um perspektivisch eine mögliche klinische Applikation zu eruieren.

Der genaue Wirkmechanismus, mit dem die identifizierten effektiven PRs die Enzymaktivität der α -Gal A steigern und den lyso-Gb3-Level reduzieren, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die tatsächlichen Einflüsse der proteasomalen Inhibition und der transkriptionellen Regulation zu klären. Dennoch konnte die vorliegende Arbeit einen erheblichen Beitrag zum Verständnis des Wirkmechanismus einer molekularen Therapie mittels PRs beim Morbus Fabry leisten.

5 Zusammenfassung

Morbus Fabry ist eine X-chromosomal vererbte lysosomale Speichererkrankung. Ursache der Erkrankung sind Mutationen des *GLA*-Gens, welche zu fehlender oder verminderter Aktivität des lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase A (α -Gal A) führen. *Missense*-Mutationen des *GLA*-Gens können Fehlfaltungen und eine vorzeitige endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Degradation (ERAD) des prämaternen Proteins verursachen. Eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit der α -Gal A führt zu fortschreitender systemischer Ablagerung von Gb3 und lyso-Gb3 in den Lysosomen der Zellen. Dabei spielt v.a. lyso-Gb3 eine ursächliche Rolle in der Pathophysiologie von Morbus Fabry. Derzeitige Therapien beinhalten die Enzymersatztherapie (ERT) und das oral verfügbare pharmakologische Chaperon DGJ (Freiname: Migalastat; Handelsname: Galafold). Neuere Therapieansätze beschäftigen sich mit dem Einfluss von Proteostase-Regulatoren (PRs) auf die Aktivität mutanter α -Gal A. Bisherige Daten hierzu beziehen sich vorrangig auf Überexpressionsmodelle. Die Effektivität von PRs in Bezug auf die endogene Aktivität von α -Gal A wurde noch nicht in relevanten prä-klinischen Modellen getestet. Der genaue Wirkmechanismus der PRs ist augenblicklich Gegenstand der Forschung und die gezielte Ansteuerung der Proteostase über spezifische Zielgene ein vielversprechender Ansatz der Forschung.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Wirkstoffe aus der umfangreichen Klasse der Proteostase-regulierenden Substanzen zu identifizieren und Charakteristika über deren Wirkmechanismus anhand von funktionalen Analysen zum Morbus Fabry-Phänotyp (Biomarker, Enzymaktivität) sowie Genexpressionsanalysen zu untersuchen. Hierfür wurden humane Patientenfibroblasten mit den DGJ-responsiven Mutationen c.902G>A (p.R301Q) und c.901C>G (p.R301G) des *GLA*-Gens mit einer Auswahl von PRs behandelt.

Die Charakterisierung der Fibroblastenzelllinien ergab eine deutlich verminderte Aktivität und Proteinmenge an α -Gal A. Die lyso-Gb3-Level in diesen Zellen lagen um ein Vielfaches über den in WT-Fibroblasten gemessenen Werten. Die Aktivität der α -Gal A in den *GLA*^{p.R301Q/o}- beziehungsweise *GLA*^{p.R301G/o}-Fibroblasten konnte durch Behandlung mit DGJ wie erwartet erhöht werden. Es ist davon auszugehen, dass die beobachtete Erhöhung von medizinischer Relevanz ist, da beide Mutationen laut *European Public Assessment Report* der EMA als ansprechbare Mutationen gelistet werden und Patienten mit dieser Genetik gemäß der Zulassung für das Medikament innerhalb der Europäischen Union mit DGJ behandelt werden können. Die getesteten PRs MG132, BTZ, CLC und EerI zeigten einen positiven Effekt auf die Aktivität mutanter α -Gal A. Dabei fielen die entsprechenden Effekte in den *GLA*^{p.R301G/o}-Fibroblasten höher aus als in den *GLA*^{p.R301Q/o}-Fibroblasten. Der proteasomale Inhibitor MG132 und sein Derivat BTZ

zeigten sich als wirkungsvollste Substanzen bei der Erhöhung der Aktivität endogener α -Gal A. Die Behandlung mit BTZ erhöhte die Proteinmenge mutanter α -Gal A und konnte eine Verringerung der lyso-Gb3-Level in den Morbus Fabry-Fibroblasten erzielen. Hierbei traten starke synergistische Effekte zwischen BTZ und DGJ auf, was die klinische Relevanz dieser Substanz unterstreicht. Hinsichtlich der Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A wurden alle effektiven PRs positiv in Bezug auf Synergien mit DGJ getestet. Die effektivsten Konzentrationen von MG132, BTZ und CLC hinsichtlich der Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A hemmten die proteosomale Aktivität, wobei kein Zusammenhang zwischen Stärke der Inhibition und Ausmaß der Aktivitätserhöhung mutanter α -Gal A erkennbar wurde. Überraschenderweise wurde ebenfalls festgestellt, dass MG132, BTZ, CLC sowie EerI die *GLA*-Expression auf mRNA-Ebene um ein Vielfaches erhöhen. Zur genauen Analyse der Funktionalität der PRs sollten weitere experimentelle Argumente für einen komplexeren Wirkmechanismus gefunden werden, der die Beteiligung des Proteostase-Netzwerkes auf genregulatorischer Ebene einschließt, speziell die Zellantwort auf ungefaltete Proteine (UPR) und die ERAD. Dazu wurden mittels Genexpressionsanalysen sogenannte transkriptionelle Signaturen der effektiven PRs erstellt, welche zur tieferen Analyse auf einem eigens mittels Literatur- und Datenbank-Recherche erstellten Proteostase-Schema visualisiert wurden. Dabei waren mehrere ER-assoziierte Chaperone hochreguliert, was ein Zeichen für die Erhöhung der zellulären Proteinfaltungskapazität ist. Anschließend sollte der vermutete Einfluss selektierter Proteostasegene auf die Funktion mutanter α -Gal A mittels RNAi-Knockdown untersucht werden. *CCL2* und *UFDIL* konnten als Kandidatengene für eine mögliche pharmakologische Beeinflussung mutanter α -Gal A validiert werden. Es ist bereits bekannt, dass eine Erhöhung von zellulärem *CCL2* die Expression von ER-Chaperonen induziert. Zusammengenommen können die vorliegenden Daten eine potentielle protektive Funktionalität der Gene *CCL2* und *UFDIL* in der Pathologie des Morbus Fabry beschreiben.

Die positiven Effekte von MG132, BTZ, CLC und EerI hinsichtlich der Erhöhung der Aktivität endogener α -Gal A konnten in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden. Auch die Synergien zwischen DGJ und den effektiven PRs wurden in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Die identifizierten effektiven PRs konnten in ihrer Wirkungsweise charakterisiert und ein wesentlicher Teil des dem Effekt zugrunde liegenden Wirkmechanismus aufgeklärt werden. Somit konnte ein erheblicher Beitrag zum Verständnis des Wirkmechanismus einer molekularen Therapie mittels PRs beim Morbus Fabry geleistet werden. In klinischer Hinsicht weisen die experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass eine Kombination von DGJ mit BTZ und eine damit erzeugte stärkere lyso-Gb3-Clearance, die Erfolgsaussichten der Behandlung von Morbus Fabry-Patienten verbessern könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. & Balch, W. E. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 959–991 (2009).
 2. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. & Al, E. Glycosylation in the ER and Golgi Complex. in *Molecular Cell Biology* **4**, section 17.7 (2000).
 3. Ryno, L. M., Wiseman, R. L. & Kelly, J. W. Targeting unfolded protein response signaling pathways to ameliorate protein misfolding diseases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 346–352 (2013).
 4. Hegde, R. N., Parashuraman, S., Iorio, F., Ciciriello, F., Capuani, F., Carissimo, A., Carrella, D., Belcastro, V., Subramanian, A., Bounti, L., Persico, M., Carlile, G., Galiotta, L., Thomas, D. Y., di Bernardo, D. & Luini, A. Unravelling druggable signalling networks that control F508del-CFTR proteostasis. *Elife* **4**, 1–28 (2015).
 5. Ioannou, Y. A., Zeidner, K. M., Grace, M. E. & Desnick, R. J. Human alpha-galactosidase A: glycosylation site 3 is essential for enzyme solubility. *Biochem. J.* **332**, 789–797 (1998).
 6. Braulke, T. & Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 605–614 (2009).
 7. Guerriero, C. J. & Brodsky, J. L. The Delicate Balance Between Secreted Protein Folding and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Human Physiology. *Physiol. Rev.* **92**, 537–576 (2012).
 8. Anelli, T. & Sitia, R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* **27**, 315–327 (2008).
 9. Brodsky, J. L. & Skach, W. R. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 464–475 (2011).
 10. Brodsky, J. L. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem. J.* **404**, 353–363 (2007).
 11. Christianson, J. C., Olzmann, J. a, Shaler, T. a, Sowa, M. E., Bennett, E. J., Richter, C. M., Tyler, R. E., Greenblatt, E. J., Harper, J. W. & Kopito, R. R. Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat. Cell Biol.* **14**, 93–105 (2012).
 12. Minamino, T., Komuro, I. & Kitakaze, M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ. Res.* **107**, 1071–1082 (2010).
 13. Finger, F. & Hoppe, T. MicroRNAs meet calcium: Joint venture in ER proteostasis. *Sci. Signal.* **7**, re11 (2014).
 14. Ishii, S., Chang, H., Kawasaki, K., Yasuda, K., Wu, H.-L., Garman, S. C. & Fan, J.-Q. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem. J.* **406**, 285–295 (2007).
 15. Christianson, J. C. & Ye, Y. Cleaning up in the endoplasmic reticulum: Ubiquitin in charge. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 325–335 (2014).
 16. Olzmann, J. A., Kopito, R. R. & Christianson, J. C. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
 17. Komander, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 937–953 (2009).
 18. Lecker, S. H. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 1807–1819 (2006).
-

19. Goldberg, A. L. Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J. Cell Biol.* **199**, 583–588 (2012).
 20. Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. & Seemüller, E. The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367–380 (1998).
 21. Yang, H., Landis-Piwowar, K. R., Chen, D., Milacic, V. & Dou, Q. P. Natural compounds with proteasome inhibitory activity for cancer prevention and treatment. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 227–39 (2008).
 22. Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., Scheffer, G. L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., van der Heijden, J. W., Ylstra, B., Peters, G. J., Kaspers, G. L., Dijkmans, B. A. C., Scheper, R. J. & Jansen, G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* **112**, 2489–99 (2008).
 23. Abramova, E. B., Sharova, N. P. & Karpov, V. L. The proteasome: Destroy to live. *Mol. Biol.* **36**, 613–624 (2002).
 24. Xie, Y. Feedback regulation of proteasome gene expression and its implications in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 687–93 (2010).
 25. Mu, T. W., Ong, D. S. T., Wang, Y. J., Balch, W. E., Yates, J. R., Segatori, L. & Kelly, J. W. Chemical and Biological Approaches Synergize to Ameliorate Protein-Folding Diseases. *Cell* **134**, 769–781 (2008).
 26. Plate, L. & Wiseman, R. L. Regulating Secretory Proteostasis through the Unfolded Protein Response: From Function to Therapy. *Trends Cell Biol.* **27**, 722–737 (2017).
 27. Wang, M. & Kaufman, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 581–597 (2014).
 28. Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science (80-)*. **334**, 1081–1086 (2011).
 29. Hampton, R. Y. IRE1: A role in UPREgulation of ER degradation. *Dev. Cell* **4**, 144–146 (2003).
 30. Van Meel, E. & Klumperman, J. Imaging and imagination: Understanding the endo-lysosomal system. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 253–266 (2008).
 31. Lüllmann-Rauch, R. History and Morphology of the Lysosome. *Lysosomes* 1–16 (2005).
 32. Filocamo, M. & Morrone, A. Lysosomal storage disorders: Molecular basis and laboratory testing. *Hum. Genomics* **5**, 156–169 (2011).
 33. Futerman, A. H. & Van Meer, G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 554–565 (2004).
 34. Ballabio, A. & Gieselmann, V. Lysosomal disorders: From storage to cellular damage. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 684–696 (2009).
 35. Macías-Vidal, J., Girós, M., Guerrero, M., Gascón, P., Serratos, J., Bachs, O. & Coll, A. J. The proteasome inhibitor bortezomib reduced cholesterol accumulation in fibroblasts from Niemann-Pick type C patients carrying missense mutations. *FEBS J.* **281**, 4450–4466 (2014).
 36. Motabar, O., Sidransky, E., Goldin, E. & Zheng, W. Fabry Disease – Current Treatment and New Drug Development. *Curr. Chem. Genomics* **4**, 50–56 (2010).
 37. Hwu, W.-L., Chien, Y.-H., Lee, N.-C., Chiang, S.-C., Dobrovolsky, R., Huang, A.-C., Yeh, H.-Y., Chao, M.-C., Lin, S.-J., Kitagawa, T., Desnick, R. J., Hsu, L.-W. & Desnick, R. J. Newborn Screening for Fabry Disease in Taiwan Reveals a High Incidence of the Later-Onset Mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). *Hum. Mutat.* **30**, 1397–1405 (2009).
 38. Wittmann, J., Karg, E., Turi, S., Legnini, E., Wittmann, G., Giese, A. K., Lukas, J., Golnitz, U., Klingenhager, M., Bodamer, O., Muhl, A. & Rolfs, A. Newborn screening for lysosomal storage disorders in Hungary. *JIMD.Rep.* **6**, 117–125 (2012).
-

39. Aerts, J. M., Groener, J. E., Kuiper, S., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Ottenhoff, R., van Roomen, C., Mirzaian, M., Wijburg, F. A., Linthorst, G. E., Vedder, A. C., Rombach, S. M., Cox-Brinkman, J., Somerharju, P., Boot, R. G., Hollak, C. E., Brady, R. O. & Poorthuis, B. J. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2812–2817 (2008).
 40. Lemansky, P., Bishop, D. F., Desnick, R. J., Hasilik, A. & von Figura, K. Synthesis and processing of alpha-galactosidase A in human fibroblasts. Evidence for different mutations in Fabry disease. *J. Biol. Chem.* **262**, 2062–5 (1987).
 41. Bishop, D. F., Kornreich, R. & Desnick, R. J. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3903–3907 (1988).
 42. Yam, G. H.-F., Bosshard, N., Zuber, C., Steinmann, B. & Roth, J. Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **290**, C1076–C1082 (2006).
 43. Citro, V., Cammisa, M., Liguori, L., Cimmaruta, C., Lukas, J., Vittoria, M. & Andreotti, G. The large phenotypic spectrum of fabry disease requires graduated diagnosis and personalized therapy: A Meta-Analysis can help to differentiate missense mutations. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–16 (2016).
 44. Germain, D. P. Fabry disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 30 (2010).
 45. Boutin, M., Gagnon, R., Lavoie, P. & Auray-Blais, C. LC–MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. *Clin. Chim. Acta* **414**, 273–280 (2012).
 46. Gervas-Arruga, J., Cebolla, J. J., Irun, P., Perez-Lopez, J., Plaza, L., Roche, J. C., Capablo, J. L., Rodriguez-Rey, J. C., Pocovi, M. & Giraldo, P. Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the alpha-galactosidase A (GLA) gene. *BMC Genet.* **16**, 109 (2015).
 47. Sanchez-Niño, M. D., Sanz, A. B., Carrasco, S., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Valdivielso, J. M., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. & Ortiz, A. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: Implications for Fabry nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 1797–1802 (2011).
 48. Nowak, A., Mechtler, T., Kasper, D. C. & Desnick, R. J. Correlation of Lyso-Gb3 levels in dried blood spots and sera from patients with classic and Later-Onset Fabry disease. *Mol. Genet. Metab.* **121**, 320–324 (2017).
 49. Ferraz, M. J., Marques, A. R. A., Appelman, M. D., Verhoek, M., Strijland, A., Mirzaian, M., Scheij, S., Ouairy, C. M., Lahav, D., Wisse, P., Overkleeft, H. S., Boot, R. G. & Aerts, J. M. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: Formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett.* **590**, 716–725 (2016).
 50. Niemann, M., Rolfs, A., Störk, S., Bijmens, B., Breunig, F., Beer, M., Ertl, G., Wanner, C. & Weidemann, F. Gene mutations versus clinically relevant phenotypes lyso-gb3 defines fabry disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**, 8–16 (2014).
 51. Desnick, R. J., Brady, R., Barranger, J., Collins, A. J., Germain, D. P., Goldman, M., Grabowski, G., Packman, S. & Wilcox, W. R. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: Expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann. Intern. Med.* **138**, 338–346 (2003).
 52. Nowak, A., Mechtler, T. P., Desnick, R. J. & Kasper, D. C. Plasma LysoGb3: A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. *Mol. Genet. Metab.* **120**, 57–61 (2017).
 53. Mohamed, F. E., Al-Gazali, L., Al-Jasmi, F. & Ali, B. R. Pharmaceutical chaperones and proteostasis regulators in the therapy of lysosomal storage disorders: Current perspective and future promises. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–17 (2017).
-

54. Grubb, J. H., Vogler, C. & Sly, W. S. New Strategies for Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Diseases. *Rejuvenation Res.* **13**, 229–236 (2010).
55. Desnick, R. J. & Schuchman, E. H. Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **13**, 307–335 (2012).
56. Deegan, P. B. Fabry disease, enzyme replacement therapy and the significance of antibody responses. *J. Inherit. Metab. Dis.* **35**, 227–243 (2012).
57. Hoffmann, B. & Mayatepek, E. Fabry Disease. *Dtsch. Aerzteblatt Online* **106**, 440–7 (2009).
58. Markham, A. Migalastat: First Global Approval. *Drugs* **76**, 1147–1152 (2016).
59. Fan, J. Q., Ishii, S., Asano, N. & Suzuki, Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* **5**, 112–115 (1999).
60. Hamanaka, R., Shinohara, T., Yano, S., Nakamura, M., Yasuda, A., Yokoyama, S., Fan, J. Q., Kawasaki, K., Watanabe, M. & Ishii, S. Rescue of mutant α -galactosidase A in the endoplasmic reticulum by 1-deoxygalactonojirimycin leads to trafficking to lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1782**, 408–413 (2008).
61. Ishii, S., Chang, H.-H., Yoshioka, H., Shimada, T., Mannen, K., Higuchi, Y., Taguchi, A. & Fan, J.-Q. Preclinical Efficacy and Safety of 1-Deoxygalactonojirimycin in Mice for Fabry Disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 723–731 (2009).
62. Germain, D. P., Hughes, D. A., Nicholls, K., Bichet, D. G., Giugliani, R., Wilcox, W. R., Feliciani, C., Shankar, S. P., Ezgu, F., Amartino, H., Bratkovic, D., Feldt-Rasmussen, U., Nedd, K., Sharaf El Din, U., Lourenco, C. M., Banikazemi, M., Charrow, J., Dasouki, M., Finegold, D., Giraldo, P., Goker-Alpan, O., Longo, N., Scott, C. R., Torra, R., Tuffaha, A., Jovanovic, A., Waldek, S., Packman, S., Ludington, E., Viereck, C., Kirk, J., Yu, J., Benjamin, E. R., Johnson, F., Lockhart, D. J., Skuban, N., Castelli, J., Barth, J., Barlow, C. & Schiffmann, R. Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N. Engl. J. Med.* **375**, 545–555 (2016).
63. Shimada, Y., Nishimura, E., Hoshina, H., Kobayashi, H., Higuchi, T., Eto, Y., Ida, H. & Ohashi, T. Proteasome Inhibitor Bortezomib Enhances the Activity of Multiple Mutant Forms of Lysosomal α -Glucosidase in Pompe Disease. *JIMD Rep.* **18**, 33–9 (2015).
64. Wang, F., Song, W., Brancati, G. & Segatori, L. Inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues native folding in loss of function protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* **286**, 43454–43464 (2011).
65. Pipalia, N. H., Cosner, C. C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., Farley, N., Helquist, P., Wiest, O. & Maxfield, F. R. Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5620–5625 (2011).
66. Nakasone, N., Nakamura, Y. S., Higaki, K., Oumi, N., Ohno, K. & Ninomiya, H. Endoplasmic reticulum-associated degradation of Niemann-Pick C1: Evidence for the role of heat shock proteins and identification of lysine residues that accept ubiquitin. *J. Biol. Chem.* **289**, 19714–19725 (2014).
67. Carlile, G. W., Robert, R., Goepf, J., Matthes, E., Liao, J., Kus, B., Macknight, S. D., Rotin, D., Hanrahan, J. W. & Thomas, D. Y. Ibuprofen rescues mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking. *J. Cyst. Fibros.* **14**, 16–25 (2015).
68. Papadopoulos, P., Rosa-Neto, P., Rochford, J. & Hamel, E. Pioglitazone Improves Reversal Learning and Exerts Mixed Cerebrovascular Effects in a Mouse Model of Alzheimer's Disease with Combined Amyloid- β and Cerebrovascular Pathology. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
69. Calamini, B., Silva, M. C., Madoux, F., Hutt, D. M., Khanna, S., Chalfant, M. A.,

- Saldanha, S. A., Hodder, P., Tait, B. D., Garza, D., Balch, W. E. & Morimoto, R. I. Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 185–196 (2012).
70. Chiang, W.-C., Messah, C. & Lin, J. H. IRE1 directs proteasomal and lysosomal degradation of misfolded rhodopsin. *Mol. Biol. Cell* **23**, 758–770 (2012).
71. Shoulders, M. D., Ryno, L. M., Genereux, J. C., Moresco, J. J., Tu, P. G., Wu, C., Yates, J. R., Su, A. I., Kelly, J. W. & Wiseman, R. L. Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. *Cell Rep.* **3**, 1279–1292 (2013).
72. Lu, J., Yang, C., Chen, M., Ye, D. Y., Lonser, R. R., Brady, R. O. & Zhuang, Z. Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 21200–21205 (2011).
73. Shimada, Y., Nishida, H., Nishiyama, Y., Kobayashi, H., Higuchi, T., Eto, Y., Ida, H. & Ohashi, T. Proteasome inhibitors improve the function of mutant lysosomal α -glucosidase in fibroblasts from Pompe disease patient carrying c.546G>T mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 274–278 (2011).
74. Banugaria, S. G., Prater, S. N., McGann, J. K., Feldman, J. D., Tannenbaum, J. A., Bailey, C., Gera, R., Conway, R. L., Viskochil, D., Kobori, J. A., Rosenberg, A. S. & Kishnani, P. S. Bortezomib in the rapid reduction of high sustained antibody titers in disorders treated with therapeutic protein: Lessons learned from Pompe disease. *Genet. Med.* **15**, 123–131 (2013).
75. Lindquist, S. L. & Kelly, J. W. Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases-progress and prognosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
76. Wang, F., Agnello, G., Sotolongo, N. & Segatori, L. Ca²⁺ homeostasis modulation enhances the amenability of L444P glucosylcerebrosidase to proteostasis regulation in patient-derived fibroblasts. *ACS Chem. Biol.* **6**, 158–168 (2011).
77. Mu, T. W., Fowler, D. M. & Kelly, J. W. Partial restoration of mutant enzyme homeostasis in three distinct lysosomal storage disease cell lines by altering calcium homeostasis. *PLoS Biol.* **6**, 0253–0265 (2008).
78. Kirkegaard, T., Gray, J., Priestman, D. A., Wallom, K. L., Atkins, J., Olsen, O. D., Klein, A., Drndarski, S., Petersen, N. H. T., Ingemann, L., Smith, D. A., Morris, L., Bornæs, C., Jørgensen, S. H., Williams, I., Hinsby, A., Arenz, C., Begley, D., Jäättelä, M. & Platt, F. M. Heat shock protein-based therapy as a potential candidate for treating the sphingolipidoses. *Sci. Transl. Med.* **8**, 355ra118 (2016).
79. Wei, H., Kim, S. J., Zhang, Z., Tsai, P. C., Wisniewski, K. R. & Mukherjee, A. B. ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 469–477 (2008).
80. Concilli, M., Iacobacci, S., Chesi, G., Carissimo, A. & Polishchuk, R. A systems biology approach reveals new endoplasmic reticulum-associated targets for the correction of the ATP7B mutant causing Wilson disease. *Metallomics* **8**, 920–930 (2016).
81. Plate, L., Cooley, C. B., Chen, J. J., Paxman, R. J., Gallagher, C. M., Madoux, F., Genereux, J. C., Dobbs, W., Garza, D., Spicer, T. P., Scampavia, L., Brown, S. J., Rosen, H., Powers, E. T., Walter, P., Hodder, P., Luke Wiseman, R. & Kelly, J. W. Small molecule proteostasis regulators that reprogram the ER to reduce extracellular protein aggregation. *Elife* **5**, 1–19 (2016).
82. Kraus, M., Bader, J., Overkleeft, H. & Driessen, C. Nelfinavir augments proteasome inhibition by bortezomib in myeloma cells and overcomes bortezomib and carfilzomib resistance. *Blood Cancer J.* **3**, e103 (2013).
-

83. Sperandio, M., Paula, A., Demasi, D., Martinez, E. F., Saad, S. O., Pericole, F. V, Vieira, K. P., Freitas, N. S., Araújo, V. C., Brown, A. L., Trindade, J., -Napimoga, C. & Napimoga, M. H. 5d-PGJ 2 as an endoplasmic reticulum stress manipulator in multiple myeloma in vitro and in vivo. *Exp. Mol. Pathol.* **102**, 434–445 (2017).
 84. O’Leary, E. M. & Igdoura, S. A. The therapeutic potential of pharmacological chaperones and proteosomal inhibitors, Celastrol and MG132 in the treatment of sialidosis. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 173–185 (2012).
 85. Lukas, J., Pockrandt, A.-M., Seemann, S., Sharif, M., Runge, F., Pohlers, S., Zheng, C., Gläser, A., Beller, M., Rolfs, A. & Giese, A.-K. Enzyme Enhancers for the Treatment of Fabry and Pompe Disease. *Mol. Ther.* **23**, 456–464 (2015).
 86. Yam, G. H. F., Roth, J. & Zuber, C. 4-Phenylbutyrate rescues trafficking incompetent mutant α -galactosidase A without restoring its functionality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 375–380 (2007).
 87. Lukas, J., Giese, A. K., Markoff, A., Grittner, U., Kolodny, E., Mascher, H., Lackner, K. J., Meyer, W., Wree, P., Saviouk, V. & Rolfs, A. Functional Characterisation of Alpha-Galactosidase A Mutations as a Basis for a New Classification System in Fabry Disease. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
 88. Sakuraba, H., Oshima, A., Fukuhara, Y., Shimmoto, M., Nagao, Y., Bishop, D. F., Desnick, R. J. & Suzuki, Y. Identification of point mutations in the alpha-galactosidase A gene in classical and atypical hemizygotes with Fabry disease. *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 784–789 (1990).
 89. Lai, L., O’Meara, M., Lien, Y. H. Gene symbol: GLA Disease: Fabry disease. *Hum. Genet.* **109**, 469 (2001).
 90. Shabbeer, J., Yasuda, M., Luca, E. & Desnick, R. J. Fabry disease: 45 novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing the classical phenotype. *Mol. Genet. Metab.* **76**, 23–30 (2002).
 91. Benjamin, E. R., Flanagan, J. J., Schilling, A., Chang, H. H., Agarwal, L., Katz, E., Wu, X., Pine, C., Wustman, B., Desnick, R. J., Lockhart, D. J. & Valenzano, K. J. The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin increases α -galactosidase A levels in Fabry patient cell lines. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 424–440 (2009).
 92. Lukas, J., Scalia, S., Eichler, S., Pockrandt, A. M., Dehn, N., Cozma, C., Giese, A. K. & Rolfs, A. Functional and Clinical Consequences of Novel α -Galactosidase A Mutations in Fabry Disease. *Hum. Mutat.* **37**, 43–51 (2016).
 93. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45–e45 (2001).
 94. Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. & Gerhard, D. Dose-response analysis using R. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
 95. He, L., Kuleskiy, E., Saarela, J., Turunen, L., Wennerberg, K., Aittokallio, T. & Tang, J. Methods for High-Throughput Drug Combination Screening and Synergy Scoring. *Springer Protoc.* **25**, 829–848 (2016).
 96. Armbruster, D. A. & Pry, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* **29 Suppl 1**, S49-52 (2008).
 97. Bliss, C. I. The Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Ann. Appl. Biol.* **26**, 585–615 (1939).
 98. Irizarry, R. A. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249–264 (2003).
 99. Pico, A. R., Kelder, T., Van Iersel, M. P., Hanspers, K., Conklin, B. R. & Evelo, C. WikiPathways: Pathway Editing for the People. *PLoS Biol.* **6**, 1403–1407 (2008).
 100. Carlson, M. org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human. R package version 3.2.3. (2015).
 101. Tan, Y. L., Genreux, J. C., Pankow, S., Aerts, J. M. F. G., Yates, J. R. & Kelly, J. W.
-

- ERdj3 is an endoplasmic reticulum degradation factor for mutant glucocerebrosidase variants linked to Gaucher's disease. *Chem. Biol.* **21**, 967–976 (2014).
102. Yang, C., Rahimpour, S., Lu, J., Pacak, K., Ikejiri, B., Brady, R. O. & Zhuang, Z. Histone deacetylase inhibitors increase glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulation of molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 966–971 (2013).
103. Maor, G., Filocamo, M. & Horowitz, M. ITCH regulates degradation of mutant glucocerebrosidase: Implications to gaucher disease. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1316–1327 (2013).
104. Ron, I., Rapaport, D. & Horowitz, M. Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: A possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3771–3781 (2010).
105. El Khouri, E., Le Pavec, G., Toledano, M. B. & Delaunay-Moisan, A. RNF185 is a novel E3 ligase of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) that targets cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J. Biol. Chem.* **288**, 31177–31191 (2013).
106. van den Boomen, D. J. H., Timms, R. T., Grice, G. L., Stagg, H. R., Skodt, K., Dougan, G., Nathan, J. A. & Lehner, P. J. TMEM129 is a Derlin-1 associated ERAD E3 ligase essential for virus-induced degradation of MHC-I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11425–11430 (2014).
107. Lu, J. P., Wang, Y., Sliter, D. A., Pearce, M. M. P. & Wojcikiewicz, R. J. H. RNF170 protein, an endoplasmic reticulum membrane ubiquitin ligase, mediates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* **286**, 24426–24433 (2011).
108. Lin, P. H., Lan, W. M. & Chau, L. Y. TRC8 suppresses tumorigenesis through targeting heme oxygenase-1 for ubiquitination and degradation. *Oncogene* **32**, 2325–2334 (2013).
109. Deehan, R., Maerz-Weiss, P., Catlett, N. L., Steiner, G., Wong, B., Wright, M. B., Blander, G., Elliston, K. O., Ladd, W., Bobadilla, M., Mizrahi, J., Haefliger, C. & Edgar, A. Comparative transcriptional network modeling of three PPAR- α/γ co-agonists reveals distinct metabolic gene signatures in primary human hepatocytes. *PLoS One* **7**, e35012 (2012).
110. Määttänen, P., Gehring, K., Bergeron, J. J. M. & Thomas, D. Y. Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 500–511 (2010).
111. van Wijk, S. J. L. & Timmers, H. T. M. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J.* **24**, 981–993 (2010).
112. Tcherpakov, M., Delaunay, A., Toth, J., Kadoya, T., Petroski, M. D. & Ronai, Z. A. Regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation by RNF5-dependent ubiquitination of JNK-associated membrane protein (JAMP). *J. Biol. Chem.* **284**, 12099–12109 (2009).
113. Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Lu, S., Lipson, K. L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M. A. & Urano, F. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 744–755 (2010).
114. Vieitez, I., Souto-Rodriguez, O., Fernandez-Mosquera, L., San Millan, B., Teijeira, S., Fernandez-Martin, J., Martinez-Sanchez, F., Aldamiz-Echevarria, L. J., Lopez-Rodriguez, M., Navarro, C. & Ortolano, S. Fabry disease in the Spanish population: Observational study with detection of 77 patients. *Orphanet J. Rare Dis.* **13**, 1–13 (2018).
115. Mena-Barragán, T., Narita, A., Matias, D., Tiscornia, G., Nanba, E., Ohno, K., Suzuki, Y., Higaki, K., Fernández, J. M. G. & Ortiz Mellet, C. PH-Responsive Pharmacological Chaperones for Rescuing Mutant Glycosidases. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 11696–
-

- 11700 (2015).
116. Moore, D. F., Goldin, E., Gelderman, M. P., Robinson, C., Baer, J., Ries, M., Elkahloun, A., Brady, R. O. & Schiffmann, R. Apoptotic abnormalities in differential gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with Fabry disease. *Acta Paediatr.* **97**, 48–52 (2008).
117. Hernandez, M. A., Schulz, R., Chaplin, T., Young, B. D., Perrett, D., Champion, M. P., Taanman, J.-W., Fensom, A. & Marinaki, A. M. The diagnosis of inherited metabolic diseases by microarray gene expression profiling. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 34 (2010).
118. Yu, Y., Mena-Barragán, T., Higaki, K., Johnson, J. L., Drury, J. E., Lieberman, R. L., Nakasone, N., Ninomiya, H., Tsukimura, T., Sakuraba, H., Suzuki, Y., Nanba, E., Mellet, C. O., García Fernández, J. M. & Ohno, K. Molecular basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human α -galactosidase A: Pharmacological chaperoning efficacy on fabry disease mutants. *ACS Chem. Biol.* **9**, 1460–1469 (2014).
119. Cortez, L. & Sim, V. The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion* **8**, 1–6 (2014).
120. Owen, S. C., Doak, A. K., Ganesh, A. N., Nedyalkova, L., McLaughlin, C. K., Shoichet, B. K. & Shoichet, M. S. Colloidal drug formulations can explain ‘bell-shaped’ concentration-response curves. *ACS Chem. Biol.* **9**, 777–784 (2014).
121. Reynolds, A. R. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. *Dose-Response* **8**, 253–284 (2010).
122. Qiang, Y. W., Hu, B., Chen, Y., Zhong, Y., Shi, B., Barlogie, B. & Shaughnessy, J. D. Bortezomib induces osteoblast differentiation via Wnt-independent activation of β -catenin/TCF signaling. *Blood* **113**, 4319–4330 (2009).
123. Reece, D. E., Sullivan, D., Lonial, S., Mohrbacher, A. F., Chatta, G., Shustik, C., Burris, H., Venkatakrisnan, K., Neuwirth, R., Riordan, W. J., Karol, M., Von Moltke, L. L., Acharya, M., Zannikos, P. & Keith Stewart, A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of two doses of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 57–67 (2011).
124. Hughes, D. A., Nicholls, K., Shankar, S. P., Sunder-Plassmann, G., Koeller, D., Nedd, K., Vockley, G., Hamazaki, T., Lachmann, R., Ohashi, T., Olivotto, I., Sakai, N., Deegan, P., Dimmock, D., Eyskens, F., Germain, D. P., Goker-Alpan, O., Hachulla, E., Jovanovic, A., Lourenco, C. M., Narita, I., Thomas, M., Wilcox, W. R., Bichet, D. G., Schiffmann, R., Ludington, E., Viereck, C., Kirk, J., Yu, J., Johnson, F., Boudes, P., Benjamin, E. R., Lockhart, D. J., Barlow, C., Skuban, N., Castelli, J. P., Barth, J. & Feldt-Rasmussen, U. Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J. Med. Genet.* **54**, 288–296 (2017).
125. Hanley, M. J., Mould, D. R., Taylor, T. J., Gupta, N., Suryanarayan, K., Neuwirth, R., Esseltine, D. L., Horton, T. M., Aplenc, R., Alonzo, T. A., Lu, X., Milton, A. & Venkatakrisnan, K. Population Pharmacokinetic Analysis of Bortezomib in Pediatric Leukemia Patients: Model-Based Support for Body Surface Area-Based Dosing Over the 2- to 16-Year Age Range. *J. Clin. Pharmacol.* **57**, 1183–1193 (2017).
126. Bekri, S. Importance of glycosylation in enzyme replacement therapy. in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* (2006).
127. Young-Gqamana, B., Brignol, N., Chang, H.-H., Khanna, R., Soska, R., Fuller, M., Sitaraman, S. A., Germain, D. P., Giugliani, R., Hughes, D. A., Mehta, A., Nicholls, K., Boudes, P., Lockhart, D. J., Valenzano, K. J. & Benjamin, E. R. Migalastat HCl reduces globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) in Fabry transgenic mice and in the plasma of Fabry patients. *PLoS One* **8**, e57631 (2013).
-

128. Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M. & Ballabio, A. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3852–3866 (2011).
 129. Samie, M. A. & Xu, H. Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders. *J. Lipid Res.* **55**, 995–1009 (2014).
 130. Miller, J. J., Aoki, K., Moehring, F., Murphy, C. A., Hara, C. L. O., Tiemeyer, M., Stucky, C. L. & Dahms, N. M. Neuropathic pain in a Fabry disease rat model. *JCI insight* **3**, 1–19 (2018).
 131. Ji, C. H. & Kwon, Y. T. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Mol. Cells* **40**, 441–449 (2017).
 132. Cha-Molstad, H., Sung, K. S., Hwang, J., Kim, K. A., Yu, J. E., Yoo, Y. D., Jang, J. M., Han, D. H., Molstad, M., Kim, J. G., Lee, Y. J., Zakrzewska, A., Kim, S. H., Kim, S. T., Kim, S. Y., Lee, H. G., Soung, N. K., Ahn, J. S., Ciechanover, A., Kim, B. Y. & Kwon, Y. T. Amino-terminal arginylation targets endoplasmic reticulum chaperone BiP for autophagy through p62 binding. *Nat. Cell Biol.* **17**, 917–929 (2015).
 133. Moreau, P., Karamanesht, I. I., Domnikova, N., Kyselyova, M. Y., Vilchevska, K. V., Doronin, V. A., Schmidt, A., Hulin, C., Leleu, X., Esseltine, D. L., Venkatakrishnan, K., Skee, D., Feng, H., Girgis, S., Cakana, A., Van De Velde, H., Deraedt, W. & Facon, T. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and covariate analysis of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Clin. Pharmacokinet.* **51**, 823–829 (2012).
 134. Strauss, S. J., Higginbottom, K., Jülicher, S., Maharaj, L., Allen, P., Schenkein, D., Lister, T. A. & Joel, S. P. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Res.* **67**, 2783–2790 (2007).
 135. Felsenberg, J., Dyck, Y., Kloß, A., Dahlmann, B., Kloetzel, P.-M., Eisenhardt, D., Alberini, C. M., Martin, K. C., *et al.* Two inhibitors of the ubiquitin proteasome system enhance long-term memory formation upon olfactory conditioning in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Exp. Biol.* **217**, 3441–6 (2014).
 136. Kwak, J., Workman, J. L. & Lee, D. The proteasome and its regulatory roles in gene expression. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1809**, 88–96 (2011).
 137. Sano, H., Hsu, D. K., Yu, L., Apgar, J. R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., Hirashima, M. & Liu, F.-T. Human Galectin-3 Is a Novel Chemoattractant for Monocytes and Macrophages. *J. Immunol.* **165**, 2156–2164 (2000).
 138. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interf. Cytokine Res.* **29**, 313–326 (2009).
 139. Rull, A., Camps, J., Alonso-Villaverde, C. & Joven, J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm.* **2010**, 1–11 (2010).
 140. Beirão, I., Cabrita, A., Torres, M., Silva, F., Aguiar, P., Laranjeira, F. & Gomes, A. M. Biomarkers and Imaging Findings of Anderson-Fabry Disease-What We Know Now. *Diseases* **5**, 15 (2017).
 141. Rozenfeld, P. & Feriozzi, S. Contribution of inflammatory pathways to Fabry disease pathogenesis. *Mol. Genet. Metab.* **122**, 19–27 (2017).
 142. Sanchez-Niño, M. D., Carpio, D., Sanz, A. B., Ruiz-Ortega, M., Mezzano, S. & Ortiz, A. Lyso-Gb3 activates Notch1 in human podocytes. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5720–5732 (2015).
 143. Hao, Q., Jiao, S., Shi, Z., Li, C., Meng, X., Zhang, Z., Wang, Y., Song, X., Wang, W., Zhang, R., Zhao, Y., Wong, C. C. & Zhou, Z. A non-canonical role of the p97 complex in RIG-I antiviral signaling. *EMBO J.* **34**, 2903–2920 (2015).
-

144. Choi, J. Y., Shin, M. Y., Suh, S. H. & Park, S. Lyso-globotriaosylceramide downregulates KCa3.1 channel expression to inhibit collagen synthesis in fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 883–888 (2015).
145. Warnock, D. G., Bichet, D. G., Holida, M., Goker-Alpan, O., Nicholls, K., Thomas, M., Eyskens, F., Shankar, S., Adera, M., Sitaraman, S., Khanna, R., Flanagan, J. J., Wustman, B. A., Barth, J., Barlow, C., Valenzano, K. J., Lockhart, D. J., Boudes, P. & Johnson, F. K. Oral migalastat HCl leads to greater systemic exposure and tissue levels of active α -galactosidase A in fabry patients when co-administered with infused agalsidase. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
146. Song, H. Y., Chiang, H. C., Tseng, W. L., Wu, P., Chien, C. S., Leu, H. B., Yang, Y. P., Wang, M. L., Jong, Y. J., Chen, C. H., Yu, W. C. & Chiou, S. H. Using CRISPR/Cas9-mediated GLA gene knockout as an in vitro drug screening model for fabry disease. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 2089–2104 (2016).
147. Andreotti, G., Guarracino, M. R., Cammisà, M., Correrà, A. & Cubellis, M. V. Prediction of the responsiveness to pharmacological chaperones: Lysosomal human alpha-galactosidase, a case of study. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 36–46 (2010).
148. Verbrugge, S., Scheper, R. J., Lems, W. F., de Gruijl, T. D. & Jansen, G. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 17 (2015).
149. Herndon, T. M., Deisseroth, A., Kaminskas, E., Kane, R. C., Koti, K. M., Rothmann, M. D., Habtemariam, B., Bullock, J., Bray, J. D., Hawes, J., Palmby, T. R., Jee, J., Adams, W., Mahayni, H., Brown, J., Dorantes, A., Sridhara, R., Farrell, A. T. & Pazdur, R. U.S. Food and Drug Administration approval: Carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4559–4563 (2013).
150. Shirley, M. Ixazomib: First global approval. *Drugs* **76**, 405–411 (2016).
151. Wang, Z., Fang, Y., Teague, J., Wong, H., Morisseau, C., Hammock, B. D., Rock, D. A. & Wang, Z. In Vitro Metabolism of Oprozomib, an Oral Proteasome Inhibitor: Role of Epoxide Hydrolases and Cytochrome P450s. *Drug Metab. Dispos.* **45**, 712–720 (2017).

7 Anhang

Tabelle A.1: Wirkstoff-Informationen

Bezeichnung	CAS-Nr.	Hersteller	Katalog-Nr.
15d-PGJ2	87893-55-8	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-205018
17-AAG (Tanespimycin)	75747-14-7	Abcam, Cambridge, UK	ab141433
Ambroxol	23828-92-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A9797
Arimoclomol	289893-26-1	Toronto Research Chemicals, Toronto, CA	A771270
Bezafibrat	41859-67-0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B7273
Bortezomib	179324-69-7	USBiological, Swampscott, USA	B2572-02
Celastrol	34157-83-0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C0869
Clasto-Lactacystin- β -lacton	154226-60-5	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	70988
Dantrolen	14663-23-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D9175
DGJ	75172-81-5	Toronto Research Chemicals, Toronto, CA	D236500
Diltiazem	33286-22-5	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D2521
Eeyarestatin I	412960-54-4	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	10012609
Ibuprofen	15687-27-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	I4883
Kifunensin	109944-15-2	Toronto Research Chemicals, Toronto, CA	K450000
Lacidipin	103890-78-4	Key Organics, Camelford, UK	HS-0086
MG132	133407-82-6	Merck, Darmstadt, DE	474790
Pioglitazon	112529-15-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E6910
Pifithrin μ	64984-31-2	Enzo Life Sciences, Lörrach, DE	BML-AP503
Pyr-41	418805-02-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	N2915
Ritonavir	155213-67-5	LKT Laboratories, Saint Paul, USA	R3577
Rosiglitazon	122320-73-4	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA	71740
SAHA	149647-78-9	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	SML0061
Trichostatin A (TSA)	58880-19-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T8552

Tabelle A.2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
4-Methylumbelliferon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M1381
4-Methylumbelliferyl- α -D-Galaktopyranosid	Carbosynth Limited, Compton Berkshire, UK	EM05182
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M3148
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, DE	A512.1
Casy [®] ton	OLS OMNI Life Science, Bremen, DE	5651808
CASYclean	OLS OMNI Life Science, Bremen, DE	5651786
<i>cOmplete</i> Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim, DE	04693159001
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE	1.06580.1000
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E5134
Glycerol, etwa 87 %	Merck, Darmstadt, DE	1.04094
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE	3908.3
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	70166
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4627.2
Natriumazid	Merck, Darmstadt, DE	1.06688.0100
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE	3957.2
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D6750
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	2326.2
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, DE	6771.3
<i>Precision Plus Protein[™] Dual Xtra Prestained</i> Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	1610377
Salzsäure, rauchend, 37%	Merck, Darmstadt, DE	1.00317
Stickstoff, flüssig	Air Liquide Deutschland, Düsseldorf, DE	-
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4855.2
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9127.3
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, DE	3051.3
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE	X863.2

Tabelle A.3: Lösungen für biochemische Analyseverfahren und Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Glycin-NaOH-Puffer, pH 10,5	1 M Natriumhydroxid 1 M Glycin
Phosphat-Citrat-Puffer, pH 4,7	0,06 M Dinatriumhydrogenphosphat 0,03 M Zitronensäure 0,02 % Natriumazid
Substrat für α -Gal A (1,8 mM)	3,11 mg 4-Methylumbelliferyl- α -D-Galaktopyranosid (4-MUG) 5 ml PO ₄ -Citrat-Puffer bei 60 °C gelöst
10 x TBS	200 mM TRIS 1,37 M pH 7,5 (mit NaOH/HCl eingestellt)
1 x TBS	Verdünnung des 10 x TBS 1:10 mit Reinstwasser
1 x TBST	100 ml 10 x TBS + 900 ml Reinstwasser + 1 ml Tween 20
10 x SDS-Elektrophorese-Puffer	250 mM TRIS 2 M Glycin 1% SDS
1 x SDS-Elektrophorese-Puffer	Verdünnung des 10 x Elektrophorese-Puffer 1:10 mit Reinstwasser
RIPA-Puffer	20 mM TRIS 137 mM NaCl 0,1 % SDS 12 mM Natriumdeoxycholat 1 % Triton X-100 10 % Glycerol 2 mM EDTA auf 10 ml RIPA eine <i>cOmplete</i> Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette
5 x Laemmli-Puffer	125 mM TRIS 20 % Glycerol 2 % SDS 5 % β -Mercaptoethanol 10 % Bromphenolblau
Blocklösung	5 % Magermilchpulver in 1 x TBST
Antikörperlösung	3 % Magermilchpulver in 1 x TBST 0,02 % Natriumazid (zur Konservierung für erneute Verwendung der Antikörperlösung)

Tabelle A.4: Antikörper für Western Blot

Primärantikörper				
Antigen	Wirts-Spezies	Isotyp	Hersteller	Katalog-Nr.
α -Galaktosidase A	Maus	IgG, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab169315
GAPDH	Kaninchen	IgG, monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab181602
Sekundärantikörper				
Bezeichnung	Wirts-Spezies	Reaktivität	Hersteller	Katalog-Nr.
IRDye [®] 680LT (polyklonal)	Ziege	Kaninchen- IgG	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA	926-68021
IRDye800 [®] (polyklonal)	Ziege	Maus- IgG	Rockland Immuno- chemicals, Limerick, USA	610-132-121

Tabelle A.5: Kits

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller	Katalog-Nr.
Quick-gDNA [™] MiniPrep	DNA-Extraktion aus Zellen	Zymo Research, Irvine, USA	D3024
<i>Proteasome-Glo[™] Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay</i>	Testung proteasomaler Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität	Promega, Madison, USA	G8660
<i>Proteasome-Glo[™] Trypsin-Like Cell-Based Assay</i>	Testung proteasomaler Trypsin-ähnlicher Aktivität	Promega, Madison, USA	G8760
<i>Proteasome-Glo[™] Caspase-Like Cell-Based Assay</i>	Testung proteasomaler Caspase-ähnlicher Aktivität	Promega, Madison, USA	G8860
FastLane Cell cDNA	cDNA-Präparation	Qiagen, Hilden, DE	215011
FastStart Essential DNA Green Master	SYBR Green-basierte Real-Time-qPCR	Roche Diagnostics, Mannheim, DE	06402712001
GeneChip [®] WT PLUS Reagent	Amplifizieren und Markieren von RNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	902281
Pierce [®] BCA Protein Assay	Quantifizierung der Proteinmenge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	23225
PNGase F	Entfernen von N-Glykosylierungen von Glykoproteinen	New England Biolabs, Ipswich, USA	P0704S
RNeasy Plus Mini	RNA-Extraktion aus Zellen	Qiagen, Hilden, DE	74134

Tabelle A.6: Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Primersequenz (5' nach 3')	Temperatur für Primerhybridisierung
GLA frw	TTCAAAAAGCCCAATTATACAGAAA	55 °C
GLA rev	CTGGTCCAGCAACATCAACA	55 °C
G6PD frw	TGCCCCCGACCGTCTAC	60 °C
G6PD rev	ATGCGGTTCCAGCCTATCTG	60 °C

Tabelle A.7: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Laboport	KNF Neuberger, Freiburg im Breisgau, DE
Dampfsterilisator Varioklav [®] Typ300	HP Medizintechnik, Oberschleißheim, DE
Feinwaage AX224	Sartorius, Göttingen, DE
Feinwaage BL610	Sartorius, Göttingen, DE
Eisbereiter, AF80	Scotsman, Ipswich, UK
Elektrophoresekammer Criterion [™] Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gefrierschrank -20 °C LabStar Libra	NationalLab, Mölln, DE
Gefrierschrank -80 °C ProfiLine ECU 7085-5	NationalLab, Mölln, DE
Geschirrspüler G7883	Miele, Gütersloh, DE
GeneChip [®] Hybridization Oven	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Scanner 3000/ 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hitzesterilisator T6	Heraeus, Hanau, DE
Inkubator Typ 36150180003100	Binder, Tuttlingen, DE
Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen, DE
Kolbenhubpipetten 0,1 - 2,5 µl, variabel	Eppendorf, Hamburg, DE
Kolbenhubpipetten 0,5 - 10 µl, variabel	Eppendorf, Hamburg, DE
Kolbenhubpipetten 10 - 100 µl, variabel	Eppendorf, Hamburg, DE
Kolbenhubpipetten 100 - 1000 µl, variabel	Eppendorf, Hamburg, DE
Kühlschrank Comfort	Liebherr, Bulle, CH
LightCycler [®] Nano	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies, Bad Wildbad, DE
Magnetrührer mit integrierter Heizplatte MSH-20A	iDL, Nidderau, DE
Magnetrührer Mini MR standard	IKA, Staufen, DE
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokio, JP
Mikroskop-Kamera Digital Sight DS-2MV	Nikon, Tokio, JP
Multipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Odyssey 9120	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Pipettierhilfe Accurpette	VWR International, Radnor, USA
Pipettierhilfe Pipetus [®]	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE

Plattenleser GENios	Tecan Group, Männedorf, CH
Powerpac universal	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reinstwassersystem LaboStar Di2	Siemens, Berlin, DE
Schüttler Rocky® 3D	Labortechnik Fröbel, Lindau, DE
Schüttler Titramax 100	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Schüttler WS5	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Sicherheitswerkbank aminAir® HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Sicherheitswerkbank Antares 48	Steril S.p.a., Mailand, IT
Stickstofftank RS Series	Taylor Wharton, Mildstedt, DE
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Termoschüttler PST-60HL-4	Lab4you, Berlin, DE
Tischzentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Trockenschrank ED115	Binder, Tuttlingen, DE
Vortex Genie 1	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad AL12	Lauda, Lauda-Königshofen, DE
Wasserbad WB10	Memmert, Schwabach, DE
Zentrifuge 3K10	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, DE
Zentrifuge Microfuge® 16	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge Z233 MK2	Hermle Labortechnik, Wehingen, DE
Zentrifuge Z383K	Hermle Labortechnik, Wehingen, DE
Zellzähler Casy® Model TT	Roche Innovatis, Reutlingen, DE

Tabelle A.8: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Aluminiumfolie, 23 µm	Carl Roth, Karlsruhe, DE	0954.1
Casy® Cups	OLS OMNI Life Science, Bremen, DE	5651794
Combitips® Plus 1 ml	Eppendorf, Hamburg, DE	0030 069.234
Combitips® Plus 10 ml	Eppendorf, Hamburg, DE	0030 069.269
Criterion™ TGX Stain-Free™ Protein Gel, 4–15%, 18 well, 30 µl	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	5678084
Einfriergefäß CryoPure 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE	72.380.007
Gefrierbehälter Nalgene® Cryo 1°C “Mr. Frosty”	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	5100-0001
<i>GeneChip® Human Transcriptome Arrays 2.0</i>	Affymetrix, Santa Clara, USA	902309
Glaspasteurpipetten	Fisher Scientific, Loughborough, UK	11566963
<i>LightCycler® 8-Tube Strips (clear)</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, DE	06327672001
Magnetstäbchen-Sortiment	Carl Roth, Karlsruhe, DE	X171.1

ANHANG

Multi®-Sicherheits-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Carl Roth, Karlsruhe, DE	7080.1
Pipettenspitzen 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE	70.1130
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE	70.760.002
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE	70.762
Pipettenspitzen mit Filter 10 µl	nerbe plus, Winsen/Luhe, DE	07-613-8300
Pipettenspitzen mit Filter, SafeSeal Tips Premium, 100 µl	Biozym Scientific, Wien, AUT	692096
Pipettenspitzen mit Filter, SafeSeal Tips Premium, 200 µl	Biozym Scientific, Wien, AUT	692069
Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl	Biozym Scientific, Wien, AUT	692078
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE	72.706
Reaktionsgefäße 1,5 ml, steril, einzeln verpackt	Eppendorf, Hamburg, DE	0030121589
Reaktionsgefäße 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE	72.695.500
Rundbodenröhrchen Polystyrol (5ml) BD Falcon™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	352052
Serologische Pipetten 5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	606180
Serologische Pipetten 10 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	607180
Serologische Pipetten 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	760180
Spritzenfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt, Nümbrecht, DE	83.1826.001
Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA	1704159
<i>Whatman® gel blotting papers, Grade GB005</i>	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK	10426994
Zellkulturflaschen T25	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	690175
Zellkulturflaschen T75	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	658175
Zellkulturflaschen T175	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	661175
Zellkulturplatten 4-well Nunc	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	176740
Zellkulturplatten, 6-Well	Sarstedt, Nümbrecht, DE	83.1839
Zellkulturplatten, 24-Well	Sarstedt, Nümbrecht, DE	83.1836
Zellkulturplatten, 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	655 185
Zellkulturschalen, 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE	83.3902
Zellschaber	Biochrom, Berlin, DE	P99003
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE	62.554.502
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE	62.547.254

Tabelle A.9: Software

Programm	Hersteller
Bioconductor, Version 3.2	Bioconductor project
Expression Console Software, Version 1.4.1.46	Affymetrix, Santa Clara, USA
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, San Diego, USA
LightCycler® Nano SW 1.1	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Magellan 6, Version 6.6	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NIS-Elements F 2.20	Nikon, Tokio, JP
Odyssey® Infrared Imaging System, Version 1.2.15	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
R, Version 3.2.3	Verein "The R Foundation for Statistical Computing"

Tabelle A.10: siRNA-Sequenzen für die Validierung potenzieller Zielgene

Gen-Symbol	siRNA-ID	Sense siRNA-Sequenz	Antisense siRNA-Sequenz
ADRM1	s21767	GCCGGAAAGUCAACGAGUAAtt	UACUCGUUGACUUUCCGGCaa
ADRM1	s225466	CCGCGGAUGAGAUCCAGAAAtt	UUCUGGAUCUCAUCCGCGGtc
ADRM1	s225467	GGGUCCAAGCGGCUUUUCUtt	AGAAAAGCCGCUUGGACCCtg
AHSA1	s20802	GACAGGUACUUCUAAGUCAAtt	UGACUUAGAAGUACCUGUCca
AHSA1	s20803	CGGAUAAGCUGAAAACACUtt	AGUGUUUUCAGCUUAUCCGtg
AHSA1	s20804	CCAUGCUCUGCAACAUUAAtt	UAAUGUUGCAGGAGCAUGGgt
CCL2	s12565	CAGCAGCAAGUGUCCCAAAtt	UUUGGGACACUUGCUGCUGgt
CCL2	s12566	CAAGAAUCAUUAUACAAAAtt	UUUGUAUUAUGAUUCUUGca
CCL2	s12567	UGUUAUAACUUCACCAAUAtt	UAUUGGUGAAGUUAUAACAgc
CREB3L1	s40546	UCCUCAAAAGUGACACCGGAAtt	UCCGGUGUCACUUUGAGGAac
CREB3L1	s40547	GGUGGAGACAUUACAUCUtt	AGAUGUAAAUGUCUCCACctt
CREB3L1	s40548	UCCAGACUCUGGUCACCAAAtt	UUGGUGACCAGAGUCUGGAggt
DNAJA1	s6962	CCAUCCUGAUAGAACCCTAAtt	UGGGUUCUUAUCAGGAUGGta
DNAJA1	s6963	GAAGGAAGAUAGUUCGAGAtt	UCUCGAACUAUCUCCUUCcg
DNAJA1	s6964	GGAAUUAUAUGACAAAGGAAtt	UCCUUUGUCAUAUAAUUCct
DNAJB1	s7008	CAUUCGAAACGAAGACAAAAtt	UUUGUCUUCGUUUCGAAUGct
DNAJB1	s7009	GCUGAUAUUCGUCUUUGUUUtt	AAACAAAGACGAUAUCAGCtg
DNAJB1	s223882	AAAUCCCUUUGACACCUUUtt	AAAGGUGUCAAAAGGGAUUUct
FAM129A	s42029	CGUGCGCACUGAAGUAGAAAtt	UUCUACUUCAGUGCGCACGtg
FAM129A	s42030	CCAUAUUGAUUCACGUUGAtt	UCAACGUGAAUCAUAUUGGta
FAM129A	s42031	GGAACCUUGUUAUACUAAAAtt	UUUAGUAUAACAAGGUUCCat
GLA	s5790	GAUGAUUCCUGGAAAAGUAAtt	UACUUUCCAGGAAUCAUCaa
GLA	s5791	GCAGAUGGUUAUAAGCACAtt	UGUGCUUAUAACCAUCUGCca
GLA	s5792	GAGUAGAUCUGCUAAAAUUtt	AAUUUUAGCAGAUCUACUCcc
HSP90AA1	s6993	CCAAGGACCAGGUAGCUAAAtt	UUAGCUACCUGGUCCUUGGtc

ANHANG

HSP90AA1	s6994	CUAUGGGUCGUGGAACAAAtt	UUUGUCCACGACCCAUAAGgt
HSP90AA1	s6995	CCGACGAUAAUACUAAUGAtt	UCAUUAGUAAUAUCGUCGGga
HSP90AB1	s6999	GGAUGACAGCGGUAAGGAUtt	AUCCUUACCGCUGUCAUCCtc
HSP90AB1	s7000	CGACAAGAAUGAUAAAGGCAtt	UGCCUUAUCAUUCUUGUCGgc
HSP90AB1	s7001	GUGAUGAGUUGAUACCAGAtt	UCUGGUAUCAACUCAUCACag
HSPA1A	s6965	GACUUUGCAUUUCCUAGUAAtt	UACUAGGAAAUGCAAAGUCtt
HSPA1A	s6966	CGGUUUCUACAUGCAGAGAtt	UCUCUGCAUGUAGAAACCGga
HSPA1A	s194536	AAUUUAUACUGCCAUCUUAAtt	UAAGAUGGCAGUAUAAAUUca
HSPA1B	s6967	AGUUGUAACCUGAUGGUAAtt	UUACCAUCAGGUACAACUta
HSPA1B	s6968	CGAUUAUGUUCAUAGAAUtt	AAUUCUAAUGAACAUUUCGgt
HSPA1B	s6969	GGGUGUUUCGUUCCCUUUAAtt	UAAAGGGAACGAAACACCCtt
HSPB6	s43029	CACCCAACACCAAACUGUAAtt	UACAGUUUGGUGUUGGGUGtt
HSPB6	s43030	ACACUGCCUUGAUACAUAAtt	UAUGUUAUCAAGGCAGUGUcc
HSPB6	s43031	CGGUGCUGCUAGACGUGAAAtt	UUCACGUCUAGCAGCACCGgaa
HSPH1	s21240	GGAGUGUCUGAAUCAGAGAtt	UCUCUGAUUCAGACACUCCat
HSPH1	s21241	GCCGCUUUGUAGUUCAGAAAtt	UUCUGAACUACAAAGCGGCct
HSPH1	s21242	GGAAAACUUGAGUUACGAUtt	AUCGUAAUCUAAAGUUUCCtt
JKAMP	s28270	GGAAGACCCUAUUAUUUAAtt	UUAAAUAUAGGGUCUCCca
JKAMP	s28271	CCCACUAUAUACCAUUGUAAtt	UACAAUGGUUAUUAUGUGGGta
JKAMP	s28272	CCAAGUCCAGAUUACGUUAAtt	UAACGUAAUCUGGACUUGGgt
LMAN2L	s37635	GGAUGGGUCCAGGAUGUUAtt	UAACAUCUGGACCCAUCcgc
LMAN2L	s37636	GUAUCAUACUCUACAACAAtt	UUGUUGUAGAGUAUGAUACca
LMAN2L	s37637	GAGUAUUUGUAGACACCUAtt	UAGGUGUCUACAAAUACUcc
NGLY1	s31464	GGUCUAGAGAUAGAUCAUtt	AAUGAUCUAUCUCUAGACCta
NGLY1	s31465	CAUUACUUCGAGACACUAUtt	AUAGUGUCUCGAAGUAAUGct
NGLY1	s31466	GAACUUCUCCAGAGGAUAAAtt	UUAUCCUCUGGAGAAGUUCtt
NPLOC4	s31209	GGACGGGAAGAUUUACAGAtt	UCUGUAAAUCUCCCCGUCCtg
NPLOC4	s31210	GCUUCUCGGUUUACAUCAAtt	UUGAUGUAAACCGAGAAGCca
NPLOC4	s31211	GGCGAUUUGUUGUUCUGUtt	ACAGGAACAACAAAUCGCCat
NSFL1C	s31817	GGAUAAUGGAGAACUCAGAtt	UCUGAGUUCUCCAUAUCCag
NSFL1C	s31818	GGAGAGACCAGUAAACCGAtt	UCGGUUUACUGGUCUCUCCag
NSFL1C	s31819	UCAUGACUACUUUCCGAAAtt	UUCGGGAAAGUAGUCAUGagg
PDIA5	s21558	GGACGGUUCUUGUUCAGUtt	ACUGGAACAAGAACCGUCCtt
PDIA5	s21559	GGACAAAAGGUUGAAUUAAtt	UAAUUCAACCUUUUUGUCCtt
PDIA5	s21560	GGAAGUUCGCAGAAAAGUAAtt	UACUUUUCUGCGAACUUCc
SiSel_NC1	s813		
STIP1	s21582	CGCCUUAUCCUGGAACAGAtt	UCUGUCCAGGAUAAGGCGca
STIP1	s21583	GCCUUGAAGCAUACGACAAtt	UGUCGUAAUGCUUCAAGGCtg
STIP1	s21584	CGAGAAGACUAUCGACAGAtt	UCUGUCGAUAGUCUUCUCGgt
UBE2C	s21803	GUUGAGCCCUUGUAUAUUAtt	UAAUAUACAAGGGCUC AACcg
UBE2C	s21804	UCCUUUUUGUGAUUUCUGUtt	ACAGAAAUCACAAAAGGAc
UBE2C	s21805	GUGUCGUCUUUUUAAUUUtt	AAAUAUAAAAGACGACACaa
UBE2T	s26459	GAAGCAUGCAAGACAGAAAtt	UUUCUGUCUUGCAUGCUCtc
UBE2T	s26460	ACAUAUCCUCAGAAUUUAAtt	UUAAAUUCUGAGGAUAUGUca

ANHANG

UBE2T	s26461	AGGUGUUUUUAAGCUAGAAtt	UUCUAGCUUAAAAACACCUtt
UBXN4	s23238	CCAGUUUCUUUAUUGGAGAtt	UCUCCAAUAAAGAAACUGGat
UBXN4	s23239	GGACCUUGUUGGGAACAGUtt	ACUGUUCCCAACAAGGUCCaa
UBXN4	s23240	GGUAAUUUUUCGUUAGCAAtt	UUGCUAACGAAAAAUUACCgt
UFD1L	s14635	CAAUCAAGCCUGGAGAUUtt	AUAUCUCCAGGCUUGAUUGgg
UFD1L	s14637	CCCAUGCUGUCAAACUGAtt	UCAGUUUGAACAGCAUGGGat
UFD1L	s228150	ACAUGAACGUGGACUUUGAtt	UCAAAGUCCACGUUCAUGUca
USP14	s17358	GCUCAGCUGUUUGCGUUGAtt	UCAACGCAAACAGCUGAGCct
USP14	s17359	GCAUAUCGCUUACGUUCUAtt	UAGAACGUAAGCGAUUUGCca
USP14	s17360	CUCUUAUGUUGGAUAUGUAtt	UACAUAUCCAACAUAAGAGga
VCP	s14765	GAAUAGAGUUGUUCGGAAUtt	AUUCCGAACAACUCUAUUCat
VCP	s14766	GAACCGUCCAAUCGGUUAAtt	UAACCGAUUGGGACGGUUCtt
VCP	s14767	GGCUCGUGGAGGUAACAUtt	AAUGUUACCUCCACGAGCCtt
WFS1	s14856	GUCUACAACUCCACACUGAtt	UCAGUGUGGAGUUGUAGACct
WFS1	s14857	CCAUCGACUUCUUCGCCUtt	AAGGCGAAGAAGUCGAUGGtg
WFS1	s14858	GUCAUGUACUGGAAGCUCAtt	UGAGCUUCCAGUACAUGACca

SiSel_NC1... *Silencer*[®] *Select Negative Control 1*

Tabelle A.11. Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Kombinationsbehandlung aus DGJ und BTZ.

Behandlung	Relative α -Gal A-Aktivität	Standard- abweichung
unbehandelt (DMSO)	1.00	0.00
1 μ M DGJ	1.38	0.18
10 μ M DGJ	1.70	0.16
20 μ M DGJ	1.66	0.45
50 μ M DGJ	1.93	0.11
100 μ M DGJ	1.92	0.17
200 μ M DGJ	2.23	0.13
1 nM BTZ	1.04	0.24
2,5 nM BTZ	1.22	0.14
5 nM BTZ	1.80	0.15
7,5 nM BTZ	1.31	0.12
10 nM BTZ	1.03	0.09
1 μ M DGJ + 1 nM BTZ	1.22	0.20
1 μ M DGJ + 2,5 nM BTZ	1.44	0.37
1 μ M DGJ + 5 nM BTZ	3.28	1.02
1 μ M DGJ + 7,5 nM BTZ	3.23	0.17
1 μ M DGJ + 10 nM BTZ	2.67	0.40
10 μ M DGJ + 1 nM BTZ	1.47	0.25
10 μ M DGJ + 2,5 nM BTZ	2.40	0.19
10 μ M DGJ + 5 nM BTZ	5.44	0.74
10 μ M DGJ + 7,5 nM BTZ	6.05	0.68
10 μ M DGJ + 10 nM BTZ	6.00	1.41
20 μ M DGJ + 1 nM BTZ	1.72	0.33
20 μ M DGJ + 2,5 nM BTZ	2.70	0.43
20 μ M DGJ + 5 nM BTZ	6.07	0.18
20 μ M DGJ + 7,5 nM BTZ	7.02	1.16
20 μ M DGJ + 10 nM BTZ	7.36	1.03
50 μ M DGJ + 1 nM BTZ	1.89	0.12
50 μ M DGJ + 2,5 nM BTZ	3.51	0.58
50 μ M DGJ + 5 nM BTZ	7.73	0.81
50 μ M DGJ + 7,5 nM BTZ	8.51	1.05
50 μ M DGJ + 10 nM BTZ	7.68	0.97
100 μ M DGJ + 1 nM BTZ	2.40	0.05
100 μ M DGJ + 2,5 nM BTZ	3.80	0.40
100 μ M DGJ + 5 nM BTZ	8.57	1.50
100 μ M DGJ + 7,5 nM BTZ	7.77	1.44
100 μ M DGJ + 10 nM BTZ	8.07	0.92
200 μ M DGJ + 1 nM BTZ	2.41	0.17
200 μ M DGJ + 2,5 nM BTZ	4.07	0.49
200 μ M DGJ + 5 nM BTZ	9.26	1.03
200 μ M DGJ + 7,5 nM BTZ	8.47	0.54
200 μ M DGJ + 10 nM BTZ	7.88	0.71

Tabelle A.12: Proteostasekomponenten

Proteinname (UniProt)	Gen-Symbol (HGNC)	HGNC-ID
<i>Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial</i>	ACADVL	HGNC:92
<i>Alpha-adducin</i>	ADD1	HGNC:243
<i>Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1</i>	ADRM1	HGNC:15759
<i>Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1</i>	AHSA1	HGNC:1189
<i>Alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2</i>	ALG2	HGNC:23159
<i>E3 ubiquitin-protein ligase AMFR</i>	AMFR	HGNC:463
<i>Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 4B</i>	ANKS4B	HGNC:26795
<i>ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1</i>	ARFGAP1	HGNC:15852
<i>ATPase ASNA1</i>	ASNA1	HGNC:752
<i>Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]</i>	ASNS	HGNC:753
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3</i>	ATF3	HGNC:785
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4</i>	ATF4	HGNC:786
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha</i>	ATF6	HGNC:791
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 beta</i>	ATF6B	HGNC:2349
<i>V-type proton ATPase subunit d 1</i>	ATP6V0D1	HGNC:13724
<i>Ataxin-3</i>	ATXN3	HGNC:7106
<i>Ancient ubiquitous protein 1</i>	AUP1	HGNC:891
<i>Large proline-rich protein BAG6</i>	BAG6	HGNC:13919
<i>B-cell receptor-associated protein 31</i>	BCAP31	HGNC:16695
<i>Class A basic helix-loop-helix protein 15</i>	BHLHA15	HGNC:22265
<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>	BIRC6	HGNC:13516
<i>F-box/WD repeat-containing protein 1A</i>	BTRC	HGNC:1144
<i>Calreticulin</i>	CALR	HGNC:1455
<i>Calnexin</i>	CANX	HGNC:1473
<i>C-C motif chemokine 2</i>	CCL2	HGNC:10618
<i>G1/S-specific cyclin-D1</i>	CCND1	HGNC:1582
<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	CCT4	HGNC:1617
<i>T-complex protein 1 subunit eta</i>	CCT7	HGNC:1622
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 R1</i>	CDC34	HGNC:1734
<i>Hsp90 co-chaperone Cdc37</i>	CDC37	HGNC:1735
<i>Probable serine carboxypeptidase CPVL</i>	CPVL	HGNC:14399
<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3</i>	CREB3	HGNC:2347
<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 1</i>	CREB3L1	HGNC:18856
<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 2</i>	CREB3L2	HGNC:23720

<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3</i>	CREB3L3	HGNC:18855
<i>Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 4</i>	CREB3L4	HGNC:18854
<i>CREB3 regulatory factor</i>	CREBRF	HGNC:24050
<i>Alpha-crystallin B chain</i>	CRYAB	HGNC:2389
<i>Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 2</i>	CTDSP2	HGNC:17077
<i>Cullin-7</i>	CUL7	HGNC:21024
<i>Interleukin-8</i>	CXCL8	HGNC:6025
<i>CXXC-type zinc finger protein 1</i>	CXXC1	HGNC:24343
<i>Disabled homolog 2-interacting protein</i>	DAB2IP	HGNC:17294
<i>Dynactin subunit 1</i>	DCTN1	HGNC:2711
<i>DNA damage-inducible transcript 3 protein</i>	DDIT3	HGNC:2726
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyl-transferase 48 kDa subunit</i>	DDOST	HGNC:2728
<i>DDRGK domain-containing protein 1</i>	DDRGK1	HGNC:16110
<i>ATP-dependent DNA helicase DDX11</i>	DDX11	HGNC:2736
<i>Derlin-1</i>	DERL1	HGNC:28454
<i>Derlin-2</i>	DERL2	HGNC:17943
<i>Derlin-3</i>	DERL3	HGNC:14236
<i>DnaJ homolog subfamily A member 1</i>	DNAJA1	HGNC:5229
<i>DnaJ homolog subfamily B member 1</i>	DNAJB1	HGNC:5270
<i>DnaJ homolog subfamily B member 11</i>	DNAJB11	HGNC:14889
<i>DnaJ homolog subfamily B member 12</i>	DNAJB12	HGNC:14891
<i>DnaJ homolog subfamily B member 2</i>	DNAJB2	HGNC:5228
<i>DnaJ homolog subfamily B member 9</i>	DNAJB9	HGNC:6968
<i>DnaJ homolog subfamily C member 1</i>	DNAJC1	HGNC:20090
<i>DnaJ homolog subfamily C member 10</i>	DNAJC10	HGNC:24637
<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>	DNAJC3	HGNC:9439
<i>DnaJ homolog subfamily C member 5</i>	DNAJC5	HGNC:16235
<i>ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1</i>	EDEM1	HGNC:18967
<i>ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 2</i>	EDEM2	HGNC:15877
<i>ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 3</i>	EDEM3	HGNC:16787
<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A</i>	EIF2A	HGNC:3254
<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1</i>	EIF2AK1	HGNC:24921
<i>Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase</i>	EIF2AK2	HGNC:9437
<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3</i>	EIF2AK3	HGNC:3255
<i>eIF-2-alpha kinase GCN2</i>	EIF2AK4	HGNC:19687

<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit alpha</i>	EIF2B1	HGNC:3257
<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit beta</i>	EIF2B2	HGNC:3258
<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit delta</i>	EIF2B4	HGNC:3260
<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon</i>	EIF2B5	HGNC:3261
<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1</i>	EIF2S1	HGNC:3265
<i>ER membrane protein complex subunit 1</i>	EMC1	HGNC:28957
<i>ER membrane protein complex subunit 10</i>	EMC10	HGNC:27609
<i>ER membrane protein complex subunit 2</i>	EMC2	HGNC:28963
<i>ER membrane protein complex subunit 3</i>	EMC3	HGNC:23999
<i>ER membrane protein complex subunit 4</i>	EMC4	HGNC:28032
<i>ER membrane protein complex subunit 6</i>	EMC6	HGNC:28430
<i>ER membrane protein complex subunit 7</i>	EMC7	HGNC:24301
<i>ER membrane protein complex subunit 8</i>	EMC8	HGNC:7864
<i>ER membrane protein complex subunit 9</i>	EMC9	HGNC:20273
<i>Endoplasmic reticulum lectin 1</i>	ERLEC1	HGNC:25222
<i>Erlin-1</i>	ERLIN1	HGNC:16947
<i>Erlin-2</i>	ERLIN2	HGNC:1356
<i>Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1</i>	ERN1	HGNC:3449
<i>Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE2</i>	ERN2	HGNC:16942
<i>ERO1-like protein alpha</i>	ERO1L	HGNC:13280
<i>ERO1-like protein beta</i>	ERO1LB	HGNC:14355
<i>Endoplasmic reticulum resident protein 27</i>	ERP27	HGNC:26495
<i>Endoplasmic reticulum resident protein 29</i>	ERP29	HGNC:13799
<i>Endoplasmic reticulum resident protein 44</i>	ERP44	HGNC:18311
<i>Extended synaptotagmin-1</i>	ESYT1	HGNC:29534
<i>Exostosin-like 3</i>	EXTL3	HGNC:3518
<i>FAS-associated factor 2</i>	FAF2	HGNC:24666
<i>Protein Niban</i>	FAM129A	HGNC:16784
<i>Protein FAM8A1</i>	FAM8A1	HGNC:16372
<i>F-box only protein 2</i>	FBXO2	HGNC:13581
<i>F-box only protein 6</i>	FBXO6	HGNC:13585
<i>F-box/WD repeat-containing protein 11</i>	FBXW11	HGNC:13607
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10</i>	FKBP10	HGNC:18169
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP14</i>	FKBP14	HGNC:18625
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2</i>	FKBP2	HGNC:3718
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5</i>	FKBP5	HGNC:3721
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP7</i>	FKBP7	HGNC:3723
<i>FAD-dependent oxidoreductase domain-containing protein 2</i>	FOXRED2	HGNC:26264
<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>	GANAB	HGNC:4138
<i>Golgi to ER traffic protein 4 homolog</i>	GET4	HGNC:21690

<i>Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1</i>	GFPT1	HGNC:4241
<i>Receptor of activated protein C kinase 1 (RACK1)</i>	GNB2L1	HGNC:4399
<i>Golgin subfamily B member 1</i>	GOLGB1	HGNC:4429
<i>Golgi SNAP receptor complex member 2</i>	GOSR2	HGNC:4431
<i>Glycogen synthase kinase-3 alpha</i>	GSK3A	HGNC:4616
<i>E3 ubiquitin-protein ligase HACE1</i>	HACE1	HGNC:21033
<i>Hepatoma-derived growth factor</i>	HDGF	HGNC:4856
<i>Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein</i>	HERPUD1	HGNC:13744
<i>Minor histocompatibility antigen H13</i>	HM13	HGNC:16435
<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	HSP90AA1	HGNC:5253
<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	HSP90AB1	HGNC:5258
<i>Endoplasmin</i>	HSP90B1	HGNC:12028
<i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>	HSPA1A	HGNC:5232
<i>Heat shock 70 kDa protein 1B</i>	HSPA1B	HGNC:5233
<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	HSPA5	HGNC:5238
<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	HSPA8	HGNC:5241
<i>Heat shock protein beta-6</i>	HSPB6	HGNC:26511
<i>Hsp70-binding protein 1</i>	HSPBP1	HGNC:24989
<i>Heat shock protein 105 kDa</i>	HSPH1	HGNC:16969
<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>	HYOU1	HGNC:16931
<i>Interferon gamma</i>	IFNG	HGNC:5438
<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>	IGFBP1	HGNC:5469
<i>Insulin-induced gene 1 protein</i>	INSIG1	HGNC:6083
<i>Insulin-induced gene 2 protein</i>	INSIG2	HGNC:20452
<i>E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog</i>	ITCH	HGNC:13890
<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1</i>	ITPR1	HGNC:6180
<i>JNK1/MAPK8-associated membrane protein</i>	JKAMP	HGNC:20184
<i>ER lumen protein-retaining receptor 3</i>	KDELR3	HGNC:6306
<i>Kelch domain-containing protein 3</i>	KLHDC3	HGNC:20704
<i>Protein ERGIC-53</i>	LMAN1	HGNC:6631
<i>Vesicular integral-membrane protein VIP36</i>	LMAN2	HGNC:16986
<i>VIP36-like protein</i>	LMAN2L	HGNC:19263
<i>Prelamin-A/C</i>	LMNA	HGNC:6636
<i>Lon protease homolog 2, peroxisomal</i>	LONP2	HGNC:20598
<i>Endoplasmic reticulum mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase</i>	MAN1B1	HGNC:6823
<i>Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>	MANF	HGNC:15461
<i>E3 ubiquitin-protein ligase MARCH6</i>	MARCH6	HGNC:30550
<i>Membrane-bound transcription factor site-1 protease</i>	MBTPS1	HGNC:15456
<i>Membrane-bound transcription factor site-2 protease</i>	MBTPS2	HGNC:15455

<i>Malectin</i>	MLEC	HGNC:28973
<i>Membrane magnesium transporter 1</i>	MMGT1	HGNC:28100
<i>Mannosyl-oligosaccharide glucosidase</i>	MOGS	HGNC:24862
<i>Myeloid-derived growth factor</i>	MYDGF	HGNC:16948
<i>Marginal zone B- and B1-cell-specific protein</i>	MZB1	HGNC:30125
<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	NFE2L2	HGNC:7782
<i>Peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase</i>	NGLY1	HGNC:17646
<i>Nuclear protein localization protein 4 homolog</i>	NPLOC4	HGNC:18261
<i>NSFL1 cofactor p47</i>	NSFL1C	HGNC:15912
<i>Protein OS-9</i>	OS9	HGNC:16994
<i>Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC</i>	OSTC	HGNC:24448
<i>Ubiquitin thioesterase OTUB1</i>	OTUB1	HGNC:23077
<i>Protein disulfide-isomerase</i>	P4HB	HGNC:8548
<i>E3 ubiquitin-protein ligase parkin (PRKN)</i>	PARK2	HGNC:8607
<i>Mono [ADP-ribose] polymerase PARP16</i>	PARP16	HGNC:26040
<i>Protein disulfide-isomerase A2</i>	PDIA2	HGNC:14180
<i>Protein disulfide-isomerase A3</i>	PDIA3	HGNC:4606
<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	PDIA4	HGNC:30167
<i>Protein disulfide-isomerase A5</i>	PDIA5	HGNC:24811
<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	PDIA6	HGNC:30168
<i>Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis</i>	PDILT	HGNC:27338
<i>Prefoldin subunit 2</i>	PFDN2	HGNC:8867
<i>Cytosolic phospholipase A2 beta</i>	PLA2G4B	HGNC:9036
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	PPIA	HGNC:9253
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B</i>	PPIB	HGNC:9255
<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A</i>	PPP1R15A	HGNC:14375
<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory subunit beta isoform</i>	PPP2R5B	HGNC:9310
<i>Prolactin regulatory element-binding protein</i>	PREB	HGNC:9356
<i>Glucosidase 2 subunit beta</i>	PRKCSH	HGNC:9411
<i>Proteasome subunit alpha type-1</i>	PSMA1	HGNC:9530
<i>Proteasome subunit alpha type-2</i>	PSMA2	HGNC:9531
<i>Proteasome subunit alpha type-3</i>	PSMA3	HGNC:9532
<i>Proteasome subunit alpha type-4</i>	PSMA4	HGNC:9533
<i>Proteasome subunit alpha type-5</i>	PSMA5	HGNC:9534
<i>Proteasome subunit alpha type-6</i>	PSMA6	HGNC:9535
<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	PSMA7	HGNC:9536
<i>Proteasome subunit alpha type-7-like</i>	PSMA8	HGNC:22985
<i>Proteasome subunit beta type-1</i>	PSMB1	HGNC:9537
<i>Proteasome subunit beta type-2</i>	PSMB2	HGNC:9539

<i>Proteasome subunit beta type-3</i>	PSMB3	HGNC:9540
<i>Proteasome subunit beta type-4</i>	PSMB4	HGNC:9541
<i>Proteasome subunit beta type-5</i>	PSMB5	HGNC:9542
<i>Proteasome subunit beta type-6</i>	PSMB6	HGNC:9543
<i>Proteasome subunit beta type-7</i>	PSMB7	HGNC:9544
<i>Proteasome subunit beta type-8</i>	PSMB8	HGNC:9545
<i>Proteasome subunit beta type-9</i>	PSMB9	HGNC:9546
<i>Proteasome subunit beta type-10</i>	PSMB10	HGNC:9538
<i>26S proteasome regulatory subunit 4</i>	PSMC1	HGNC:9547
<i>26S proteasome regulatory subunit 7</i>	PSMC2	HGNC:9548
<i>26S proteasome regulatory subunit 6A</i>	PSMC3	HGNC:9549
<i>26S proteasome regulatory subunit 6B</i>	PSMC4	HGNC:9551
<i>26S proteasome regulatory subunit 8</i>	PSMC5	HGNC:9552
<i>26S proteasome regulatory subunit 10B</i>	PSMC6	HGNC:9553
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1</i>	PSMD1	HGNC:9554
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2</i>	PSMD2	HGNC:9559
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3</i>	PSMD3	HGNC:9560
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4</i>	PSMD4	HGNC:9561
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5</i>	PSMD5	HGNC:9563
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6</i>	PSMD6	HGNC:9564
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7</i>	PSMD7	HGNC:9565
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8</i>	PSMD8	HGNC:9566
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9</i>	PSMD9	HGNC:9567
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10</i>	PSMD10	HGNC:9555
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11</i>	PSMD11	HGNC:9556
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12</i>	PSMD12	HGNC:9557
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13</i>	PSMD13	HGNC:9558
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14</i>	PSMD14	HGNC:16889
<i>Proteasome activator complex subunit 1</i>	PSME1	HGNC:9568
<i>Proteasome activator complex subunit 2</i>	PSME2	HGNC:9569
<i>Proteasome activator complex subunit 3</i>	PSME3	HGNC:9570
<i>Proteasome activator complex subunit 4</i>	PSME4	HGNC:20635
<i>Proteasome inhibitor PI31 subunit</i>	PSMF1	HGNC:9571
<i>UV excision repair protein RAD23 homolog A</i>	RAD23A	HGNC:9812
<i>UV excision repair protein RAD23 homolog B</i>	RAD23B	HGNC:9813
<i>Rhomboid-related protein 3</i>	RHBDL3	HGNC:16502
<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF103</i>	RNF103	HGNC:12859
<i>RING finger protein 121</i>	RNF121	HGNC:21070
<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF128</i>	RNF128	HGNC:21153
<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF138</i>	RNF138	HGNC:17765
<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF139</i>	RNF139	HGNC:17023

<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF170</i>	RNF170	HGNC:25358
<i>RING finger protein 175</i>	RNF175	HGNC:27735
<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF185</i>	RNF185	HGNC:26783
<i>E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1</i>	RNF41	HGNC:18401
<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF5</i>	RNF5	HGNC:10068
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyl-transferase subunit 1</i>	RPN1	HGNC:10381
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyl-transferase subunit 2</i>	RPN2	HGNC:10382
<i>Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a</i>	RPS27A	HGNC:10417
<i>Secretory carrier-associated membrane protein 5</i>	SCAMP5	HGNC:30386
<i>Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein</i>	SCAP	HGNC:30634
<i>Stromal cell-derived factor 2-like protein 1</i>	SDF2L1	HGNC:10676
<i>Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11C</i>	SEC11C	HGNC:23400
<i>Protein SEC13 homolog</i>	SEC13	HGNC:10697
<i>Protein transport protein Sec23A</i>	SEC23A	HGNC:10701
<i>Protein transport protein Sec23B</i>	SEC23B	HGNC:10702
<i>Protein transport protein Sec24A</i>	SEC24A	HGNC:10703
<i>Protein transport protein Sec24B</i>	SEC24B	HGNC:10704
<i>Protein transport protein Sec24C</i>	SEC24C	HGNC:10705
<i>Protein transport protein Sec24D</i>	SEC24D	HGNC:10706
<i>Protein transport protein Sec31A</i>	SEC31A	HGNC:17052
<i>Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 1</i>	SEC61A1	HGNC:18276
<i>Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2</i>	SEC61A2	HGNC:17702
<i>Protein transport protein Sec61 subunit beta</i>	SEC61B	HGNC:16993
<i>Protein transport protein Sec61 subunit gamma</i>	SEC61G	HGNC:18277
<i>Translocation protein SEC62</i>	SEC62	HGNC:11846
<i>Translocation protein SEC63 homolog</i>	SEC63	HGNC:21082
<i>Protein sel-1 homolog 1</i>	SEL1L	HGNC:10717
<i>Protein sel-1 homolog 2</i>	SEL1L2	HGNC:15897
<i>Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1</i>	SERP1	HGNC:10759
<i>Serpin H1</i>	SERPINH1	HGNC:1546
<i>Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha</i>	SGTA	HGNC:10819
<i>SHC-transforming protein 1</i>	SHC1	HGNC:10840
<i>Nucleotide exchange factor SIL1</i>	SIL1	HGNC:24624
<i>E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1</i>	SMURF1	HGNC:16807
<i>Signal peptidase complex subunit 2</i>	SPCS2	HGNC:28962
<i>Signal peptidase complex subunit 3</i>	SPCS3	HGNC:26212
<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i>	SREBF1	HGNC:11289
<i>Sterol regulatory element-binding protein 2</i>	SREBF2	HGNC:11290

<i>Signal recognition particle 19 kDa protein</i>	SRP19	HGNC:11300
<i>Signal recognition particle 54 kDa protein</i>	SRP54	HGNC:11301
<i>Signal recognition particle subunit SRP68</i>	SRP68	HGNC:11302
<i>Signal recognition particle receptor subunit alpha</i>	SRPR	HGNC:11307
<i>Signal recognition particle receptor subunit beta</i>	SRPRB	HGNC:24085
<i>Translocon-associated protein subunit alpha</i>	SSR1	HGNC:11323
<i>Translocon-associated protein subunit beta</i>	SSR2	HGNC:11324
<i>Translocon-associated protein subunit gamma</i>	SSR3	HGNC:11325
<i>Translocon-associated protein subunit delta</i>	SSR4	HGNC:11326
<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	STIP1	HGNC:11387
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyl-transferase subunit STT3A</i>	STT3A	HGNC:6172
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B</i>	STT3B	HGNC:30611
<i>E3 ubiquitin-protein ligase CHIP</i>	STUB1	HGNC:11427
<i>Sulfotransferase 1A3</i>	SULT1A3	HGNC:11455
<i>Small VCP/p97-interacting protein</i>	SVIP	HGNC:25238
<i>E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin</i>	SYVN1	HGNC:20738
<i>Putative deoxyribonuclease TATDN2</i>	TATDN2	HGNC:28988
<i>Transducin beta-like protein 2</i>	TBL2	HGNC:11586
<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>	TCP1	HGNC:11655
<i>Talin-1</i>	TLN1	HGNC:11845
<i>E3 ubiquitin-protein ligase TM129</i>	TMEM129	HGNC:25137
<i>Transmembrane and ubiquitin-like domain-containing protein 1</i>	TMUB1	HGNC:21709
<i>Thioredoxin-related transmembrane protein 1</i>	TMX1	HGNC:15487
<i>Protein disulfide-isomerase TMX3</i>	TMX3	HGNC:24718
<i>Thioredoxin-related transmembrane protein 4</i>	TMX4	HGNC:25237
<i>Torsin-1A</i>	TOR1A	HGNC:3098
<i>Tripeptidyl-peptidase 1</i>	TPP1	HGNC:2073
<i>E3 ubiquitin-protein ligase TRIM13</i>	TRIM13	HGNC:9976
<i>Tripartite motif-containing protein 3</i>	TRIM3	HGNC:10064
<i>Testis-specific Y-encoded-like protein 2</i>	TSPYL2	HGNC:24358
<i>Thioredoxin domain-containing protein 11</i>	TXNDC11	HGNC:28030
<i>Thioredoxin domain-containing protein 16</i>	TXNDC16	HGNC:19965
<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	UBA1	HGNC:12469
<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5</i>	UBA5	HGNC:23230
<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6</i>	UBA6	HGNC:25581
<i>Ubiquitin-associated domain-containing protein 2</i>	UBAC2	HGNC:20486
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 A</i>	UBE2A	HGNC:12472
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B</i>	UBE2B	HGNC:12473
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C</i>	UBE2C	HGNC:15937

<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1</i>	UBE2D1	HGNC:12474
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2</i>	UBE2D2	HGNC:12475
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3</i>	UBE2D3	HGNC:12476
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D4</i>	UBE2D4	HGNC:2164
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E1</i>	UBE2E1	HGNC:12477
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E2</i>	UBE2E2	HGNC:12478
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 E3</i>	UBE2E3	HGNC:12479
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1</i>	UBE2G1	HGNC:12482
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2</i>	UBE2G2	HGNC:12483
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 H</i>	UBE2H	HGNC:12484
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1</i>	UBE2J1	HGNC:17598
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J2</i>	UBE2J2	HGNC:19268
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K</i>	UBE2K	HGNC:4914
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3</i>	UBE2L3	HGNC:12488
<i>Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6</i>	UBE2L6	HGNC:12490
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N</i>	UBE2N	HGNC:12492
<i>(E3-independent) E2 ubiquitin-conjugating enzyme</i>	UBE2O	HGNC:29554
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1</i>	UBE2Q1	HGNC:15698
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2</i>	UBE2Q2	HGNC:19248
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 R2</i>	UBE2R2	HGNC:19907
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S</i>	UBE2S	HGNC:17895
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 T</i>	UBE2T	HGNC:25009
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 U</i>	UBE2U	HGNC:28559
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1</i>	UBE2V1	HGNC:12494
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2</i>	UBE2V2	HGNC:12495
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 W</i>	UBE2W	HGNC:25616
<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Z</i>	UBE2Z	HGNC:25847
<i>Ubiquitin conjugation factor E4 A</i>	UBE4A	HGNC:12499
<i>Ubiquitin conjugation factor E4 B</i>	UBE4B	HGNC:12500
<i>Ubiquitin-like protein 4A</i>	UBL4A	HGNC:12505
<i>Ubiquilin-1</i>	UBQLN1	HGNC:12508
<i>UBX domain-containing protein 4</i>	UBXN4	HGNC:14860
<i>Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1</i>	UFC1	HGNC:26941
<i>Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1</i>	UFD1L	HGNC:12520
<i>E3 UFM1-protein ligase 1</i>	UFL1	HGNC:23039
<i>Ubiquitin-fold modifier 1</i>	UFM1	HGNC:20597
<i>UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1</i>	UGGT1	HGNC:15663
<i>UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 2</i>	UGGT2	HGNC:15664
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13</i>	USP13	HGNC:12611
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14</i>	USP14	HGNC:12612

<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 19</i>	USP19	HGNC:12617
<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25</i>	USP25	HGNC:12624
<i>Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C</i>	VAPB	HGNC:12649
<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	VCP	HGNC:12666
<i>Deubiquitinating protein VCIP135</i>	VCPIP1	HGNC:30897
<i>Selenoprotein S</i>	VIMP	HGNC:30396
<i>Wolframin</i>	WFS1	HGNC:12762
<i>WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1</i>	WIPI1	HGNC:25471
<i>X-box-binding protein 1</i>	XBP1	HGNC:12801
<i>Protein YIF1A</i>	YIF1A	HGNC:16688
<i>Ubiquitin thioesterase OTU1</i>	YOD1	HGNC:25035
<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 17</i>	ZBTB17	HGNC:12936

Tabelle A.13: Differenziell exprimierte Proteostasegene in WT-Linien im Vergleich zu $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Zelllinie	WT1	WT2	WT3	WT4
Gen				
CCL2	1	-1	-1	0
CREBRF	0	-1	0	1
EIF2AK2	1	0	0	0
FAM129A	0	0	0	-1
FKBP5	0	0	0	-1
PPP1R15A	-1	-1	0	0
PSMB8	1	0	0	0
PSMB9	1	0	0	0
PSMD13	1	0	0	0
PSMD2	0	0	0	-1
PSME1	1	0	0	0
PSME2	1	0	0	0
RNF128	-1	-1	-1	0
TPP1	0	-1	0	0
UBE2C	0	0	-1	-1
UBE2L6	1	0	0	0
UBE2S	0	0	0	-1
UBE2T	0	0	-1	-1
UGGT2	-1	0	0	0

-1: > 1,5-fach schwächer exprimiert gegenüber $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

0: unverändert starke Expression gegenüber $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

1: > 1,5-fach stärker exprimiert gegenüber $GLA^{p.R301Q/o}$ -Fibroblasten

Tabelle A.14: Überrepräsentierte Signalwege innerhalb aller Gene der vier GT-Signaturen

Nr.	P-Wert	Signalweg	WikiPathways-ID
1	0	<i>Hs Proteasome Degradation</i>	WP183
2	0	<i>Hs Retinoblastoma (RB) in Cancer</i>	WP2446
3	$2,2 \times 10^{-13}$	<i>Hs Cell Cycle</i>	WP179
4	$2,9 \times 10^{-13}$	<i>Hs Parkin-Ubiquitin Proteasomal System pathway</i>	WP2359
5	$2,3 \times 10^{-12}$	<i>Hs Histone Modifications</i>	WP2369
6	$1,1 \times 10^{-11}$	<i>Hs Gastric Cancer Network 1</i>	WP2361
7	$1,3 \times 10^{-11}$	<i>Hs DNA Replication</i>	WP466
8	$3,8 \times 10^{-10}$	<i>Hs G1 to S cell cycle control</i>	WP45
9	$1,6 \times 10^{-09}$	<i>Hs Integrated Pancreatic Cancer Pathway</i>	WP2377
10	$2,3 \times 10^{-08}$	<i>Hs NRF2 pathway</i>	WP2884

Hs... Homo Sapiens

Tabelle A.15: Differenziell exprimierte Proteostasegene nach Behandlung mit den PRs

Gen	Behandlung	MG132	BTZ	CLC	EerI
ADRM1		1,97	2,12	1,94	1,97
AHSA1		2,19	1,89	n.a.	n.a.
CCL2		n.a.	0,63	1,52	0,58
CREB3L1		0,64	0,65	n.a.	n.a.
DDIT3		1,66	n.a.	n.a.	n.a.
DNAJA1		1,98	1,71	n.a.	n.a.
DNAJB1		5,12	3,05	n.a.	n.a.
ERO1LB		1,52	n.a.	n.a.	n.a.
FAF2		n.a.	1,51	n.a.	n.a.
FAM129A		2,54	2,44	2,00	2,08
FKBP7		0,65	n.a.	n.a.	n.a.
HSP90AA1		1,89	1,67	n.a.	n.a.
HSP90AB1		1,86	1,68	n.a.	n.a.
HSPA1A		5,67	4,83	n.a.	1,94
HSPA1B		12,59	9,42	n.a.	2,34
HSPB6		1,65	1,61	1,62	n.a.
HSPH1		2,79	2,16	n.a.	n.a.
JKAMP		1,74	1,79	n.a.	1,50
LMAN2L		1,61	n.a.	n.a.	n.a.
NGLY1		1,51	n.a.	n.a.	n.a.
NPLOC4		1,98	1,97	n.a.	1,56
NSFL1C		1,97	1,97	1,56	1,72
PSMA1		1,85	1,88	1,74	1,70
PSMA2		2,08	2,11	1,65	1,58
PSMA3		2,39	2,43	1,82	1,99

ANHANG

PSMA4	2,03	2,08	1,63	1,67
PSMA5	2,12	2,22	1,60	1,77
PSMA6	1,88	1,92	1,59	1,68
PSMA7	1,59	1,63	1,55	1,51
PSMB1	1,53	1,57	1,58	1,58
PSMB2	2,14	2,23	1,85	1,78
PSMB3	2,68	2,71	2,57	1,87
PSMB4	2,20	2,18	1,92	1,78
PSMB5	1,88	1,87	1,63	1,60
PSMB6	1,96	1,96	1,91	1,58
PSMB7	1,97	1,89	1,75	1,64
PSMC1	1,84	1,87	1,63	1,70
PSMC2	1,71	1,85	1,62	1,76
PSMC3	1,69	1,70	1,61	n.a.
PSMC4	3,04	3,17	2,43	2,08
PSMC5	2,05	2,06	1,78	1,64
PSMC6	2,38	2,37	1,53	1,91
PSMD1	2,02	2,04	1,72	1,70
PSMD11	2,45	2,63	1,93	2,05
PSMD12	2,25	2,33	n.a.	1,76
PSMD13	2,33	2,41	1,92	1,83
PSMD14	2,20	2,27	1,98	1,95
PSMD2	1,66	1,59	1,56	n.a.
PSMD3	2,38	2,55	1,99	2,04
PSMD4	1,88	1,86	1,54	n.a.
PSMD6	2,20	2,19	n.a.	1,58
PSMD8	1,72	1,71	1,57	n.a.
STIP1	2,25	1,97	n.a.	n.a.
UBE2C	0,60	n.a.	n.a.	0,57
UBE2K	1,57	1,61	n.a.	n.a.
UBE2O	1,84	1,83	n.a.	n.a.
UBE2T	0,65	n.a.	n.a.	0,63
UBE4B	1,53	1,52	n.a.	n.a.
UBQLN1	1,67	1,71	n.a.	n.a.
UBXN4	1,70	1,80	n.a.	n.a.
UFD1L	2,57	2,50	1,99	1,85
USP14	1,98	2,13	1,51	1,57
VCP	1,56	1,60	n.a.	n.a.
WFS1	2,51	2,35	1,77	n.a.

n. a.: nicht angegeben, da Expression < 1,5-fach verändert

rot: Hochregulation; grün: Herunterregulation

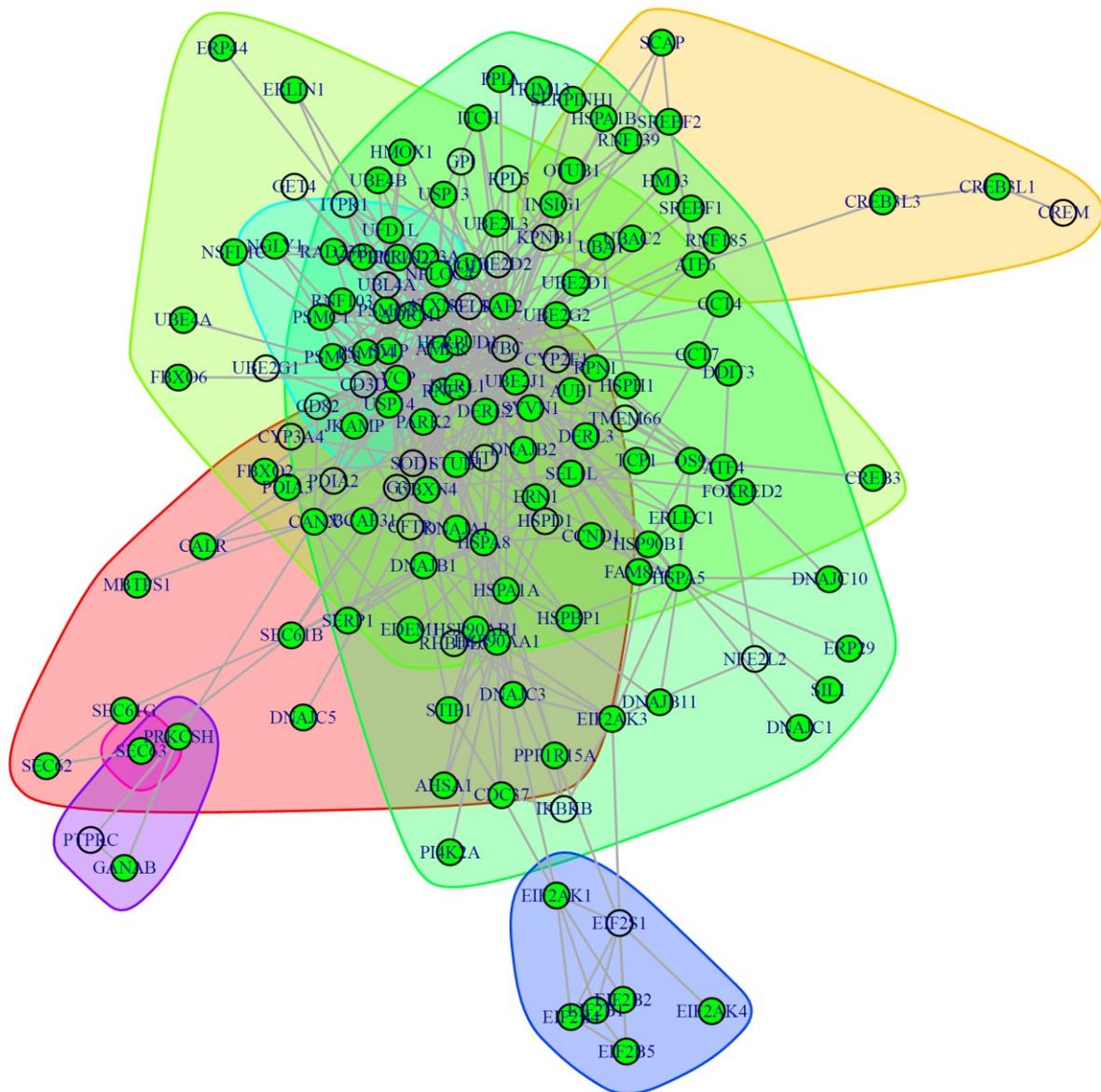


Abbildung A.1: Proteostase-Netzwerk. Die in der Literatur recherchierten Proteostasegene (grüner Knoten) wurden mit Hilfe der String-Datenbank unter Einbeziehung von Brückengenen (farbloser Knoten) zur Herstellung eines Interaktionsnetzwerkes verwendet. Dieses basiert sowohl auf Protein-Protein-Interaktionen als auch auf funktionalen Interaktionen. Die dargestellten Subnetzwerke basieren auf einer verstärkten Interaktion zwischen den Subnetzwerkkomponenten im Vergleich nach außen. Das Netzwerk wurde am Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock unter Verwendung des Programmes R erstellt.

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Arndt Rolfs für die Überlassung des Themas danken und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Albrecht-Kossel-Institut anfertigen zu können.

An dieser Stelle möchte ich auch der Firma Centogene, insbesondere Dr. Claudia Cozma, für die Durchführung der lyso-Gb3-Messungen und die Sequenzierung der Zelllinien danken. Weiterhin danke ich Amicus Therapeutics für die Bereitstellung der *GLA*^{p.R301Q/o}-Zelllinie. Mein Dank gilt auch Dr. Matthias Ernst und Dr. Stephan Struckmann vom Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Alternsforschung der Universitätsmedizin Rostock für die Unterstützung bei der Microarray-Analyse sowie der Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven und Synergie-Kalkulationen.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Jan Lukas für die Betreuung des Projektes, die hilfreichen Ratschläge und die Korrekturen bedanken.

Außerdem danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen des Albrecht-Kossel-Instituts für ihre Hilfe und Unterstützung und die freundlichen Gespräche, insbesondere Dr. Moritz Frech für das Korrekturlesen der Arbeit, Dr. Rayk Hübner, Dr. Anne-Katrin Giese, Linda Haake für die Unterstützung bei der GO-Analyse, Chiara Cimmaruta, Anne-Marie Knospe, Franziska Peter, Fan Yang, Xiao Feng, Anke Schneider und natürlich auch allen anderen. Des Weiteren möchte ich Sebastian Rost für die technische Unterstützung danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Ratschläge, ihr offenes Ohr und die angenehmen Ablenkungen.

Der größte Dank gilt meinem Freund Matthias für das bemerkenswerte Verständnis, den nicht endenden Rückhalt und die stetige Motivation.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Susanne Seemann, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Beeinflussung der ER-assoziierten Proteostase zur Erhöhung der Aktivität mutanter α -Galaktosidase A und der Verbesserung der Pathophysiologie in Morbus Fabry“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, 01.10.2018

Susanne Seemann