

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Aus der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“

Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Rostock

Sektionsleiter: Prof. Dr. Dr. Andreas Hermann

Themenvergebender Hochschullehrer: PD Dr. phil. nat. habil. Moritz Frech

**Identifizierung und Charakterisierung von pharmakologischen
Chaperonen zur Behandlung von Morbus Niemann-Pick Typ C1
unter Verwendung von neuronalen und Hepatozyten-ähnlichen
Zellen abgeleitet aus patientenspezifischen induzierten
pluripotenten Stammzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften (Doctor rerum humanarum)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Christin Völkner, geb. am 25.05.1994 in Rostock

Rostock, 04.04.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004050

Erstgutachter: PD Dr. phil. nat. Moritz Frech
Universitätsmedizin Rostock
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Sektion für Translationale Neurodegeneration "Albrecht Kossel"

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree
Universitätsmedizin Rostock
Institut für Anatomie

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Liebau
Eberhard Karls Universität Tübingen
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie – INDB

Datum der Verteidigung: 16.11.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Morbus Niemann-Pick Typ C.....	1
1.2	Pharmakologische Chaperone als Therapieansatz für NP-C1	9
1.3	iPS-zellbasierte Modelle zur Untersuchung der neuroviszeralen Krankheit NP-C1	15
2	Zielstellung	17
3	Materialien und Methoden	18
3.1	Materialien.....	18
3.2	Kultivierung humaner und muriner Zelllinien.....	20
3.3	Generierung von iPS-Zellen aus Fibroblasten.....	24
3.4	Charakterisierung der iPS-Zellen	27
3.5	Differenzierung der iPS-Zellen in neural differenzierte Zellen.....	32
3.6	Differenzierung der iPS-Zellen in Hepatozyten-ähnliche Zellen	33
3.7	Immunzytochemische Färbungen.....	34
3.8	Filipinfärbung	34
3.9	Western Blot-Analyse.....	35
3.10	Kolokalisationsanalysen	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Generierung und Charakterisierung neuer iPS-Zelllinien	39
4.2	Generierung und Charakterisierung des neuralen Zellmodells	45
4.3	Generierung und Charakterisierung des hepatischen Zellmodells	47
4.4	Phänotypische Veränderungen bei Morbus Niemann-Pick Typ C1	50
4.5	Behandlung des NP-C1 Phänotyps mit pharmakologischen Chaperonen.....	63
4.5.1	Identifizierung von potentiellen pharmakologischen Chaperonen	63
4.5.2	Behandlung der NPC1 ^{I1061T/I1061T} -Fibroblasten.....	64
4.5.3	Behandlung der NPC1 ^{I1061T/I1061T} -NDZs und -HLZs	68
4.5.4	Wirksamkeit pharmakologischer Chaperone in Mutanten mit <i>missense</i> -Mutation.....	72
5	Diskussion	75
5.1	Pathophysiologie des Morbus Niemann-Pick Typ C1	75
5.2	Pharmakologische Chaperone als experimentelle Therapeutika für die lysosomale Speichererkrankung NP-C1	83

5.3	Wirkmechanismus der identifizierten Substanzen als pharmakologische Chaperone für NP-C1	85
5.4	Zugänglichkeit der getesteten NPC1-Varianten gegenüber pharmakologischen Chaperonen.....	89
6	Zusammenfassung	93
7	Literaturverzeichnis	95
8	Abbildungsverzeichnis.....	108
9	Formelverzeichnis.....	109
10	Tabellenverzeichnis	110
11	Abkürzungsverzeichnis	111
12	Anhang.....	114
12.1	Materialien.....	114
12.2	Charakterisierung der Zellsysteme	130
12.3	Phänotypische Veränderungen bei Morbus Niemann-Pick Typ C1	134
13	Danksagung	137
14	Eidesstattliche Erklärung	138
15	Wissenschaftlicher Lebenslauf	139

1 Einleitung

1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C

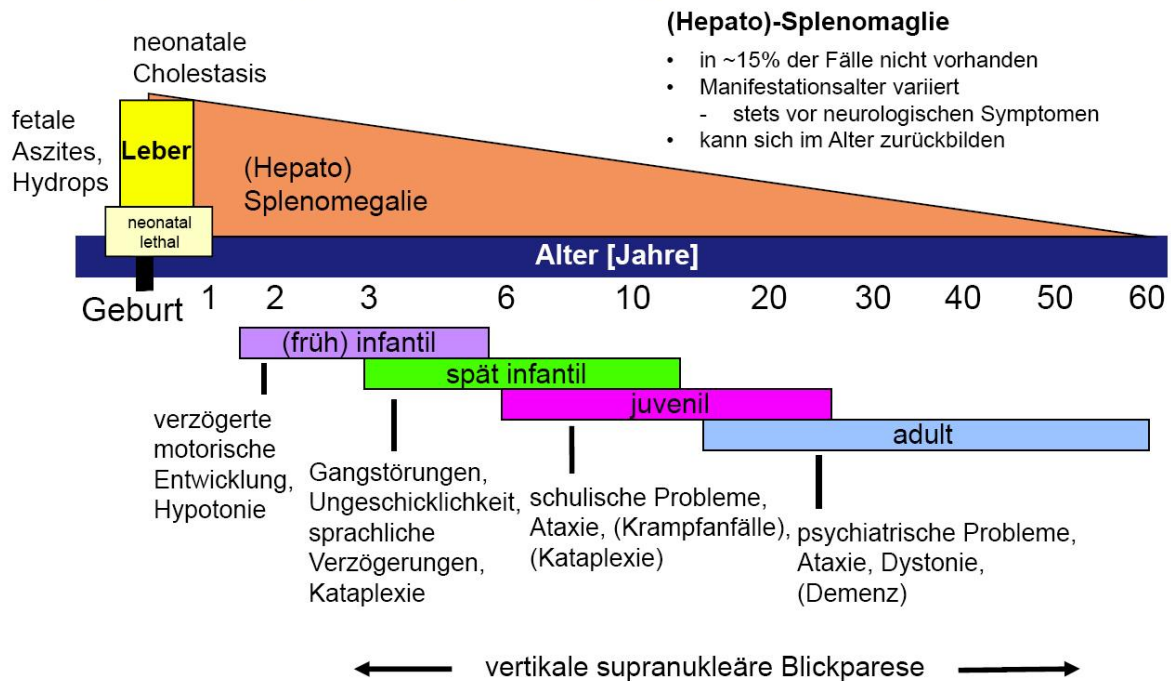
Morbus Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine seltene, autosomal-rezessive lysosomale Speichererkrankung (LSD, engl. *lysosomal storage disease*) mit einer minimalen Inzidenz von etwa 1:90.000 Lebendgeburten (Wassif et al. 2016). Für NP-C sind zwei krankheitsverursachende Gene identifiziert worden: das *NPC1*-Gen (Carstea et al. 1997) und das *NPC2*-Gen (Naureckiene et al. 2000). Dementsprechend wird zwischen Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NP-C1; OMIM #257220) und Morbus Niemann-Pick Typ C2 (NP-C2; OMIM #607625) unterschieden, wobei in 95 % der Fälle eine Mutation in dem *NPC1*-Gen vorliegt (Millat et al. 1999). Die Gene kodieren jeweils für die Cholesteroltransporterproteine Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) bzw. Niemann-Pick Typ C2 (NPC2), die gemeinsam den Export von freiem Cholesterol aus späten Endosomen und Lysosomen realisieren. Die Dysfunktion eines der beiden Proteine führt zu einer abnormalen Anreicherung von Cholesterol und sekundären Lipiden in diesen Kompartimenten.

Klinischer Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C1

Die klinischen Ausprägungen des NP-C1 sind äußerst heterogen und reichen von einer schweren, rasch tödlich verlaufenden Systemerkrankung mit neonatalem Beginn bis zu einer chronischen neurodegenerativen Erkrankung im Erwachsenenalter (Abbildung 1). Die Lebensdauer schwankt dementsprechend zwischen einigen wenigen Tagen und mehr als 60 Jahren. NP-C1 wird als neuroviszerale Krankheit definiert, wobei sich die viszeralen und neurologischen Symptome zu verschiedenen Zeitpunkten manifestieren und einen voneinander unabhängigen Verlauf zeigen (Vanier 2010). Abgesehen von einer kleinen Untergruppe von Patienten, die aufgrund einer Leberinsuffizienz bei der Geburt oder in den ersten sechs Lebensmonaten versterben, entwickeln alle Patienten eine fortschreitende, neurologische Symptomatik. Die systemischen Symptome, wenn vorhanden, gehen den neurologischen immer voraus, dazwischen können jedoch Jahre bis Jahrzehnte vergehen. Zu den systemischen Manifestationen zählen unter anderem eine neonatale cholestatische Gelbsucht und eine isolierte Spleno- oder Hepatosplenomegalie. Bei 15 % aller Patienten fehlt diese systemische Komponente jedoch (Vanier 2010). Die neurologischen Symptome variieren abhängig vom Alter bei Ausbruch der Krankheit. Die häufigsten Erscheinungsformen (etwa 60-70 %) sind die spät infantilen und juvenilen Formen (Vanier und Millat 2003). Bei diesen Patienten besteht

die neurologische Störung hauptsächlich in Form einer zerebellären Ataxie (Störung der Bewegungskoordination), Dysarthrie (Artikulationsstörungen), Dysphagie (Schluckstörungen) sowie einer charakteristischen vertikalen supranukleären Blickparese. Weiterhin werden häufig Krämpfe, Kataplexien und Dystonien beobachtet. Im Erwachsenenalter sind häufig psychiatrische Störungen die ersten Krankheitsanzeichen (Walterfang et al. 2006).

Systemische (viszerale) Beteiligung



Neurologische Beteiligung

Abbildung 1: Schema der Verlaufsformen und der neuroviszeralen Symptome bei NP-C1. Das klinische Bild des NP-C1 ist sehr heterogen. Abhängig von dem Auftreten erster neurologischer Symptome unterscheidet man die perinatale, früh/spät infantile, juvenile und adulte Form. Die Schwere der Krankheit wird durch die neurologischen Symptome bestimmt, denen systemische Symptome, wie eine (Hepato)-Spleno- und Leberomegalie, vorausgehen können (modifiziert nach (Vanier 2010)).

Der NPC1/NPC2-vermittelte intrazelluläre Cholesteroltransport

Das *NPC1*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 18 lokalisiert (Genlokus 18q11.2) und wurde 1997 identifiziert (Carstea et al. 1997). Es besteht aus 25 kodierenden Exons, die sich über etwa 56 kb der menschlichen genomischen DNA erstrecken (Kandakatla et al. 2014). Das *NPC1*-Gen kodiert für ein 1278 Aminosäuren großes, ubiquitär vorkommendes, transmembranöses NPC1-Protein der späten Endosomen und Lysosomen (Ioannou 2000). Es besitzt 13 Transmembrandomänen, 3 große und 4 kleine luminalen Schleifen, 6 kleine zytoplasmatische Schleifen, sowie einen zytoplasmatisch gelegenen C-Terminus (Davies und Ioannou 2000) (Abbildung 2). Im Rahmen der posttranslationalen Modifikation findet eine

N-Glykosylierung von Asparaginresten des Proteins statt. Insgesamt 14 Glykosylierungsstellen sind ausschließlich auf der luminalen Seite des Proteins vorhanden, um es vor der Degradation zu schützen (Scott et al. 2004). Das NPC1-Protein enthält drei Domänen von besonderer Bedeutung: die N-terminale Domäne (NTD), die Sterol-sensitive Domäne (SSD) und die Cystein-reiche Schleife (CRS) (Abbildung 2, (Cianciola et al. 2011)). Die NTD (Aminosäuren 25-264) auf der luminalen Seite ist von funktioneller Bedeutung, da sie in der Lage ist Cholesterol zu binden (Infante et al. 2008a). Die SSD (Aminosäuren 615-797) ist ein hoch konservierter Bereich, den das NPC1-Protein mit anderen Schlüsselproteinen der Cholesterollhomöostase, wie z.B. NPC1L1 (engl. *Niemann-Pick C1-like Protein 1*), 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase, SCAP und Patched, gemein hat (Karten et al. 2009). Die SSD ist an der Regulation der Stabilität des NPC1-Proteins (Ohsaki et al. 2006), sowie an dessen Transport zum späten Endosom beteiligt (Scott und Ioannou 2004). Darüber hinaus ist die Rolle der SSD derzeit nicht abschließend geklärt. Obwohl gezeigt wurde, dass Mutationen in dieser Region dazu führen, dass ein photoaktivierbares Cholesterolanalogon nicht mehr an NPC1 binden kann (Ohgami et al. 2004), wurde die direkte Bindung von Cholesterol an diese Domäne noch nicht nachgewiesen. Weiterhin von Bedeutung ist die CRS (Aminosäuren 855-1098), in welcher etwa ein Drittel aller Patientenmutationen lokalisiert sind (Millat et al. 2001).

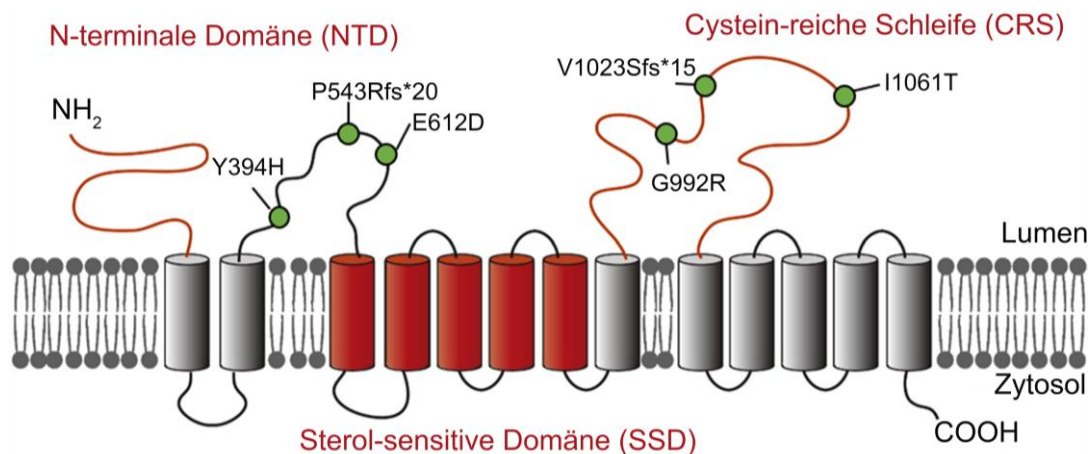


Abbildung 2: Struktur des transmembranösen NPC1-Proteins. Das NPC1-Protein besitzt 13 Transmembrandomänen, 7 luminalen Schleifen und 6 zytosolischen Schleifen. Rot hervorgehoben sind drei bedeutende Domänen. Die NTD ist die cholesterolbindende Domäne, die freies Cholesterol von dem löslichen NPC2-Protein übernimmt. Die SSD ist ein hoch konservierter Bereich, der auch in anderen Schlüsselproteinen der Cholesterollhomöostase zu finden ist. In der CRS sind etwa ein Drittel aller Patientenmutationen lokalisiert. Weiterhin sind die Positionen der Mutationen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (Mut 1: I1061T/I1061T; Mut 2: Y394H/Y394H; Mut 3: E612D/P543Rfs*20; Mut 4: G992R/V1023Sfs*15; vgl. Tabelle 3.1) eingezeichnet (modifiziert nach (Cianciola et al. 2011)).

Das *NPC2*-Gen ist auf Chromosom 14q24.3 lokalisiert (Naureckiene et al. 2000) und enthält 5 Exons, die für das 132 Aminosäuren große NPC2-Protein kodieren. Das NPC2-Protein ist im Gegensatz zum NPC1-Protein ein lösliches Glykoprotein, das in den späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist (Vanier und Millat 2004).

Da bei NP-C1- und NP-C2-Patienten ähnliche Phänotypen beobachtet werden, wurde früh geschlossen, dass die Proteine den intrazellulären Cholesteroltransport gemeinsam realisieren. Die Kenntnis der Struktur und der Lokalisation der beiden Proteine lassen einen sequentiellen Wirkmechanismus vermuten, der derzeit wie folgt beschrieben wird (Abbildung 3): Nachdem verestertes Cholesterol in Form von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL, engl. *low density lipoprotein*) über eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle und schließlich in die späten Endosomen/Lysosomen der Zelle aufgenommen wurde, wird es durch die lysosomale saure Lipase zu freiem, unveresterten Cholesterol hydrolysiert. Das freie Cholesterol bindet mit hoher Affinität an das lösliche NPC2-Protein (Xu et al. 2007). Bei der Bindung ist die Isooctyl-Seitenkette des Cholesterols in Richtung der hydrophoben Seitentasche des NPC2-Proteins gerichtet, während die 3 β -Hydroxylgruppe offen liegt (Xu et al. 2007; Kwon et al. 2009). Anschließend erfolgt der Transfer des Cholesterols vom NPC2-Protein zu der N-terminalen Domäne des NPC1-Proteins, welches Cholesterol in entgegengerichteter Position, mit der 3 β -Hydroxylgruppe voraus, bindet. Dabei findet eine direkte Bindung zwischen NPC2 und der mittleren luminalen Domäne (MLD) von NPC1 statt. Diese Protein-Protein-Interaktion tritt nur bei einem sauren pH-Wert auf, der dem von späten Endosomen und Lysosomen ähnlich ist, und erfordert, dass Cholesterol an NPC2 gebunden ist (Deffieu und Pfeffer 2011). Die Interaktion zwischen NPC1 und NPC2 ermöglicht den Transfer des wasserunlöslichen Cholesterols zwischen den beiden Proteinen zu der lysosomalen Membran ohne die wässrige Phase im Lumen zu durchqueren. Durch diesen *hydrophobic handoff*-Mechanismus wird die Kristallisation des Cholesterols verhindert (Vance und Peake 2011; Wang et al. 2010). Es ist bisher nicht abschließend geklärt, wie der Transfer des Cholesterols von dem NPC1-Protein über die lysosomale Membran zum endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. zur Plasmamembran erfolgt. Kürzlich wurde aber gezeigt, dass es einen zentralen Tunnel gibt, der die NTD und die SSD miteinander verbindet (Qian et al. 2020). Bei niedrigem pH-Wert findet eine Konformationsänderung statt, bei der ein Polyprolin-Linker, der die NTD und die erste Transmembrandomäne miteinander verbindet, die NTD in Richtung Eingang des zentralen Tunnels ausrichtet. Es wird angenommen, dass das freie Cholesterol so durch den Tunnel und über die SSD in das Zytosol transferiert wird (Qian et al. 2020).

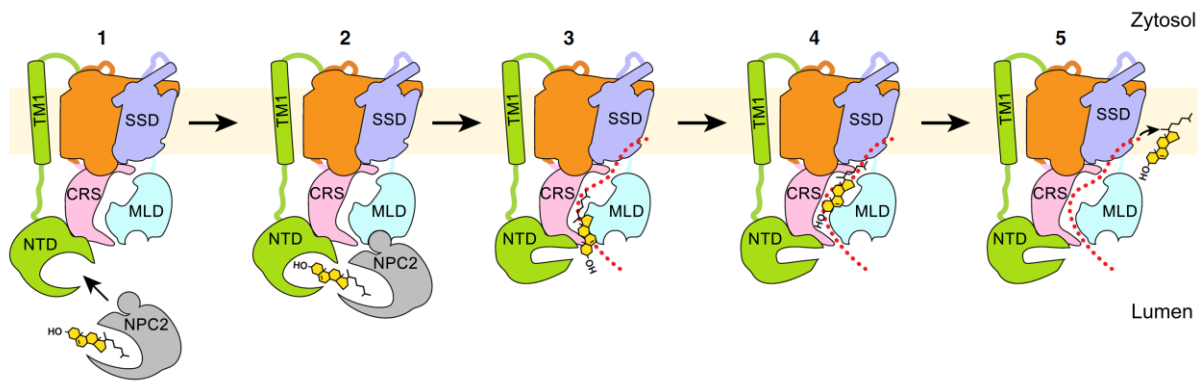


Abbildung 3: Mechanismus für den Cholesterolexport aus späten Endosomen/Lysosomen. (1) Im Lumen von späten Endosomen/Lysosomen bindet das NPC2-Protein Cholesterol mit hoher Affinität. Dabei ist die unpolare Isooctylgruppe in Richtung der cholesterolbindenden Tasche gerichtet. **(2)** Das NPC2-Protein interagiert direkt mit dem NPC1-Protein, indem es an die MLD des NPC1-Proteins bindet. Das Cholesterol wird an die NTD des NPC1-Proteins übergeben, wobei es in entgegengesetzter Position, mit der 3 β -Hydroxylgruppe in Richtung der Bindungstasche, bindet. **(3-5)** Eine pH-abhängige Konformationsänderung ermöglicht die Ausrichtung der NTD in Richtung eines zentralen Tunnels (rote gestrichelte Linie), der die NTD mit der SSD verbindet. Über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus wird das Cholesterol über die Membran der späten Endosomen/Lysosomen transferiert und zum ER bzw. der Plasmamembran transportiert (modifiziert nach (Long et al. 2020)). NPC2 = NPC2-Protein; NTD = N-terminale Domäne; MLD = mittlere luminal Domäne; CRS = Cystein-reiche Schleife; SSD = Sterol-sensitive Domäne; TM1 = Transmembrandomäne 1.

Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ C

Die Diagnose des NP-C ist aufgrund der vielfältigen und zunächst oft unspezifischen Symptome sowie des geringen klinischen Bewusstseins, aufgrund des seltenen Charakters der Krankheit, oftmals schwierig. Häufig kommt es zu Verzögerungen im diagnostischen Prozess oder sogar zu Fehldiagnosen (Lo et al. 2010). Sobald der klinische Verdacht auf NP-C besteht, kann die Diagnose durch die Kombination von biochemischen und molekulargenetischen Untersuchungen bestätigt werden. Lange galt der Filipintest, der an kultivierten Fibroblasten aus Hautbiopsien von Patienten durchgeführt wird, als Goldstandard im Diagnoseprozess für NP-C (Pentchev et al. 1985). Filipin ist ein fluoreszierendes, polyenes Makrolid-Antibiotikum, welches von *Streptomyces filipinensis* synthetisiert wird und spezifisch an 3 β -Hydroxysterole, wie Cholesterol, bindet (Muller et al. 1984). Es ist somit geeignet freies Cholesterol in Zellen nachzuweisen und wird standardmäßig für *in vitro* Untersuchungen verwendet. Unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie kann die Anhäufung von unverestertem Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen sichtbar gemacht werden. Dabei können unterschiedliche biochemische Phänotypen (klassisch, intermediär und variant) beobachtet werden, die sich durch einen variablen Grad an Cholesterolakkumulationen auszeichnen (Vanier und Latour

2015). Eine Illustration der Variationsbreite, die beim Filipin-Test in Fibroblasten von NP-C1 Patienten zu beobachten ist, zeigt die Abbildung 4. Etwa 85 % aller NP-C1 Patienten weisen einen klassischen Phänotyp auf, der sich durch eine starke Cholesterollakkumulation in Form von fluoreszierenden Vesikeln in nahezu allen Zellen auszeichnet. Bei Zelllinien mit einem varianten biochemischen Phänotyp ist die Gesamtfluoreszenzintensität niedrig und ähnelt der von Kontrollzelllinien. Während ein Großteil der Zellen ein normales Erscheinungsbild aufweist, zeigen nur einige wenige Zellen (10-50 %) ein schwaches Fluoreszenzmuster (Vanier und Latour 2015). In seltenen Fällen wird ein intermediärer Phänotyp beobachtet, bei dem die Gesamtfluoreszenzintensität zwischen klassischem und variantem Phänotyp liegt und nur etwa 60-90 % der Zellen positiv sind. Für diagnostische Zwecke ist eine solche Unterscheidung jedoch von geringer Bedeutung, da der Filipin-Test bei diesem Phänotyp ebenso wie bei dem klassischen Phänotyp eindeutig positiv ausfällt.

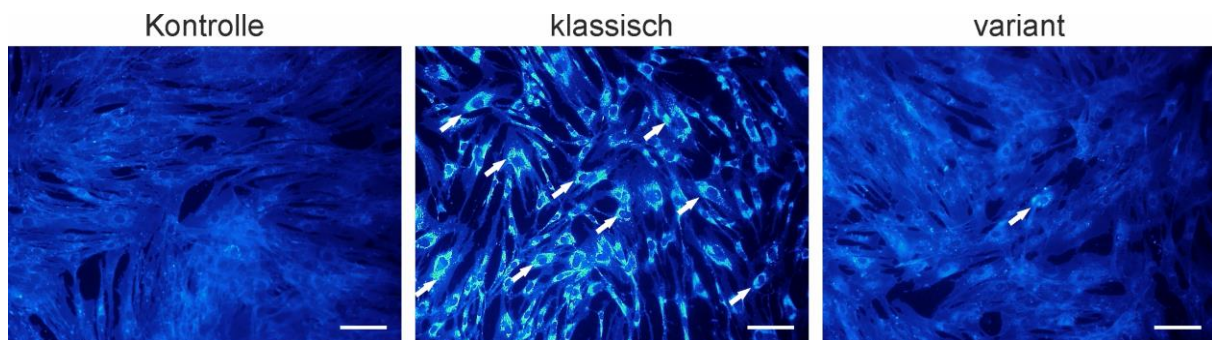


Abbildung 4: Illustration der Variationsbreite des biochemischen NP-C1 Phänotyps. Die zwei biochemischen Phänotypen nach Filipinfärbung – klassisch und variant – unterscheiden sich durch einen unterschiedlichen Grad an Cholesterollakkumulationen (Pfeile). Kontroll-Fibroblasten zeigen insgesamt eine sehr geringe Fluoreszenz ohne fluoreszierende Vesikel. Die Fibroblasten einer klassischen NP-C1 Zelllinie weisen eine große Anzahl von intensiv fluoreszierenden perinukleären Vesikeln auf, was der lysosomalen Cholesterollakkumulation entspricht. Bei Zelllinien mit einem varianten biochemischen Phänotyp sind nur einige wenige Zellen mit schwach fluoreszierenden, kleinen Vesikeln zu sehen. Maßstab 100 µm.

Da der Filipin-Test invasiv, sowie technisch anspruchsvoll und zeitintensiv ist, gilt inzwischen die Untersuchung von Biomarkern als Mittel erster Wahl im diagnostischen Prozess von NP-C, gefolgt von einer molekulargenetischen Analyse (Geberhiwot et al. 2018). Zu den Biomarkern zählen Oxysterole, wie Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol und 7-ketocholesterol (Porter et al. 2010), und Lysosphingolipide, wie Lyso-Sphingomyelin (Lyso-SM) und Lyso-Sphingomyelin-509 (Lyso-SM-509) (Giese et al. 2015). Diese können allein oder in Kombination genutzt werden, um die Sensitivität und Spezifität zu erhöhen. So zeigt Lyso-SM-509 eine Sensitivität von 100 %, ist aber weniger spezifisch (91 %), da es auch bei anderen Krankheiten wie der Sauren

Sphingomyelinase-Defizienz erhöht ist. Lyso-SM ist dagegen nur bei der Sauren Sphingomyelinase-Defizienz erhöht, daher ist ein hoher Lyso-SM-509/Lyso-SM-Quotient spezifisch für NP-C (Giese et al. 2015). Im Anschluss an die Analyse der Biomarker sollte immer eine Mutationsanalyse zum Nachweis von NP-C erfolgen (McKay Bounford und Gissen 2014). Die Identifizierung von zwei Allelen mit bekannten krankheitsverursachenden Mutationen im *NPC1*-Gen bzw. im *NPC2*-Gen bestätigt die NP-C Diagnose.

Zelluläre Pathophysiologie des Morbus Niemann-Pick Typ C1

Bisher wurden mehr als 500 *NPC1*-Genvarianten beschrieben (The Human Gene Mutation Database). Darunter befinden sich sowohl *missense*- und *nonsense*-Mutationen als auch Deletionen/Insertionen und Spleißdefekte, wobei mit etwa 60 % die Mehrzahl aller Mutationen *missense*-Mutationen darstellen (The Human Gene Mutation Database). Dazu zählt die Mutation I1061T, die häufig in Patienten aus Westeuropa auftritt und mit der juvenilen Form von NP-C1 assoziiert wird (Millat et al. 1999; Park et al. 2003). Diese Punktmutation ist in der CRS des NPC1-Proteins lokalisiert (vgl. Abbildung 2) und führt zu einem *loss-of-function*-Phänotyp. Durch die fehlerhafte Base an Position 3182 des DNA-Strangs (Cytosin statt Tyrosin) kommt es zu einem Austausch der Aminosäure an Stelle 1061 der Aminosäurekette (Threonin statt Isoleucin). Solche *missense*-Mutationen resultieren auf Grund der veränderten Aminosäuren häufig in einer Beeinträchtigung der strukturellen Faltung des Proteins (siehe Abbildung 5). Normalerweise werden sekretorische Proteine, wie NPC1, an ER-gebundenen Ribosomen synthetisiert und kotranslational in das ER-Lumen transportiert, wo die Anbindung von N-Glykanen an das Polypeptid erfolgt. Der Zuckerrest wird von molekularen Chaperonen erkannt, die durch direkte Interaktion mit dem Glykoprotein dessen Faltung unterstützen. Nach korrekter Faltung wird das Protein für den Austritt aus dem ER freigegeben und zum Golgi-Apparat transportiert, wo die N-Glykosylierung fortgesetzt wird. Schließlich wird das native Glykoprotein zum Lysosom transportiert, wo es seine Funktion ausüben kann (Parenti et al. 2015). Eine *missense*-Mutation resultiert dagegen in einer Fehlfaltung des NPC1-Proteins und führt zu einer beeinträchtigten Prozessierung im ER. Für die Mutation I1061T konnte dieser Pathomechanismus im Detail beschrieben werden (Gelsthorpe et al. 2008). Das fehlgefaltete Protein wird von der Qualitätskontrolle des ER erkannt und im Rahmen der ER-assoziierten Degradation (ERAD) dem Abbau durch das Proteasom zugeführt (Zampieri et al. 2012). Obwohl die Funktionalität des Proteins trotz der *missense*-Mutationen häufig noch gegeben ist, kann es aufgrund der Fehlfaltung und dem daraus resultierenden frühzeitigen Abbau, seine Funktion als Cholesteroltransporter in der lysosomalen Membran nicht erfüllen (Abbildung 5).

Für die Mutation I1061T wurde dieser Zusammenhang anhand von Überexpressionsexperimenten aufgezeigt (Gelsthorpe et al. 2008). Die Überexpression des mutierten NPC1^{I1061T}-Proteins in NPC1-defizienten Zellen führt zu einer erhöhten Lokalisation des Proteins in späten Endosomen und Lysosomen und zur Komplementierung der Cholesterollakkumulation. Dies ist auf den Anteil des NPC1^{I1061T}-Proteins zurückzuführen, der sich korrekt falten und somit die Qualitätskontrollpunkte des ER passieren kann (Gelsthorpe et al. 2008).

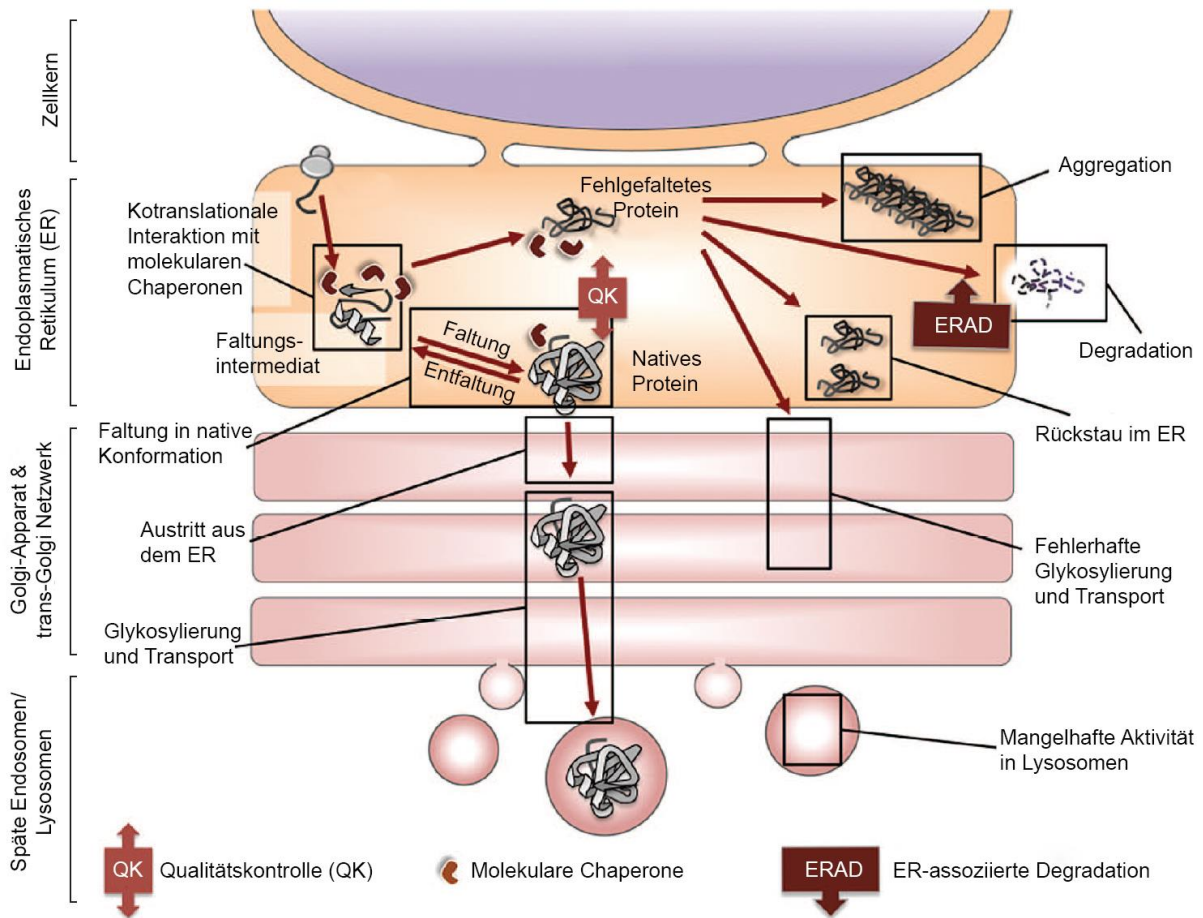


Abbildung 5: Faltung und Transport lysosomaler Proteine entlang des sekretorischen Wegs. Während der Synthese der Proteine im ER unterstützen molekulare Chaperone kotranslational die korrekte Faltung der Proteine. Dies geschieht durch direkte Bindung der molekularen Chaperone an das naszierende Protein, wodurch dieses stabilisiert und eine vorzeitige Fehlfaltung verhindert wird. Proteine, die korrekt gefaltet sind, passieren die Qualitätskontrolle (QK) und verlassen das ER, woraufhin sie über den Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert werden. Mutierte, fehlergefaltete Proteine werden dagegen von der Qualitätskontrolle des ER erkannt. Es folgt eine Retrotranslokation des Proteins in das Zytosol, wo es im Rahmen der ERAD dem Abbau durch das Proteasom zugeführt wird (modifiziert nach Parenti et al. 2015)).

1.2 Pharmakologische Chaperone als Therapieansatz für NP-C1

Derzeit gibt es keine Heilung für NP-C1; die einzig verfügbare Behandlung ist die Verabreichung des synthetischen Iminozuckers Miglustat als Substratreduktionstherapie. Darüber hinaus gibt es einige experimentelle Therapeutika, die zum Teil bereits in klinischen Studien untersucht wurden. Im Folgenden wird zunächst die bestehende Therapiemöglichkeit durch Miglustat sowie die experimentellen Therapieansätze vorgestellt, ehe dann die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen als alternativer Therapieansatz, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt, beschrieben wird.

Seit 2009 ist Miglustat (N-butyl-deoxynorjirimycin; Zavesca®) zur Behandlung von NP-C durch die Europäische Arzneimittel-Agentur zugelassen (Wraith 2009). Miglustat ist ein Iminozucker, der als reversibler Inhibitor der Glucosylceramidsynthase wirkt, welche den primären Schritt in der Glykosphingolipidsynthese katalysiert (Lyseng-Williamson 2014). Eine Inhibition dieses Enzyms führt folglich zu einer Reduktion der sekundären Akkumulation von Glykosphingolipiden bei NP-C. Da Glykosphingolipide zusammen mit Cholesterol unter anderem in *Lipid rafts* organisiert sind und Cholesterol in Lipiddoppelschichten durch die Anwesenheit von Sphingolipiden stabilisiert wird (Mesmin und Maxfield 2009), hat die Reduktion der Sphingolipide ebenfalls einen Einfluss auf den Cholesterolgehalt. Es ist nicht bekannt, ob die zelluläre Pathologie des NP-C1 durch die Akkumulation von Cholesterol selbst oder durch die Dysregulation anderer Lipide, einschließlich Sphingolipiden, verursacht wird (Lloyd-Evans und Platt 2010). In einer randomisierten Studie (Patterson et al. 2007) sowie in zwei Erweiterungsstudien (Wraith et al. 2010; Patterson et al. 2010) wurde eine Stabilisierung von neurologischen Symptomen gezeigt. Des Weiteren ist Miglustat in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, was im Hinblick auf die Behandlung einer neurodegenerativen Erkrankung wie NP-C von großer Bedeutung ist (Sitarska et al. 2021). Zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen von Miglustat zählen leichte bis mäßige gastrointestinale Symptome, wie Durchfall, Blähungen und Bauchschmerzen (Lyseng-Williamson 2014; Pineda et al. 2009). In Ermangelung einer Heilung bzw. einer Alternative, ist Miglustat ein wertvolles Mittel zur Behandlung von klinisch relevanten neurologischen Symptomen bei Patienten mit NP-C. Allerdings verzögert Miglustat lediglich die Progression der Erkrankung, bekämpft aber nicht deren Ursache. Die Etablierung einer kausalen Therapie bleibt daher weiterhin Gegenstand der Forschung.

Zu den vielversprechendsten experimentellen Therapieansätzen, die bereits in klinischen Studien untersucht wurden, gehört die Behandlung mit Cyclodextrinen, insbesondere 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CD). HP- β -CD ist ein zyklisches Oligosaccharid mit einem hydrophilen Äußeren und einem hydrophoben Kern (Ohtani et al. 1989), das Sterole mit hoher Affinität bindet und den lysosomalen Austritt von Cholesterol unabhängig von NPC1- bzw. NPC2-Proteinen realisiert (Rosenbaum und Maxfield 2011). Diese Behandlungsstrategie, wie auch die Behandlung mit Miglustat, zielt jedoch auf eine direkte Reduktion von Lipiden ab, wobei eine Wirkung auf den zugrundeliegenden *loss-of-function*-Phänotyp des NPC1-Proteins unberücksichtigt bleibt. Wie bereits beschrieben, resultieren die *missense*-Mutationen eher in einem Fehlfaltungsdefekt und vorzeitigem Abbau des mutierten, prämaternen NPC1-Proteins als in einem intrinsischen Funktionsverlust. Vor diesem Hintergrund sind Behandlungsstrategien, welche die korrekte Faltung des mutierten NPC1-Proteins mit funktioneller Restaktivität zum Ziel haben, von Vorteil, da sie so den Transport zur lysosomalen Membran und damit die Cholesteroltransportfunktion wiederherstellen. Im Allgemeinen kann man dazu drei verschiedene Kategorien von niedermolekularen Verbindungen unterscheiden: Proteostase-Regulatoren, chemische Chaperone und pharmakologische Chaperone (Mohamed et al. 2017; Muntau et al. 2014).

Proteostase-Regulatoren bieten einen generischen Ansatz zur Steigerung der Proteostaseaktivität. Sie wirken, indem sie die Expression und die Funktion von molekularen Chaperonen und Regulatoren des ER-Qualitätskontrollsystems verstärken, um die Proteinfaltung zu erleichtern und Fehlfaltungen zu minimieren. Im Zusammenhang mit NP-C1 wurde der Effekt von Proteostase-Regulatoren beispielsweise anhand von Ryanodin-Rezeptor-Antagonisten gezeigt (Yu et al. 2012). Der Ryanodinrezeptor ist ein Calciumkanal, der Calciumionen aus dem ER-Lumen in das Zytosol freisetzt. Eine Inhibition des Ryanodinrezeptors führt daher zu erhöhten ER-Calciumkonzentrationen, die über die Wirkung von Ca^{2+} -abhängigen molekularen Chaperonen, wie Calreticulin und Calnexin (Xiao et al. 2018), die Stabilität des NPC1-Proteins in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten erhöht und in der Folge zu einer verringerten Cholesterolakkumulation führt (Yu et al. 2012). Weiterhin wurde gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren wie MG132 (Zampieri et al. 2012) und Bortezomib (Macías-Vidal et al. 2014) zu einem signifikanten Anstieg des NPC1^{I1061T}-Proteins und einer Reduktion von freiem Cholesterol in späten Endosomen und Lysosomen führen. Eine weitere Gruppe von Proteostaseregulatoren sind Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACis), wie SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure, Vorinostat). HDACis regulieren die Proteostase, indem sie sowohl die Expression von molekularen Chaperonen erhöhen (Shi et al. 2007) als auch deren

Aktivität direkt modulieren, indem sie den Acetylierungsstatus der molekularen Chaperone verändern (Yang et al. 2013). So führen HDACis zu einer Reduktion der Cholesterollakkumulation in NPC1-defizienten Fibroblasten (Pipalia et al. 2011; Pipalia et al. 2017). Ein weiteres Medikament zur Modulation der Proteostase, Arimoclomol, wirkt indem es die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP), wie HSP-70, induziert, welches als molekulares Chaperon fungiert und entscheidend für die korrekte Prozessierung und Faltung des NPC1-Proteins im ER ist (Nakasone et al. 2014; Kirkegaard et al. 2016; Sitarska et al. 2021). In einer Phase 2/3 klinischen Studie wurde gezeigt, dass Arimoclomol in der Lage ist, die Progression von NP-C1 zu reduzieren (Mengel et al. 2021).

Chemische Chaperone, wie Glycerin, DMSO und 4-Phenylbuttersäure, imitieren die Funktion von molekularen Chaperonen, um die Faltung des mutierten Proteins zu unterstützen (Mohamed et al. 2017). Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit 10 % Glycerin zu einem signifikanten Anstieg des NPC1-Proteingehalts in Fibroblasten mit verschiedenen Mutationen führt (Zampieri et al. 2012). Auch die Behandlung mit 4-Phenylbuttersäure erhöht die NPC1^{I1061T}-Proteinmenge in Fibroblasten (Gelsthorpe et al. 2008). Chemische Chaperone wirken jedoch unspezifisch und müssen daher in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden, was ihre Anwendung an Patienten ausschließt (Rajan et al. 2011).

Obwohl die genannten Strategien zur Modulation der Prozessierung des NPC1-Proteins einen positiven Effekt auf die Pathophysiologie des NP-C1 zeigen, zielt keiner der bisher diskutierten Wirkstoffe direkt und spezifisch auf die Fehlfaltung des NPC1-Proteins ab, die bei der Mehrheit der NP-C1 Patienten auftritt. Es besteht also ein Bedarf an spezifischen Therapeutika, die auf den zugrundeliegenden molekularen Defekt von NP-C1 abzielen – dies wird durch den Einsatz von sogenannten pharmakologischen Chaperonen umgesetzt.

Pharmakologische Chaperone sind chemische Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht, die spezifisch an ihr Zielprotein binden und dieses stabilisieren (Liguori et al. 2020). Die Verwendung von Inhibitoren zur Erhöhung der Menge fehlgefalteter Proteine wurde erstmals in einer Arbeit von Fan et al. im Jahr 1999 beschrieben. Die Autoren zeigten, dass die Behandlung mit dem kompetitiven Inhibitor der α -Galaktosidase A, 1-deoxygalactonojirimycin (DGJ), in subinhibitorischen Konzentrationen zu einem Anstieg der Enzymaktivität in Lymphoblasten von Morbus Fabry-Patienten führte (Fan et al. 1999). Der Begriff pharmakologisches Chaperon wurde erst später durch Morello und Mitarbeiter eingeführt, die niedermolekulare Antagonisten zur Rettung von fehlgefalteten Varianten des Vasopressin-Rezeptors beschrieben (Morello et al. 2000). Pharmakologische Chaperone sind

nicht mit molekularen oder chemischen Chaperonen zu verwechseln. Molekulare Chaperone umfassen eine große Gruppe von körpereigenen Proteinen, die die Proteinfaltung unspezifisch unterstützen (Arhar et al. 2021), während chemische Chaperone kleine Osmolyte sind, die den Faltungsprozess nicht-selektiv unterstützen (Papp und Csermely 2006). Sowohl molekulare als auch chemische Proteine stabilisieren also praktisch jedes Protein und haben keine spezifische Bindungsstelle (Ringe und Petsko 2009). Pharmakologische Chaperone binden dagegen spezifisch an Domänen oder Interdomänenregionen ihres Zielproteins und stabilisieren die Gesamtstruktur, indem sie eine Art Grundgerüst bilden, um das herum das mutierte, fehlgefaltete Protein seine dreidimensionale Struktur annehmen kann. Sie bewirken eine thermodynamische Stabilisierung des Proteins und verschieben so das Gleichgewicht in Richtung der gefalteten und funktionalen Konformation (Pampalone et al. 2021).

Die Zielproteine von pharmakologischen Chaperonen können sehr unterschiedlich sein, darunter sezernierte Proteine, Transkriptionsfaktoren, Ionenkanäle, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Enzyme, wie z.B. lysosomale Hydrolasen (Liguori et al. 2020). Der Wirkmechanismus von pharmakologischen Chaperonen auf lysosomale Proteine ist in Abbildung 6 dargestellt. Durch die Bindung an das Faltungsintermediat des fehlgefalteten Proteins im ER wird die korrekte Faltung des Zielproteins unterstützt und dessen Abbau durch die ERAD verhindert. Dadurch gelangt das Protein entlang des sekretorischen Weges, über den Golgi-Apparat bis hin zu den Lysosomen. Das Ergebnis der Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen ist ein erhöhter intrazellulärer Pool an aktivem Protein und ein verbesserter Transport des Proteins zu seinem endgültigen Bestimmungsort, dem Lysosom, wodurch es seine jeweilige Funktion wieder erfüllen kann (Parenti 2009). Die Verwendung von pharmakologischen Chaperonen stellt besonders im Zusammenhang mit lysosomalen Speichererkrankungen einen vielversprechenden Therapieansatz dar, da sie häufig durch Mutationen verursacht sind, die mit Proteinfehlfaltungen verbunden sind (Parenti et al. 2015). Die Vorteile von pharmakologischen Chaperonen sind, dass sie oral eingenommen werden können und aufgrund ihrer geringen Größe die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, wodurch sie ein Potenzial für die Behandlung von lysosomalen Speichererkrankungen mit Beteiligung des Zentralen Nervensystems (ZNS), wie NP-C1, haben (Parenti 2009).

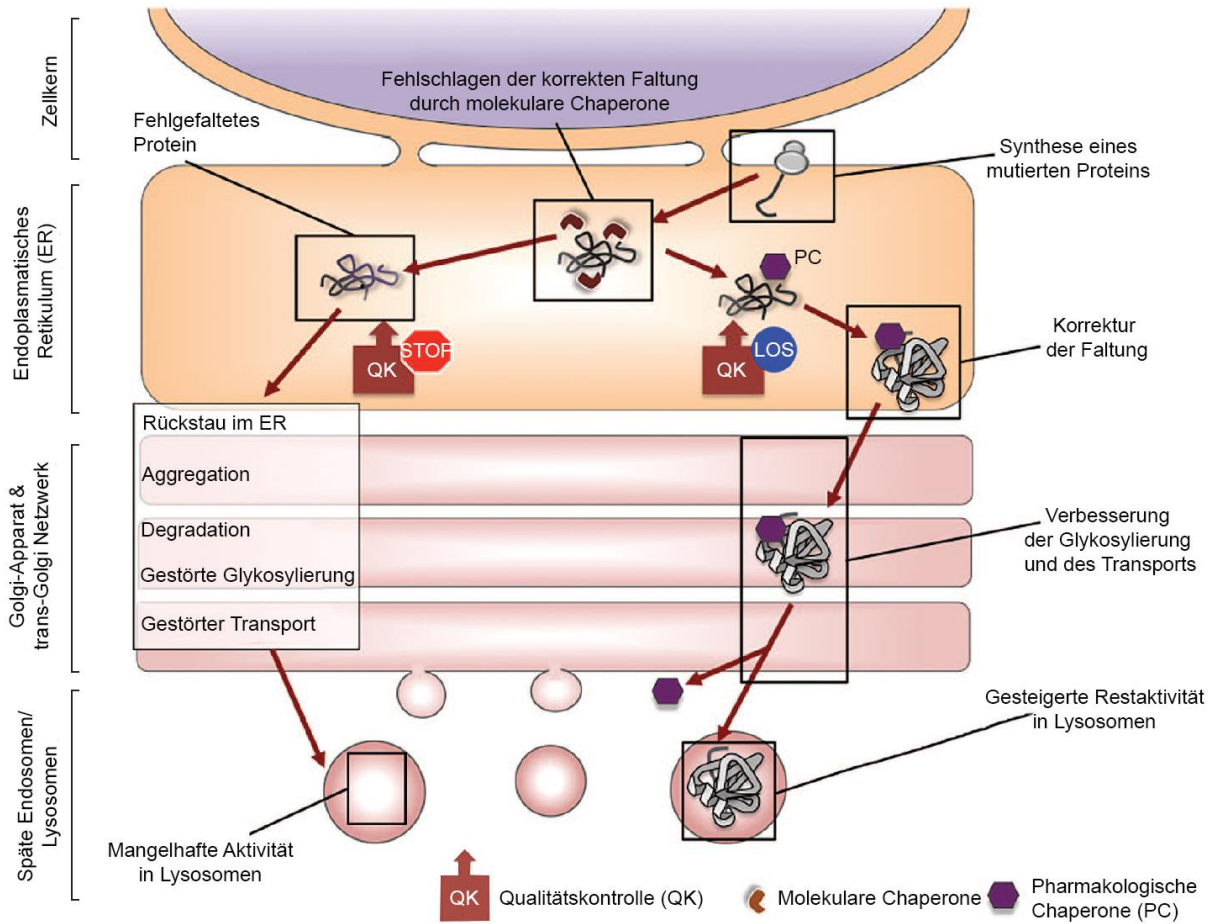


Abbildung 6: Wirkmechanismus von pharmakologischen Chaperonen auf lysosomale Proteine.

Niedermolekulare Substanzen wirken als pharmakologische Chaperone, indem sie spezifisch an das Faltungsintermediat des fehlgefalteten Zielproteins im ER binden und dessen korrekte Faltung unterstützen. In Folge dessen, werden die mutierten Proteine nicht von der Qualitätskontrolle des ER erkannt und entgehen der ERAD. Es folgt der Transport entlang des sekretorischen Wegs zu den Lysosomen, wo das mutierte Protein mit Restaktivität seine Funktion erfüllen kann, im Fall von NPC1 den Export von freiem Cholesterin (modifiziert nach (Parenti et al. 2015)).

Pharmakologische Chaperone der ersten Generation sind zumeist Substratanaloga, die mit hoher Affinität an das aktive Zentrum fehlgefalteter Enzyme binden und als kompetitive Inhibitoren wirken. Sie werden in niedrigen, subinhibitorischen Konzentrationen (im nano- bis mikromolaren Bereich) eingesetzt. In Gegenwart des physiologischen Substrats dissoziieren sie vom Zielprotein und stellen so die Aktivität wieder her. Ein ideales Chaperon sollte daher im ER eine gute Affinität zum Protein aufweisen, um die Faltung zu unterstützen, und im Lysosom eine gute Dissoziation vom Protein, um das aktive Zentrum wieder freizugeben und die Funktion wiederherzustellen. Das erste Beispiel für die Wirksamkeit von pharmakologischen Chaperonen bei lysosomalen Speichererkrankungen ist die Behandlung von Morbus Fabry mit dem Iminozucker 1-Deoxygalactonojirimycin (DGJ, Freiname: Migalastat, Handelsname:

Galafold™) (Moran 2018). DGJ bindet reversibel an das bei Morbus Fabry defekte Enzym α -Galaktosidase A und führt zu einer erhöhten Enzymaktivität in Folge des gesteigerten Transports der α -Galaktosidase A zu den Lysosomen (Markham 2016). Darüber hinaus werden pharmakologische Chaperone für eine Vielzahl von weiteren lysosomalen Speichererkrankungen diskutiert (Boyd et al. 2013). Inzwischen wurde der Begriff pharmakologische Chaperone der zweiten Generation eingeführt, um nicht-inhibitorische Moleküle zu beschreiben, die als allosterische Modulatoren die Faltung fördern. Ihre Bindungsstelle ist, anders als bei pharmakologischen Chaperonen der ersten Generation, nicht das aktive Zentrum (Tran et al. 2020), wodurch das Risiko einer nachteiligen Konkurrenz mit dem endogenen Substrat minimiert wird.

Mit einigen ersten Studien hat die Arbeitsgruppe um Ohgane pharmakologische Chaperone auch für die Behandlung von NP-C1 in den Fokus gerückt (Ohgane et al. 2013; Ohgane et al. 2014; Fukuda et al. 2017; Shioi et al. 2020). Aufgrund der konformativen Ähnlichkeit zu dem natürlichen NPC1-Liganden, Cholesterol, wurden als erstes Oxysterole, wie 25-Hydroxycholesterol (25-HC), als pharmakologische Chaperone für NP-C1 identifiziert (Ohgane et al. 2013; Ohgane et al. 2014), gefolgt von nicht-steroidalen pharmakologischen Chaperonen wie Phenanthridin-6-on Derivate (Fukuda et al. 2017) und Itraconazol (Shioi et al. 2020). Bisher hat dies aber noch zu keiner Zulassung eines pharmakologischen Chaperons für die Behandlung von NP-C1 geführt.

1.3 IPS-zellbasierte Modelle zur Untersuchung der neuroviszeralen Krankheit NP-C1

Es existieren eine Vielzahl von Tier- sowie Zellmodellen für NP-C1. Da das *NPC1*-Gen unter Eukaryoten hoch konserviert ist, können zahlreiche Organismen – von Pilzen bis hin zu Säugetieren – für die Untersuchung von NP-C1 herangezogen werden (Fog und Kirkegaard 2019). Das am häufigsten verwendete Mausmodell ist die *Npc1^{nih}* Maus (BALB/cNctr-*Npc1^{m1N}/J*), die durch eine spontane Mutation im *NPC1*-Gen entstanden ist und einen *de facto* NPC1 knock-out verursacht (Pentchev et al. 1980). Solche NPC1-Null-Mäuse weisen einen extremen Phänotyp auf, der den menschlichen NP-C1-Phänotyp lediglich teilweise widerspiegelt, da nur sehr wenige NP-C1 Patienten homozygot für trunkierende Mutationen sind (Fog und Kirkegaard 2019). Die meisten pathogenen Allele sind *missense*-Mutationen (The Human Gene Mutation Database), die potentiell zu einer Fehlfaltung des NPC1-Proteins führen. Daher sind die kürzlich generierten Mausmodelle mit *missense*-Mutationen von großem Wert für die Untersuchung von NP-C1. Dazu gehören die Modelle *Npc1^{nmf164}* (C57BL/6J-*Npc1^{nmf164}/J*), das die Mutation D1005G trägt (Maue et al. 2012) und *Npc1^{tm(I1061T)Dso}* (B6.129-*Npc1^{tm1.1Dso}/J*), das die Mutation I1061T in Homozygotie trägt (Praggastis et al. 2015). Im Gegensatz zu den NPC1-Null-Modellen, weisen diese Mausmodelle ein mutiertes NPC1-Protein mit funktioneller Restaktivität auf und zeigen einen milderen Phänotyp. Sie sind daher geeignet, um aktuelle experimentelle Therapeutika wie pharmakologische Chaperone *in vivo* zu testen. Neben den genannten *in vivo*-Modellen gibt es zahlreiche *in vitro* Zellsysteme zur Untersuchung der molekularen Mechanismen von NP-C1 und zur Testung der Wirkung von Therapien auf (sub)zellulärer Ebene. Das am häufigsten verwendete zelluläre Modellsystem sind patientenspezifische Fibroblasten, die aus Hautbiopsien gewonnen werden. Obwohl Fibroblasten ein geeignetes Zellmodell für die grundlegenden Aspekte der humanen NP-C1 Krankheit darstellen, sind sie möglicherweise nicht repräsentativ für die spezifischen zellulären Veränderungen in NPC1-defizienten Neuronen und Hepatozyten.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit aus patientenspezifischen Fibroblasten iPS-Zellen generiert und diese im Sinne eines humanen krankheitsrelevanten Zellmodells für die Differenzierung in neurale und hepatische Zellen genutzt.

Induzierte pluripotente Stammzellen sind, ebenso wie embryonale Stammzellen, in der Lage sich unbegrenzt zu teilen und in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm und Mesoderm) zu differenzieren. Die Generierung von iPS-Zellen aus embryonalen und adulten

Mausfibroblasten wurde erstmals 2006 von Takahashi und Yamanaka durch die induzierte Expression von vier Transkriptionsfaktoren (OCT3/4, SOX2, KLF4 und c-MYC) beschrieben (Takahashi und Yamanaka 2006). Nur ein Jahr später wurde diese retrovirale Reprogrammierung zu iPS-Zellen auch für humane somatische Zellen gezeigt (Takahashi et al. 2007). Seitdem werden unterschiedlichste Ausgangszellen, Transfermethoden und Reprogrammierungsfaktoren zur Erzeugung von iPS-Zellen genutzt (Al Abbar et al. 2020). Die anschließende Differenzierung der iPS-Zellen ermöglicht es, krankheitsrelevante Zelltypen in großen Mengen zu generieren und diese für *in vitro* Untersuchungen zu nutzen.

Das erste humane iPS-zellbasierte neurale Zellmodell für NP-C1 wurde 2013 durch unsere Arbeitsgruppe entwickelt (Trilck et al. 2013) und seitdem für die Generierung von mehreren Zelllinien mit unterschiedlichen Genotypen (Peter et al. 2017b; Völkner et al. 2020a; Völkner et al. 2020b), sowie zur Charakterisierung von biochemischen Mechanismen und für funktionelle Analysen verwendet. Das neurale Zellsystem besteht aus Neuronen und Gliazellen, die jeweils eine zelltypspezifische Morphologie, eine linienspezifische Markerexpression (Peter et al. 2017b) und eine neuronale elektrophysiologische Aktivität aufweisen (Rabenstein et al. 2017). Außerdem wurden typische NP-C1 Krankheitsmerkmale, wie Cholesterol- und GM2-Akkumulationen nachgewiesen (Trilck et al. 2017), sowie pathophysiologische Merkmale wie eine reaktive Gliose (Peter et al. 2017a) und oxidativer Stress (Jürs et al. 2020). Neben einer neuronalen Differenzierung können die iPS-Zellen auch als Ausgangszellen für die Differenzierung in Hepatozyten-ähnliche Zellen genutzt werden, die bei NP-C1 ebenfalls schwer betroffen sind. Bisher wurde die iPS-zellbasierte hepatische Differenzierung zur Untersuchung von NP-C1 nur durch zwei Arbeitsgruppen durchgeführt (Maetzel et al. 2014; Soga et al. 2015). In beiden Studien konnte eine signifikante Cholesterolakkumulation in den NPC1-defizienten Hepatozyten-ähnlichen Zellen gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben patientenspezifischen Fibroblasten auch iPS-zellbasierten neural differenzierte Zellen und Hepatozyten-ähnliche Zellen für die Untersuchung des NP-C1 Phänotyps und zur Testung von potentiellen pharmakologischen Chaperonen als experimentelle Therapiemöglichkeit für NP-C1 genutzt.

2 Zielstellung

Das übergeordnete Ziel der vorgelegten Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von pharmakologischen Chaperonen zur Behandlung von Morbus Niemann-Pick Typ C1. In Vorarbeiten wurden mittels *in silico* Screening aus einer Datenbank, die 2.162 von der FDA zugelassenen Substanzen umfasst, diejenigen identifiziert, die potentiell als pharmakologische Chaperone für NP-C1 wirken könnten. Im Hinblick darauf, dass es sich bei NP-C1 um eine neuroviszerale Krankheit handelt und vorrangig das Gehirn sowie die Leber betroffen sind, bisherige Studien sich aber zumeist auf patientenspezifische Fibroblasten beziehen, wurden in der vorliegenden Arbeit iPS-zellbasierte neural differenzierte Zellen und Hepatozyten-ähnliche Zellen generiert. Diese, sowie die Ausgangszellen, die patientenspezifischen Fibroblasten, wurden für die Testung der potentiellen pharmakologischen Chaperone herangezogen. Durch die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen soll die Maturierung mutierter NPC1-Proteinvarianten positiv beeinflusst und deren vorzeitiger Abbau über die ERAD vermindert werden. Die dadurch erhöhte NPC1-Proteinmenge in der lysosomalen Membran soll zu einer Reduktion der Cholesterolakкумуляtion in den Zellen führen und so die Pathophysiologie des Morbus Niemann-Pick Typ C1 verbessern.

Daraus ergeben sich folgende Zielstellungen für die Arbeit:

- Generierung und Charakterisierung von iPS-Zellen aus patientenspezifischen Fibroblasten
- Differenzierung der iPS-Zellen in neural differenzierte und Hepatozyten-ähnliche Zellen
- Beschreibung der Pathophysiologie in den verwendeten NP-C1 Zelllinien
- Die Untersuchung potentieller pharmakologischer Chaperone im Hinblick auf die Verbesserung der Pathophysiologie des NP-C1 in patientenspezifischen Fibroblasten, neural differenzierten und Hepatozyten-ähnlichen Zellen, mit Schwerpunkt auf:
 - den Cholesterolgehalt
 - die Proteinexpression und die Maturierung mutierter NPC1-Proteine
 - die subzelluläre Lokalisation des mutierten NPC1-Proteins

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 aufgeführten Zelllinien verwendet. In Tabelle 3.1 sind sämtliche Kontroll- und NP-C1-Zelllinien gelistet, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Dabei handelt es sich um vier Kontrollzelllinien und vier NPC1-defiziente Zelllinien. Jeweils drei Zelllinien sind von männlichen Spendern und eine ist von einer weiblichen Spenderin. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden zwei der drei männlichen Kontrollzelllinien (Kon A1 und Kon A2) von der Darstellung und Diskussion im Ergebnisteil ausgeschlossen, da sie nicht signifikant unterschiedlich zu der Kontrollzelllinie Kon A waren. Sie sind der Vollständigkeit halber aber dennoch im Anhang aufgeführt (Abbildung 43 bis Abbildung 45).

Tabelle 3.1: Verwendete Kontroll- und NP-C1-Zelllinien

Bezeichnung	Zelllinie-Klon	Allel 1	Allel 2	Geschlecht
Kon A	GM08398-1 ^a	-	-	männlich
Kon A1	#2062-2 ^c	-	-	männlich
Kon A2	GM05659-5 ^a	-	-	männlich
Kon B	KTRL28-5 ^b	-	-	weiblich
Mut 1	GM18453-8 ^a	p.I1061T (c.3182T>C)	p.I1061T (c.3182T>C)	männlich
Mut 2	A113011-3 ^c	p.Y394H (c.1180T>C)	p.Y394H (c.1180T>C)	männlich
Mut 3	GM18436-1 ^a	p.E612D (c.1836A>C)	p.P543Rfs*20 (c.1628delC)	männlich
Mut 4	DD-NPC1-12 ^b	p.G992R (c.2974G>C)	p.V1023Sfs*15 (c.3066_3073delinsT)	weiblich

^a Coriell Institute, Camden, USA; ^b Universität Dresden, DE; ^c Centogene AG, Rostock, DE

Die Tabelle 3.2 enthält alle Zelllinien, die für die Generierung und Kultivierung von iPS-Zellen verwendet wurden.

Tabelle 3.2: Verwendete Zelllinien

Zellart	Zelllinie	Zweck	Hersteller
Humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen, engl. <i>human embryonic kidney cells</i>)	HEK293FT	Virusgenerierung	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, USA
Inaktivierte embryonale Mausfibroblasten (MEF, engl. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)	CF-1	Feederzellen zur iPS-Kultivierung	Amsbio, Abingdon, UK

Die verwendeten Kultivierungsmedien sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung		Zusammensetzung
Basismedium	10 % 1 %	DMEM FBS Penicillin/Streptomycin
Stammzellmedium	20 % 0,1 mM 1 % 0,1 mM 1 % 10 ng/ml	DMEM-F12 Knockout Serum Replacement Nicht essentielle Aminosäuren GlutaMAX 2-Mercaptoethanol Penicillin/Streptomycin FGF2
mTesR1 Kompletmedium	400 ml 100 ml 0,25 %	mTesR1 Basalmedium mTeSR1 Supplement Penicillin/Streptomycin
EB-Medium	78 % 20 % 1 % 2 mM 0,1 mM 0,25 %	Knockout DMEM FBS Nicht essentielle Aminosäuren GlutaMAX 2-Mercaptoethanol Penicillin/Streptomycin
Proliferationsmedium	60 % 40 % 1x 0,5 % 20 ng/ml	DMEM DMEM-F12 B27 Penicillin/Streptomycin FGF2 und EGF
Differenzierungsmedium	60 % 40 % 1x 0,5 %	DMEM DMEM-F12 B27 Penicillin/Streptomycin
Definitives Endoderm Induktionsmedium	2 % 1 % 100 ng/ml 50 ng/ml	RPMI 1640 B27 ohne Vitamin A Penicillin/Streptomycin Activin A Wnt3a
KSR/DMSO Medium	80 % 20 % 1 % 1 % 1 % 0,5 % 0,1 mM	Knockout DMEM Knockout Serum Replacement DMSO Nicht essentielle Aminosäuren Penicillin/Streptomycin GlutaMAX 2-Mercaptoethanol
Hepatozytenmedium	1 % 10 µM 1 % 10 ng/ml 20 ng/ml	HepatoZYME-SFM GlutaMAX Hydrocortison-Natriumsuccinat Penicillin/Streptomycin HGF Oncostatin M

Die niedermolekularen Substanzen, welche als potentielle pharmakologische Chaperone untersucht wurden, sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Sämtliche Substanzen wurden als 10 mM Stammlösung in dem Lösungsmittel DMSO angesetzt und jeweils in einer Konzentration von 10 μ M verwendet.

Tabelle 3.4: Wirkstoffe

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
25-Hydroxycholesterol	Santa Cruz	sc-214091
Dydrogesteron	MedChemExpress	HY-B0257A
Methyltestosteron	MERCK	M1800000
Quinestrol	MERCK	E7887
Lumacaftor	MedChemExpress	HY-13262
Nandrolon Phenylpropionat	MERCK	BP260
Abirateronacetat	MedChemExpress	HY-75054
Eltrombopag	MedChemExpress	HY-15306
Ethinylestradiol	MedChemExpress	HY-B0216
Testosteronpropionat	MERCK	T1875
Nafamostat	MedChemExpress	HY-B0190

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Zellkulturmedien und Zusätze, Mikroorganismen und Medien, Chemikalien, Lösungen und Puffer, Standards und Farbstoffe, kommerzielle Komplettsysteme, Antikörper, Primer, Plasmide und Computerprogramme sind in Tabelle A.1 bis Tabelle A.15 aufgeführt.

3.2 Kultivierung humaner und muriner Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel wurden vom Hersteller steril geliefert und vor Einbringen in die Werkbank mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Weiterhin wurden sowohl Flüssigkeiten als auch hitzebeständige Glas- und Plastikmaterialien durch Autoklavieren bei 121 °C (20 min) sterilisiert. Vor Gebrauch in der Zellkultur wurden zudem sämtliche Medien im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte.

Auftauen der verwendeten Zelllinien

Die zur Langzeitlagerung geeigneten, kryokonservierten Zellen (humane Fibroblasten, HEK293FT, als Feederzellen dienende inaktivierte embryonale Mausfibroblasten (MEFs), iPS-Zellen und neurale Progenitorzellen) wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und unmittelbar danach tropfenweise in ein mit 9 ml des entsprechenden Mediums (siehe Tabelle

3.5) vorgelegtes Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen. Für die Zellzählung wurden 50 µl dieser Zellsuspension in 10 ml CASY[®]ton gegeben und die Zellzahl/ml mit Hilfe des CASY[®]-Zellzählsystems ermittelt. Die Zellen wurden anschließend entsprechend der Tabelle 3.5 für die Dauerkultur ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

Tabelle 3.5: Verwendete Zelllinien und entsprechende Kultivierungsbedingungen

Zellart	Medium	Zellzahl	Kulturgefäß	Volumen
Humane Fibroblasten	Basismedium	2,0 x 10 ⁶	T75	15 ml
HEK293FT-Zellen	Basismedium	2,5 x 10 ⁶	T75	15 ml
Feederzellen (MEFs)	Basismedium	3,3 x 10 ⁵	6-Well	1,5 ml
iPS-Zellen auf MEFs	Stammzellmedium	50 Kolonien	6-Well	1,5 ml
iPS-Zellen auf Matrigel	mTeSR1 Kompletmedium	1:10 (6-Well)	6-Well	1,5 ml
Neurale Progenitorzellen	Proliferationsmedium	1,0 x 10 ⁶	6-Well	1,5 ml

Kultivierung von humanen Fibroblasten und HEK293FT-Zellen

Sowohl die humanen Fibroblasten als auch die HEK293FT-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen in Basismedium kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 95 % passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml einfach phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,5 ml 0,25%igem Trypsin-EDTA pro T75-Zellkulturflasche und eine Inkubation von 5 min bei 37 °C. Nach Ablösen der Zellen vom Flaschenboden, wurde die enzymatische Reaktion mit 7,5 ml Basismedium gestoppt. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in Basismedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe des CASY[®]-Zellzählsystems bestimmt. Für die Dauerkultur wurden 2,0 x 10⁶ Fibroblasten bzw. 2,5 x 10⁶ HEK293FT-Zellen pro T75-Zellkulturflasche ausgesät.

Kultivierung von Feederzellen

Die MEFs dienen als Feederzellen für die Kultivierung früher iPS-Zellkolonien. Bei den MEFs handelt es sich um durch Gammastrahlung mitotisch inaktivierte Zellen, die kryokonserviert kommerziell erworben wurden. Durch die Inaktivierung wird sichergestellt, dass sie die iPS-Zellen nicht überwachsen. Die MEFs wurden daher vor jeder Stammzellpassage neu aufgetaut und es wurden jeweils 3,3 x 10⁵ MEFs pro Kavität einer 6-Well-Platte in Basismedium

ausgesät. Die Zellkulturgefäße wurden für eine bessere Zellanhaftung zuvor mit 0,1 % Gelatine in Reinstwasser für 30 min in einem Brutschrank beschichtet. Nachdem die MEFs für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte inkubiert wurden, konnten sie anschließend für die Aussaat der iPS-Zellen genutzt werden.

Kultivierung von iPS-Zellen auf Feederzellen

Die auf Feederzellen ausgesäten iPS-Zellen wurden in Stammzellmedium kultiviert, welches täglich erneuert wurde. Etwa alle fünf Tage wurden die iPS-Zellen passagiert. Eine Stunde zuvor wurde das Medium der iPS-Zellen durch frisches Stammzellmedium ersetzt und die Feederzellen wurden dreimal mit 2 ml DMEM/F-12 gewaschen, um Serumreste des Basismediums zu entfernen. Das Expandieren der Stammzellen auf Feederzellen erfolgte mechanisch mit Hilfe von Glashaken, welche aus Pasteurpipetten über einer Flamme präpariert wurden. Undifferenzierte Kolonien, die sich durch einen glatten Rand und ein dicht gepacktes Koloniezentrum auszeichnen, wurden in 4-8 Stücke geteilt. Etwa 50 dieser Koloniestücke wurden mit einer extra weiten Pipettenspitze, um die Kolonien nicht zu zerstören, auf frische Feederzellen umgesetzt und für eine bessere Anhaftung mit 10 µM ROCK-Inhibitor (Y-27632) versetzt. Die Kolonien wurden gleichmäßig verteilt und vorsichtig zum Brutschrank gebracht, wo sie 24 h nicht bewegt wurden.

Kultivierung von iPS-Zellen auf Matrigel

Die Feederzell-freie Kultivierung der iPS-Zellen erfolgte in Matrigel-beschichteten 6-Well-Platten in mTesR1 Komplettmedium. Matrigel ist ein gelatinöser Proteinkomplex, welcher der extrazellulären Matrix ähnelt. Für die Beschichtung wurde das Matrigel auf Eis aufgetaut und entsprechend der Matrigel-Charge in einem Verhältnis von 1:76 bis 1:110 in kaltem DMEM/F-12 gelöst. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde in eine Kavität einer 6-Well-Platte pipettiert und für 1 h, in der das Matrigel polymerisierte, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten konnten maximal zwei Wochen bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Etwa alle fünf Tage wurden die iPS-Zellen auf Matrigel passagiert. Bei Vorhandensein von differenzierten Anteilen, wurden diese zuvor mit Hilfe des Glashakens entfernt. Anschließend wurden die iPS-Zellen dreimal mit DMEM/-F12 gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml ReleSR™. Dies ist ein Enzym-freies Reagenz, welches das Passagieren von iPS-Zellen als Aggregate ohne mechanisches Zerkleinern ermöglicht. Unmittelbar nach Zugabe von ReleSR™ wurde dieses wieder entfernt und die Zellen für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml mTesR1 vom Plattenboden gelöst,

resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Zellen (240 x g, 3 min, Raumtemperatur), wurden die iPS-Zellen in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:20 in eine neue Matrigel-beschichtete 6-Well-Platte überführt und für eine bessere Anhaftung mit 10 µM ROCK-Inhibitor versetzt.

Kultivierung von neuronalen Progenitorzellen

Die neuronalen Progenitorzellen (NPZs) wurden auf mit Poly-L-Ornithin (PLO, 15 µg/ml) und Laminin (10 µg/ml) beschichteten Zellkulturplatten in Proliferationsmedium kultiviert. Dazu wurde die PLO-Stammlösung (15 mg/ml) in PBS verdünnt, in die Zellkulturplatten pipettiert und diese für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das PLO abgesaugt und die Platten dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde die Laminin-Stammlösung (1 mg/ml) in kaltem DMEM/F-12 verdünnt und in die Zellkulturplatten gegeben. Diese wurden für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die so beschichteten Zellkulturplatten konnten bis zu ihrer Verwendung maximal zwei Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Vor der Verwendung wurden die Platten auf 37 °C vorgewärmt. Die NPZs wurden zweimal pro Woche passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS, engl. *Hanks balanced salt solution*) pro Kavität einer 6-Well-Platte gewaschen. Durch Zugabe von 0,5 ml Accutase und anschließender Inkubation bei 37 °C für 5 min, wurden die Zellen vom Plattenboden abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Proliferationsmedium gestoppt, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in Proliferationsmedium resuspendiert und die Zellzahl mit dem CASY®-Zellzählssystem bestimmt. Für die Dauerkultur wurden erneut $1,0 \times 10^6$ Zellen pro Kavität einer 6-Well-Platte in 1,5 ml Proliferationsmedium ausgesät.

Kultivierung von neural differenzierten Zellen

Für die Differenzierung in neural differenzierte Zellen (NDZs), wurden die NPZs in geringerer Dichte als für die Dauerkultur und in Differenzierungsmedium ausgesät. Die verwendeten Zellzahlen pro Zellkulturgefäß sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Das Differenzierungsmedium wurde über einen Zeitraum von sechs Wochen zweimal die Woche gewechselt.

Tabelle 3.6: Aussaatparameter neural differenzierter Zellen

Kulturgefäß	Zellzahl	Volumen Medium (ml)
6-Well	$4,0 \times 10^5$	1,5
24-Well auf Deckgläschen	$9,0 \times 10^4$	0,5

Kryokonservierung der verwendeten Zellen

Einige der verwendeten Zelltypen (humane Fibroblasten, HEK293FT-Zellen, iPS-Zellen und neurale Progenitorzellen) wurden kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen passagiert und entsprechend Tabelle 3.7 in Kryokonservierungsmedium in Kryogefäße überführt. Die Gefäße wurden in mit Isopropanol gefüllte Gefriercontainer (Mr. Frosty™) für 24 h bei -80 °C gelagert. Durch das Isopropanol erfolgte ein definiertes Abkühlen der Zellen von -1 °C/min. Anschließend wurden die Kryogefäße zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Tabelle 3.7: Kryokonservierung von Zellen

Zelltyp	Zellzahl	Kryokonservierungsmedium
Humane Fibroblasten	2,0 x 10 ⁶	Basismedium + 10 % DMSO
HEK293FT-Zellen	2,0 x 10 ⁶	Basismedium + 10 % DMSO
iPS-Zellen auf MEFs	50 Koloniestücke	50 % Stammzellmedium + 40 % FBS + 10 % DMSO
iPS-Zellen auf Matrigel	1/5 eines vollen 6-Wells	mTesR1 Kompletmedium + 10 % DMSO
Neurale Progenitorzellen	2,0 x 10 ⁶	Proliferationsmedium + 10 % DMSO

3.3 Generierung von iPS-Zellen aus Fibroblasten

Die Reprogrammierung humaner Fibroblasten zu iPS-Zellen erfolgte durch die Transduktion mit den Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC (Takahashi und Yamanaka 2006). Dazu wurden vier retrovirale Vektoren genutzt, die jeweils eines der humanen Gene OCT4, SOX2, KLF4 oder c-MYC enthielten. Diese wurden von Dr. Philip Seibler (Institut für Neurogenetik, Universität Lübeck, DE) zur Verfügung gestellt. Weiterhin enthielt jeder der vier Vektoren eine Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP, engl. *green fluorescent protein*), was die Titrierung der konzentrierten Viren mittels Durchflusszytometrie ermöglichte.

Vervielfältigung der retrovirenen Vektoren

Für die Vervielfältigung von genetischem Material (Plasmid-DNA) wurden Bakterien genutzt. In einem ersten Schritt, der bakteriellen Transformation, wurde das jeweilige Plasmid zur Vervielfältigung in kompetente *E. coli* Zellen eingebracht. In einem zweiten Schritt, der Plasmidpräparation, wurden die vervielfältigten Plasmide aus den transformierten Bakterienzellen isoliert.

Für die Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* Bakterienzellen wurden 50 µl der *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl der zu transformierenden Plasmid-

DNA (50 ng/ μ l) vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte durch Hitzeschock bei 42 °C für 90 s, wodurch die bakterielle Zellwand kurzzeitig durchlässig wurde. Anschließend wurde die Bakteriensuspension erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 50 μ l der Bakteriensuspension auf einer vorgewärmten 10 cm-Zellkulturschale, welche mit LB Agar und Ampicillin (100 μ g/ml) versetzt wurde, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Da die Plasmide eine Ampicillinresistenz trugen, waren Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, resistent gegen Ampicillin und konnten so selektioniert werden. Für die Vorkulturen wurden drei isolierte Bakterienkolonien gepickt und jeweils in ein Reagenzröhrchen mit LB_{Amp} Medium überführt und für 8 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hauptkulturen in 200 ml LB_{Amp} Medium angesetzt, indem die Vorkulturen vollständig in die Hauptkultur überführt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C wurden die Bakterienzellen bei 6.000 x g und 4 °C für 15 min pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die präparative Isolation der Plasmide aus den transformierten Bakterien wurde mit Hilfe des *Qiagen Plasmid Maxi Prep Kits* (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen lysiert, die genomische DNA gefällt und zentrifugiert. Der entstandene Überstand enthielt die Plasmid-DNA. Diese wurde anschließend zur Aufreinigung über eine mitgelieferte Säule gegeben und eluiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde mittels Isopropanol präzipitiert, zentrifugiert (15.000 x g, 30 min, 4 °C) und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (15.000 x g, 10 min, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde dann bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 μ l Tris EDTA (TE)-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption an einem Mikrovolumen-Spektralphotometer (TECAN Spark) bei 260 nm. Dazu wurden 2 μ l Probenmaterial auf eine NanoQuant™-Platte pipettiert und gemessen. Zudem wurde die Absorption bei 280 nm ermittelt und das Verhältnis von 260 nm/280 nm berechnet. Plasmid-DNA mit einer Reinheit von 260 nm/280 nm < 2,0 wurde verwendet. Die viralen Vektoren wurden bis zur weiteren Verwendung in 50 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert.

Virusgenerierung und Titerbestimmung

Für die Virusgenerierung wurden die Virusvektoren, virale Proteine und Enzyme (das Glykoprotein G des Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV-G) und das Gruppenspezifische Antigen-Polymerase (Gag-Pol)) verwendet (siehe Tabelle A.14). Dafür wurden jeweils 3,0 x 10⁶ HEK293FT-Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen in Basismedium ohne Penicillin/Streptomycin ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte kultiviert und

anschließend transfiziert. Hierzu wurden jeweils 300 µl DMEM mit 20 µl X-tremeGene™ 9 pro 10 cm-Zellkulturschale vermischt, und zunächst für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Gemisch wurden anschließend jeweils 2,5 µg Virusvektor-DNA (OCT4, SOX2, KLF4 bzw. c-MYC), 0,25 µg VSV-G DNA und 2,25 µg Gag-Pol DNA hinzugefügt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die HEK293FT-Zellen gegeben und für 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 7 ml Basismedium ohne Penicillin/Streptomycin ersetzt und für weitere 30 h inkubiert. Die Viren wurden dann, insgesamt 48 h nach der Transfektion, aus dem Überstand geerntet. Hierzu wurde der Überstand der Zellen steril filtriert (Porengröße des Filters 0,45 µm) und in Zentrifugenröhrchen bei -80 °C gelagert.

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Reprogrammierung ist eine optimale Transduktionseffizienz. Diese liegt für OCT4, SOX2 und KLF4 bei 70 bis 80 % und für c-MYC bei 40 bis 50 %. Daher wurde der Titer für jeden Virus separat bestimmt. Da alle Vektoren eine GFP-Sequenz tragen, konnten die transfizierten Zellen anhand der GFP-positiven Zellen und mittels Durchflusszytometrie prozentual bestimmt werden, um anschließend die Transduktionseffizienz zu berechnen. Hierzu wurden zunächst $1,0 \times 10^5$ HEK293FT-Zellen pro Kavität einer 12-Well-Platte in 1 ml Basismedium ausgesät und zur Transduktionssteigerung mit 5 µl/ml Protaminsulfat versetzt. Weiterhin wurden unterschiedliche Volumina des jeweiligen Virus (0,5 ml – 3,5 ml) hinzugegeben, um das Volumen für eine optimale Transduktionseffizienz zu bestimmen. Nach 48 h Inkubationszeit, wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von 200 µl 0,05%igem Trypsin-EDTA pro Kavität und einer Inkubation von 5 min bei 37 °C vereinzelt. Die enzymatische Reaktion wurde mit 1 ml Basismedium abgestoppt, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 200 µl 2%igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 min schüttelnd fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3.000 x g, 5 min) und das Pellet in 500 µl Waschpuffer gelöst. Mit Hilfe des Durchflusszytometers „FACS Calibur“ wurde für jede Virusmenge die Transduktionseffizienz anhand des Anteils der GFP-positiven Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software „CellQuest Pro“.

Reprogrammierung der humanen Fibroblasten zu iPS-Zellen

Für die Reprogrammierung wurden $1,0 \times 10^5$ patientenspezifische Fibroblasten in einer 3,5 cm-Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Basismedium ersetzt und

entsprechend der zuvor durchgeführten Titrierung mit dem entsprechenden Volumen des jeweiligen Virus für die optimale Transduktionseffizienz (OCT4, SOX2 und KLF4 70 bis 80 % bzw. c-MYC 40 bis 50 %) versetzt. Zusätzlich wurden 5 µg/ml Protaminsulfat hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Fibroblasten erneut ausgesät. Hierzu wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA (37 °C, 5 min) von der Zellkulturschale gelöst. Die Reaktion wurde mit 1 ml Basismedium abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Basismedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels CASY®-Zellzählsystem bestimmt und dann auf einer 0,1 % Gelatine-beschichteten 6 cm-Zellkulturschale in Basismedium ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Basismedium durch Stammzellmedium ersetzt und 0,5 mM Valproinsäure, ein Histondeacetylaseinhibitor zur Steigerung der Transduktionseffizienz, hinzugefügt. Die nächsten sieben Tage wurde das Stammzellmedium täglich erneuert und mit 0,5 mM Valproinsäure versetzt. Danach wurde das Medium weiterhin täglich durch frisches Stammzellmedium ohne Valproinsäure ersetzt und die Fibroblasten auf die Entwicklung von Kolonien hin untersucht. Etwa ab Tag 21 nach Transduktion waren Kolonien mit charakteristischer Morphologie sichtbar. Sie zeichnen sich durch eine runde Form mit glatten Rändern aus und konnten anhand des Verlusts des GFP-Signals identifiziert werden. Die Kolonien wurden mechanisch mit Hilfe eines Glashakens von der Zellkulturschale gelöst und auf frische Feederzellen umgesetzt. Etwa 10-20 Kolonien wurden für jede patientenspezifische Fibroblastenzelllinie einzeln expandiert. Jeweils ein Klon wurde für eine detaillierte Charakterisierung verwendet.

3.4 Charakterisierung der iPS-Zellen

Alkalische Phosphatase Färbung

Da die alkalische Phosphatase (AP) typischerweise in undifferenzierten Stammzellen hoch exprimiert ist, wird das Enzym als Stammzellmarker verwendet. Die iPS-Zellkolonien wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem 100%igem Methanol für 10 min bei -20 °C fixiert. Dann wurde das Methanol entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Färbelösung (75 % destilliertes Wasser, 10 % NaCl 1 M, 10 % Tris pH 9,8, 5 % MgCl₂ 1M und 1:50 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium (BCIP/NBT)) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 20 min. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Färbung mit Hilfe eines inversen Nikon Eclipse TS100-Phasenkontrastmikroskops und der Software „NIS-Elements F 2.20“ dokumentiert.

Probenvorbereitung für Karyotypisierung

Um auszuschließen, dass während des Prozesses der Reprogrammierung chromosomale Aberrationen in den iPS-Zellen entstanden sind, wurde für jede generierte Stammzelllinie ein Karyogramm angefertigt. Dazu wurden die Zellen zunächst auf Matrigel kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 60-80 % wurde die mitotische Zellteilung gestoppt, indem die Zellen für 90 min mit Colcemid, einem Spindelgift (0,15 µg/ml in mTeSR1 Komplettmedium), behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase (5 min, 37 °C) abgelöst, wobei die Reaktion mit Basismedium abgestoppt wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 x g, 5 min) wurde das Zellpellet in einer 0.075 M KCl-Lösung aufgenommen, für 30 min bei 37 °C inkubiert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde die Fixativlösung (Methanol:Eisessig 3:1) tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300 x g für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und dieser Ablauf dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in 200 µl Fixativlösung aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Chromosomenanalyse wurde mittels G-Bänderung durch Mitarbeitende des Instituts für Medizinische Genetik der Universitätsmedizin Rostock (Prof. Dr. Jörn Bullerdiek) durchgeführt. Es wurden mindestens 20 Metaphasen pro Linie bestimmt. Zwölf Metaphasen wurden komplett karyotypisiert, mit einer Auflösung von 300-550 Banden pro haploiden Chromosomensatz.

Generierung von *Embryoid Bodies*

Zum Nachweis des Differenzierungspotenzials der iPS-Zellen in alle drei Keimblätter wurden aus den iPS-Zellen sogenannte *Embryoid Bodies* (EBs) gebildet. Dazu wurden die iPS-Zellen zunächst auf Feederzellen kultiviert. Am Tag der Passagierung wurden die iPS-Zellkolonien im Ganzen mittels Glashaken von den Feederzellen gelöst und mit einer extra weiten Pipettenspitze in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Sedimentieren der Kolonien, wurde der Überstand abgesaugt, die Kolonien in 5 ml EB-Medium aufgenommen und in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte mit geringer Anheftungsoberfläche überführt. Es folgte eine Inkubationszeit von fünf Tagen, wobei nach drei Tagen ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. In dieser Zeit bildeten sich dreidimensionale Aggregate, die *Embryoid Bodies*, welche anschließend auf mit 0,1 % Gelatine-beschichtete Deckgläschen ausgesät wurden. Nach weiteren neun Tagen Inkubationszeit, wobei an jedem dritten Tag ein Mediumwechsel erfolgte, hatten sich die EBs angehaftet und ausgebreitet. Abschließend wurden die EBs mit PBS^{+/+} (PBS mit 0,5 mM CaCl₂ und 0,9 mM MgCl₂) gewaschen und für 15 min mit 4%igem PFA fixiert.

Nach einem Waschschrift mit PBS^{+/+} wurden die Zellen bis zur Färbung von spezifischen Differenzierungsmarkern (siehe 3.7) bei 4 °C in 0,02 % Natriumazid/PBS gelagert.

Immunzytochemische Färbungen von iPS-Zellen und EBs

Fixierte iPS-Zellen bzw. EBs wurden mit 500 µl Waschpuffer (20 mM Tris-HCl (pH 8,5); 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween 20 in PBS) gewaschen und dann für 45 min in 300 µl Block-Lösung (10 % normales Ziegenserum, 0,1 % Triton X-100 in 1 % bovines Serumalbumin (BSA)/PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 500 µl Waschpuffer wurden die Primärantikörper in der Antikörper-Lösung (0,1 % Triton X-100 in 1 % BSA/PBS) verdünnt, auf die Zellen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Eine Auflistung der verwendeten Antikörper mit der entsprechenden Verdünnung ist in Tabelle A.10 gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf den Deckgläschen dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Sekundärantikörper (Tabelle A.11) hinzugegeben und lichtgeschützt für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen und der DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von 250 ng/ml hinzugegeben und lichtgeschützt für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in Fluoromount-G[®] auf Objektträgern eingedeckt. Die Analyse der Färbungen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Keyence Biozero 8000 und der dazugehörigen Software „BZ observation application“.

Probenvorbereitung für Short Tandem Repeat Analyse

Die Short Tandem Repeat (STR) Analyse wurde von der Firma American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, US) durchgeführt. Dazu wurde das *FTA Sample Collection Kit For Human Cell Authentication Service* genutzt. Vorbereitend wurden jeweils $1,0 \times 10^6$ Fibroblasten bzw. iPS-Zellen enzymatisch geerntet und nach Herstellerangaben tropfenweise auf die Whatman[®] FTA[®] Karten pipettiert. Pro Probe wurden jeweils 18 Loci durch ATCC analysiert (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, AMEL, TPOX und CSF1PO).

Durchflusszytometrie

Für den quantitativen Nachweis Pluripotenz-assoziiierter Proteine wurden durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe des Geräts „FACS Calibur“ und der Software „CellQuest Pro“ durchgeführt. Zunächst wurden die iPS-Zellen enzymatisch von den Zellkulturplatten gelöst und jeweils $1,0 \times 10^6$ Zellen/Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Nachweis der intrazellulären Transkriptionsfaktoren OCT4 und NANOG

wurden die Zellen mit Hilfe des *True-Nuclear Transcription Factor Buffer Sets* vorbereitet. Die Zellen wurden für 1 h in 1 ml Fixierlösung inkubiert, anschließend mit 1 ml des im Set vorhandenen Permeabilisierungspuffers gewaschen und schließlich in 100 µl des Permeabilisierungspuffers aufgenommen. Nach Zugabe des jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Antikörpers in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle A.12), wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend in 300 µl FACS Puffer aufgenommen. Zum Nachweis der extrazellulären Marker (SSEA4, Tra-1-60 und Tra-1-81) wurden die Zellen in 1 ml Block-Puffer für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS Puffer gewaschen und dann in 100 µl FACS Puffer aufgenommen. Nach Zugabe des Fluorochrom-konjugierten Antikörpers (siehe Tabelle A.12), wurden die Zellen für 90 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend in 300 µl FACS Puffer aufgenommen. Jeweils 50.000 Zellen/Probe wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen, wobei jeweils eine ungefärbte Negativkontrolle mitgeführt wurde. Anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes wurden Ereignisse mit sehr geringer Größe und Granularität als Zelldebris identifiziert und in der Analyse nicht berücksichtigt. Die Analyse und Darstellung erfolgte mit der Software „FCSalyzer“. Der Anteil positiv gefärbter Zellen wurde als prozentualer Wert dargestellt.

Semiquantitative RT-PCR

Um eine Aussage zu der Expression der Transgene bzw. endogener Pluripotenz-assoziiertes Gene treffen zu können, wurde die Methode der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) angewandt. Zuvor wurde die RNA aus den iPS-Zellen bzw. den dazugehörigen Fibroblasten mit Hilfe des *Quick-RNA™ Miniprep Kits* (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Herstellung der RT-PCR Proben wurde das *One-Step Reverse Transkriptase PCR Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, DE) nach Anweisung des Herstellers genutzt. Pro PCR-Ansatz wurde ein Mastermix von 40 µl vorgelegt: 13 µl RNase-freies Wasser, 10 µl 5x Puffer, 2 µl dNTPs, 10 µl Q-solution, 3 µl Primermix (Forward und Reverse) und 2 µl Enzymmix. Zu diesem Mastermix wurden jeweils 10 µl RNA (50 ng in RNase-freiem Wasser) hinzugefügt. Die verwendeten Primer mit den dazugehörigen Sequenzen und der jeweiligen Produktgröße sind in Tabelle A.13 aufgeführt. Die Arbeitslösung aller Primer hatte eine Konzentration von 0,6 µM. Die RT-PCR wurde mit dem Eppendorf MasterCycler Gradient Thermal Cycler 5331 durchgeführt. Die Zykluszahl und die Temperaturen für die Primerhybridisierung wurden für jedes Primerpaar optimiert und sind ebenfalls in Tabelle A.13 aufgeführt.

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

1. Reverse Transkription bei 50 °C für 30 min
2. Initiale Denaturierung der DNA bei 95 °C für 15 min
3. 30-40 Zyklen, pro Zyklus
 - 30 s bei 94 °C für die Denaturierung,
 - 30 s bei 55-66 °C für die Hybridisierung des jeweiligen Primerpaares und
 - 60 s bei 72 °C für die Elongation
4. Finale Elongation bei 72 °C für 10 min
5. Kühlen auf 4 °C bis zur Probenentnahme

Die PCR-Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für die DNA-Gelelektrophorese wurden 2,5%ige Agarose-Gele (bzw. 1,5% für die Auftrennung von c-MYC und KLF4) verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle in 0,5x TBE-Puffer gelöst. Zu der geschmolzenen Agarose wurde SYBR™ Safe (Verdünnung 1:10.000), ein DNA interagierender Cyanin-Farbstoff, zugegeben und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. So können die DNA-Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Das polymerisierte Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (0,5x TBE) übertragen. Jeweils 5 µl der PCR-Produkte wurden mit 3 µl 6x Ladepuffer und 10 µl Wasser gemischt. Das Gemisch wurde anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Parallel zu den Proben wurde ein Größenstandard (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Leiter) aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 V für 45 min angelegt. Mit Hilfe des UV-Transilluminators wurden die DNA-Banden visualisiert und die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software „Argus X1“.

Probenvorbereitung für gezielte Sequenzierung

Für die gezielte Sequenzierung von *NPCI* in den generierten iPS-Zelllinien bzw. in den Ursprungszellen, den Fibroblasten, wurde zunächst genomische DNA aus den Zellen isoliert. Dazu wurde das *Quick-DNA™ Miniprep Kit* (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE) nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzierung wurde durch Mitarbeitende der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universitätsmedizin Rostock (PD Dr. Hugo Murua Escobar) unter Verwendung von 10 ng genomischer DNA durchgeführt.

3.5 Differenzierung der iPS-Zellen in neural differenzierte Zellen

Das neurale Zellmodell, bestehend aus einer Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen, wurde aus den iPS-Zellen über den Zwischenschritt der neuralen Progenitorzellen (NPZs) generiert. Dazu wurden die iPS-Zellen zwei Wochen auf Matrigel kultiviert. Dies führte zu einer spontanen Dichte-induzierten Differenzierung, bei der sich neurale Rosetten bildeten, welche NPZs enthalten. Über den neuralen Oberflächenmarker PSA-NCAM (engl. *polysialic acid neural cell adhesion molecule*) wurden diese Zellen isoliert. Dazu wurden die undifferenzierten Stammzellen mit einem Glashaken mechanisch entfernt, während die neuralen Rosetten mit 1 ml HBSS gewaschen und anschließend mit 1 ml Accutase vereinzelt wurden. Die enzymatische Reaktion wurde nach 10 min mit Proliferationsmedium gestoppt und die Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Proliferationsmedium gelöst und die Zellzahl mit Hilfe des CASY-Zellzählgeräts bestimmt. Die Aufreinigung der NPZs wurde mit Hilfe des *Anti-PSA-NCAM MicroBead Kits* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass anti-PSA-NCAM Antikörper, welche an magnetische Beads gekoppelt sind, an diesen Oberflächenmarker auf den NPZs binden. Die Zellsuspension wird anschließend durch eine magnetische Säule gegeben, in der die NPZs hängen bleiben und später eluiert werden können. Im Einzelnen wurden die Zellen dafür zunächst in 60 µl MACS Puffer gelöst. Daraufhin wurden 20 µl FcR Blockierungs-Reagenz hinzugefügt und die Zellsuspension für 10 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden 20 µl der anti-PSA-NCAM MicroBeads hinzugefügt und es erfolgte eine erneute Inkubation für 15 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Puffer gewaschen, für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und in 500 µl Puffer resuspendiert. Die magnetische Separation wurde vorbereitet, indem die MS-Säule in den MACS Multi Stand eingesetzt und mit 500 µl Puffer equilibriert wurde. Dann wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Während die Zellsuspension die Säule passierte, wurden die PSA-NCAM⁺ Zellen festgehalten. Die unmarkierten, PSA-NCAM⁻ Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit 500 µl Puffer ausgewaschen. Um die PSA-NCAM⁺ Zellen aufzufangen, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml Proliferationsmedium und dem zügigen Einführen des Kolbens in die Säule gelöst und aufgefangen. Abschließend wurde die Zellzahl der PSA-NCAM⁺-Fraktion bestimmt und entsprechend der Standardkulturbedingungen der NPZs zu je 1,0 x 10⁶ Zellen pro Kavität einer 6-Well-Platte in Proliferationsmedium ausgesät. Die PSA-NCAM⁺ NPZs wurden expandiert und kryokonserviert. Die Differenzierung in neural

differenzierte Zellen erfolgte über einen Zeitraum von sechs Wochen durch Aussaat der NPZs in geringer Dichte von $0,4 \times 10^5$ Zellen/cm².

3.6 Differenzierung der iPS-Zellen in Hepatozyten-ähnliche Zellen

Ebenso wie für das neurale Zellmodell, sind auch für das hepatische Zellmodell die auf Matrigel kultivierten iPS-Zellen der Ausgangspunkt für die Differenzierung. Allerdings erfolgt die Differenzierung ohne die Möglichkeit des Einfrierens hepatischer Progenitorzellen, sondern basiert auf drei Schritten: der Induktion des Definitiven Endoderms, der hepatischen Spezifizierung und der hepatischen Reifung. Einen Tag vor Passagieren der iPS-Zellen wurden sie vereinzelt und für die Differenzierung in Hepatozyten-ähnliche Zellen (HLZs) ausgesät. Dazu wurden die iPS-Zellen zunächst mit 1 ml DMEM-F12 gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 ml *Gentle Cell Dissociation* Reagenz und einer Inkubation für 7 min bei 37 °C vereinzelt. Die Reaktion wurde mit 1 ml mTeSR1 Komplettmedium abgestoppt und die iPS-Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (120 x g, 3 min) wurde das Zellpellet in 1 ml mTeSR1 Komplettmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe des CASY-Zellzählsystems bestimmt. Abschließend wurden die iPS-Zellen entsprechend Tabelle 3.8 auf Matrigel-beschichtete Zellkulturplatten in mTeSR1 Komplettmedium ausgesät und für eine bessere Anhaftung und die Ausbildung eines Zellnetzes mit 10 µM ROCK-Inhibitor (Y-27632) versetzt. Die Platten wurden über Nacht im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

Tabelle 3.8: Aussaatparameter für die Differenzierung in HLZs

Kulturgefäß	Zellzahl	Volumen Medium (ml)
6-Well	$4,0 \times 10^5$	1,5
12-Well	$2,0 \times 10^5$	1,0
24-Well auf Deckgläschen	$9,0 \times 10^4$	0,5

Am nächsten Tag, Tag 1, hatten sich die iPS-Zellen netzartig ausgebreitet und wiesen eine Konfluenz von etwa 40 % auf. Daraufhin wurde das Definitive Endoderm induziert, indem das Medium durch Definitives Endoderm Induktionsmedium ersetzt wurde. An den darauffolgenden zwei Tagen wurde das Medium jeweils durch frisches Definitives Endoderm Induktionsmedium ersetzt. In dieser Zeit, entstanden die Zellen des Definitiven Endoderms, welche sich durch einen dreieckigen Zellkörper auszeichnen und den Platz zwischen den ausgesäten iPS-Zellen füllten. An Tag 4 wurde die hepatische Spezifizierung eingeleitet, indem

das Medium vollständig durch das KSR/DMSO Medium ersetzt wurde. Das Medium wurde an den darauffolgenden vier Tagen täglich erneuert. An Tag 10 wurde das Medium durch Hepatozytenmedium ersetzt und somit die hepatische Reifung begonnen. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. An Tag 17 wurden die reifen Hepatozyten-ähnlichen Zellen für nachfolgende Versuche genutzt.

3.7 Immunzytochemische Färbungen

Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, mit 500 µl PBS^{+/+} gewaschen und anschließend mit 4%igem PFA (10 min, Raumtemperatur) fixiert. Danach wurden die Zellen nochmals mit 500 µl PBS^{+/+} gewaschen und gegebenenfalls bis zur weiteren Verwendung für die immunzytochemischen Färbungen bei 4 °C in 750 µl 0,02 % Natriumazid pro Deckgläschen gelagert.

Für die Färbung wurden die fixierten Zellen mit 500 µl PBS^{+/+} gewaschen und anschließend mit 0,1 % Triton X-100 (in 1 % BSA/PBS) für 5 min auf Eis permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen in 1 % BSA/PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Primärantikörper wurden in 1 % BSA verdünnt und nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS^{+/+} über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Sekundärantikörper in 1 % BSA verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Die für die immunzytochemischen Färbungen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die verwendeten Verdünnungen sind im Anhang angegeben (Tabelle A.10). Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS^{+/+} gewaschen und dann für 5 min mit DAPI inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Abschließend wurden die Zellen mit PBS^{+/+} gewaschen und in Fluoromount-G[®] eingedeckt. Die Dokumentation der Färbungen erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Keyence Biozero 8000 und der dazugehörigen Software „BZ observation application“.

3.8 Filipinfärbung

Filipin ist ein fluoreszierendes, polyenes Makrolid-Antibiotikum, das freies Cholesterol in Zellen färbt. Es wurde zunächst eine Stammlösung angefertigt, indem das Filipin in DMSO gelöst wurde (50 mg/ml). Die Stammlösung wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die auf Deckgläsern kultivierten Zellen wurden mit 4 % PFA in PBS bei pH 7,4 für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und mit 300 µl der Filipinfärbelösung (0,1 mg/ml Filipin; 1:100 in DMSO und 1:5 in PBS^{+/+}) für 45 min im Dunkeln gefärbt. Nach dreimaligem

Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Deckgläser mit Fluoromount-G[®] auf Objektträgern eingedeckt. Die gefärbten Zellen wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und zeitnah mikroskopiert. Die visuelle Begutachtung der Färbungen sowie die Aufnahmen der Fluoreszenzbilder erfolgte mit einem Laser-Scanning-Mikroskop 900 (LSM 900, Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE). Das LSM 900 war mit einem Lasermodul URGB (405 nm Diodenlaser), einem Plan-APOCHROMAT 63x/1,4 Öl Objektiv und einem GaAsP-PMT Detektor ausgestattet. Die Bilder wurden mit der ZEN Imaging Software aufgenommen. Es wurden jeweils zehn zufällig ausgewählte Bildausschnitte pro Deckgläschen dokumentiert. Die quantitative Analyse der Fluoreszenzbilder wurde mit der Software „ImageJ“ in Anlehnung an Pipalia et al. unter Berechnung des Lysosomen-ähnlichen Speicherorganellen (LSO, engl. *lysosome-like storage organelles*)-Kompartiment-Verhältnisses durchgeführt (Pipalia et al. 2006). Das LSO-Kompartiment-Verhältnis setzt die Akkumulation des freien Cholesterols ins Verhältnis zu der Gesamtfläche der Zellen. Dazu wurden zwei verschiedene Schwellenwerte auf die Filipinbilder angewandt. Der untere Schwellenwert ist durch die Zellgrenzen gekennzeichnet. Das Fluoreszenzsignal über diesem Schwellenwert entspricht dem Gehalt an freiem Cholesterol in diesem Bereich. Der zweite, obere Schwellenwert wurde um die stark fluoreszierenden, zumeist perinukleären Regionen gesetzt, die den LSOs der Zellen entsprechen. Das LSO-Kompartiment-Verhältnis ergibt sich aus dem Quotienten der Filipinintensität über dem oberen Schwellenwert und der Pixelanzahl über dem unteren Schwellenwert (Formel 1).

$$\text{LSO – Kompartiment – Verhältnis} = \frac{\text{Filipinintensität über dem oberen Schwellenwert}}{\text{Pixelanzahl über dem unteren Schwellenwert}}$$

Formel 1: Berechnung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses

3.9 Western Blot-Analyse

Zellernte und Probenvorbereitung für Western Blot

Die Ernte der Zellen erfolgte mittels RIPA-Puffer (siehe Tabelle A.7), wodurch die Zellen zunächst lysiert wurden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 500 µl PBS pro Kavität gewaschen und anschließend mit 300 µl RIPA-Puffer aufgeschlossen (20 min, schüttelnd auf Eis). Das Zelllysat wurde dann mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Smith et al. mit Hilfe des *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* nach Herstellerangaben (Smith et al. 1985). Zunächst wurden die Zellysate in einem Verhältnis von 1:3 mit Reinstwasser verdünnt und jeweils 10 µl der Verdünnungen in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Weiterhin wurde durch Verdünnen einer BCA-Stammlösung (2 mg/ml) mit Wasser eine Eichreihe hergestellt und vorgelegt: 0,0 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,8 mg/ml und 1 mg/ml. Anschließend wurden 200 µl BCA Reagenz (Komponente A und B 50:1) pro 96-Well hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 570 nm mit Hilfe des Plattenlesegeräts Spark (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) und der Software „SparkControl™“ (Tecan Group Ltd., Männedorf, CHE) gemessen und der Proteingehalt berechnet. Im Anschluss wurden die Zellysate zunächst mit autoklaviertem, destilliertem Wasser auf 20 µg/20 µl verdünnt. Dann wurde 5x Laemmli Puffer (siehe Tabelle A.7) in einem Verhältnis von 5:1 hinzugefügt. Die Lysate wurden für 5 min bei 37 °C inkubiert.

Endoglykosidase H Verdau

Endoglykosidase H (Endo H) ist ein Enzym, das unreife N-verknüpfte Glykane von Proteinen im ER entfernt. Die Analyse dieser posttranslationalen Modifikationen am NPC1-Protein ermöglicht es eine Aussage über die intrazelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins zu treffen. Der Verdau des Gesamtzellysats erfolgte mit dem Endo H-Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, DE). Dazu wurden 20 µg Protein mit Reinstwasser auf 10 µl Gesamtvolumen verdünnt und mit 1 µl Glykoprotein-Denaturierungspuffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte innerhalb von 10 min bei 37 °C. Anschließend wurden zu jeder Probe 2 µl Glykopuffer, 7 µl Reinstwasser und 1 µl Endo H hinzugegeben. Die Reaktionsansätze wurden dann für 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden 5 µl 5x Laemmli-Puffer hinzugefügt. Die elektrophoretische Auftrennung, der Proteintransfer auf eine Membran und der spezifische immunologische Nachweis des NPC1-Proteins erfolgte ebenso wie für die unverdauten Gesamtzellysate auch und wird im Folgenden beschrieben.

SDS-Gelelektrophorese

Um die in den Gesamtzellysaten enthaltenen Proteine anhand ihrer Molekülmasse aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden Criterion™ TGX Stain-Free™ Gele (4-15 % TRIS-HCl, 18 Wells, 30 µl Taschengröße) der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH verwendet, welche in den Elektrophoresekammern Criterion™ Cell eingesetzt wurden. Als Laufpuffer diente 1x SDS-Elektrophoresepuffer (siehe

Tabelle A.7). Jeweils 25 µl der zuvor vorbereiteten Proben wurden in die Taschen der Gele pipettiert. Als Laufkontrolle wurden 2 µl Proteinmarker (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, 2-250 kDa) in eine Tasche gegeben. Mit Hilfe des PowerPac (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) und dem Anlegen einer Spannung (100 V, 10 min; 300 V, 25 min) erfolgte die Auftrennung der Proteine. Die Beweglichkeit der Proteine ist dabei proportional zum Logarithmus der Molekülmasse.

Proteintransfer

Der Transfer der aufgetrennten Proteinbanden auf die Trägermembran, eine Nitrocellulosemembran, erfolgte mit Hilfe des *semidry* Blotverfahrens. Dazu wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) in Kombination mit den Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) genutzt. Hierzu wurden nacheinander das Gel-*Blotting*-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das SDS-Gel und ein weiteres Gel-*Blotting*-Papier auf die Anode gelegt. Anschließend wurde die Kammer mit der Kathode verschlossen und ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 2,5 A angelegt. Bei 25 V und innerhalb von 7 min wanderten die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode und wurden so auf der Nitrocellulose-Membran fixiert.

Nachweis der Proteine durch Immundetektion

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Transfer für 1 h schüttelnd in 5 % Magermilchpulver in 1x TBS-Tween 20 (TBST) (siehe Tabelle A.7) inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen NPC1 in 3 % Magermilchpulver in TBST bei 4 °C über Nacht (siehe Tabelle A.10). Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min wurde die Membran für 1 h mit einem Primärantikörper gegen β -Aktin inkubiert (siehe Tabelle A.10). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min, wurde die Membran mit den Sekundärantikörpern (siehe Tabelle A.11) in 3 % Magermilchpulver in TBST inkubiert (1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln). Es folgten wiederum drei Waschschrte mit TBST und einer mit TBS für jeweils 5 min. Die Membran wurde anschließend auf Whatman Paper zum Trocknen gelegt. Die Membranen wurden mit Hilfe der Software „Odyssey Infrared Imaging Scanner Systems“ (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US) visualisiert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit der Software „Odyssey® Infrared Imaging System-Application“ (Version 1.2.15, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US).

3.10 Kolokalisationsanalysen

Die visuelle Begutachtung und Aufnahme der gefärbten Zellen für die Kolokalisationsanalysen erfolgte am LSM 900 mit Hilfe der Software „ZEN imaging“. Jeweils zehn zufällig ausgewählte Bildausschnitte wurden pro Deckgläschen, also pro unabhängigem Experiment, aufgenommen. Die Auswertung der Kolokalisation erfolgte mit Hilfe des Programms „ImageJ“ und der Applikation JaCOP (*JustanotherColocalizationPlugin*). Dafür wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC, engl. *Pearson's Correlation Coefficient*) bestimmt, welcher die Stärke einer linearen Beziehung zwischen zwei Fluoreszenzintensitäten aus der Überlagerung zweier Bilder angibt. Der PCC kann Werte zwischen -1 (100 % inverse Kolokalisation) und 1 (100 % positive Kolokalisation) annehmen. Werte nahe Null spiegeln Verteilungen von Proben wider, die nicht miteinander korreliert sind. Der PCC lässt sich mathematisch wie folgt formulieren (Dunn et al. 2011):

$$\text{PCC} = \frac{\sum_i (R_i - \bar{R}) \times (G_i - \bar{G})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \bar{R})^2 \times \sum_i (G_i - \bar{G})^2}}$$

Formel 2: Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten

wobei R_i und G_i die Intensitätswerte des roten bzw. grünen Kanals von Pixel i ; und \bar{R} und \bar{G} die arithmetischen Mittel aller Intensitätswerte des roten bzw. grünen Kanals im gesamten Bild bezeichnen.

Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde GraphPad Prism 8.0.1 verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, engl. *standard deviation*) angegeben und stammen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um die Datensätze auf Normalverteilung zu prüfen. Für die statistische Analyse von zwei Mittelwerten wurde der ungepaarte Student's t-Test verwendet. Für die statistische Analyse von mehr als zwei Mittelwerten wurde die einfaktorielle ANOVA-Analyse durchgeführt. Zeigten sich signifikante Unterschiede, so wurde der Dunnett Post-hoc-Test als paarweiser multipler Vergleichstest angewendet. In Fällen, in denen keine Normalverteilung des Datensatzes vorlag, wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test, angewandt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für $p \leq 0,05$ angenommen. Die Signifikanzniveaus werden wie folgt angegeben: $p \leq 0,05 = */\#;$ $p \leq 0,01 = **/\# \#;$ $p \leq 0,001 = ***/\# \# \#.$

4 Ergebnisse

4.1 Generierung und Charakterisierung neuer iPS-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzlich zu den bereits bestehenden iPS-Zelllinien der Arbeitsgruppe (Trilck et al. 2013; Peter et al. 2017b; Völkner et al. 2019) zwei weitere iPS-Zelllinien, eine weibliche Kontrollzelllinie (Kon B) und eine NPC1-defiziente Zelllinie einer Patientin mit der kombiniert heterozygoten NPC1-Mutation V1023Sfs*15/G992R (Mut 4, vgl. Tabelle 3.1), generiert und im Anschluss im Detail charakterisiert (Völkner et al. 2020b). Die Generierung der iPS-Zellen erfolgte durch retrovirale Transduktion patientenspezifischer Fibroblasten mit den Transkriptionsfaktoren OCT4, SOX2, KLF4 und c-MYC (Takahashi und Yamanaka 2006). Etwa ein bis zwei Wochen nach der Transduktion veränderte sich die Morphologie der Fibroblasten und statt der langgestreckten Zellkörper (Abbildung 7A) waren zunehmend kleinere, abgerundete Zellen sichtbar (Abbildung 7B, Pfeile). Diese formierten sich im weiteren Verlauf zu größeren Kolonien mit deutlich abgegrenztem Kolonierand (Abbildung 7C, *), bestehend aus dicht gepackten Zellen mit hohem Kern-Zytoplasma-Verhältnis, welche kein GFP mehr exprimierten (Abbildung 7D, *). Diese wurden einzeln zunächst auf Feederzellen (Abbildung 7E, Dreiecke) und später auf Matrigel expandiert (Abbildung 7F).

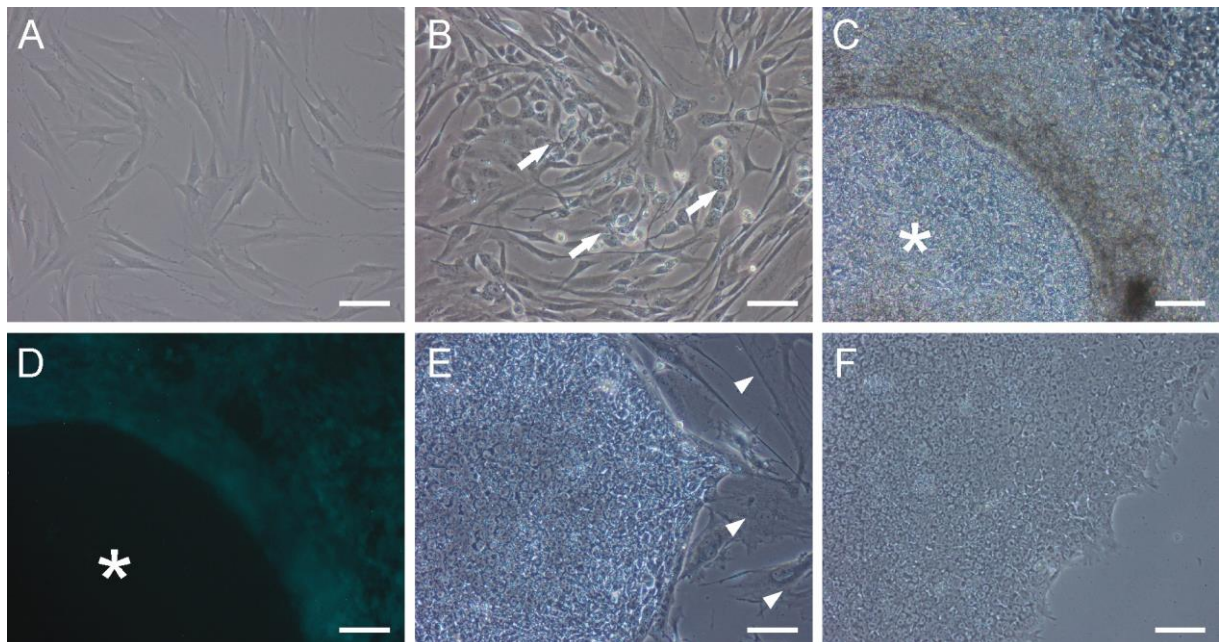


Abbildung 7: Retrovirale Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS-Zellen. (A) Fibroblasten vor bzw. (B) etwa eine Woche nach der Transduktion mit veränderter Morphologie in Form von kompakteren, runden Zellkörpern (Pfeile). (C) Runde iPS-Zellkolonie (*) 20 Tage nach Transduktion, umgeben von nicht bzw. unvollständig reprogrammierten Fibroblasten. (D) Vollständig reprogrammierte iPS-Zellkolonie (*) exprimiert kein GFP. Die iPS-Zellkolonien wurden zunächst auf (E) Feederzellen (Dreiecke) und später auf (F) Matrigel kultiviert. Maßstab 150 µm.

Nachweis der Pluripotenz

Nach der Etablierungsphase zu stabilen iPS-Zelllinien erfolgte zunächst die Analyse der Pluripotenz. Dazu wurde eine Färbung zum qualitativen Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP) durchgeführt. Die charakteristische dunkelviolette Färbung der iPS-Zellkolonien zeigt die vorhandene AP-Aktivität, während die umliegenden differenzierten Feederzellen farblos erscheinen (Abbildung 8, Pfeile). Des Weiteren wurden mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen Pluripotenz-assoziierte Proteine analysiert. Dazu gehören unter anderem die Transkriptionsfaktoren OCT4 (engl. *octamer binding transcription factor 4*, POU5F1) und NANOG, sowie das embryonalspezifische Stufenantigen 4 (SSEA4, engl. *stage specific embryonic antigen 4*) und die Keratansulfat-Proteoglykane TRA-1-60 und TRA-1-81 (engl. *tumor rejection antigen*), welche auf der Oberfläche von pluripotenten Stammzellen exprimiert werden. Wie anhand der immunzytochemischen Färbungen zu sehen ist, waren die Zellen beider iPS-Zelllinien positiv für die getesteten Pluripotenzmarker NANOG und SSEA4 (Abbildung 8) sowie OCT4, TRA-1-60 und TRA-1-81 (Anhang, Abbildung 38). Die gefärbten Transkriptionsfaktoren OCT4 und NANOG sind im Zellkern lokalisiert, während die Oberflächenmarker SSEA4, TRA-1-60 und TRA-1-81 membranständig detektiert wurden (Abbildung 8 bzw. Abbildung 38).

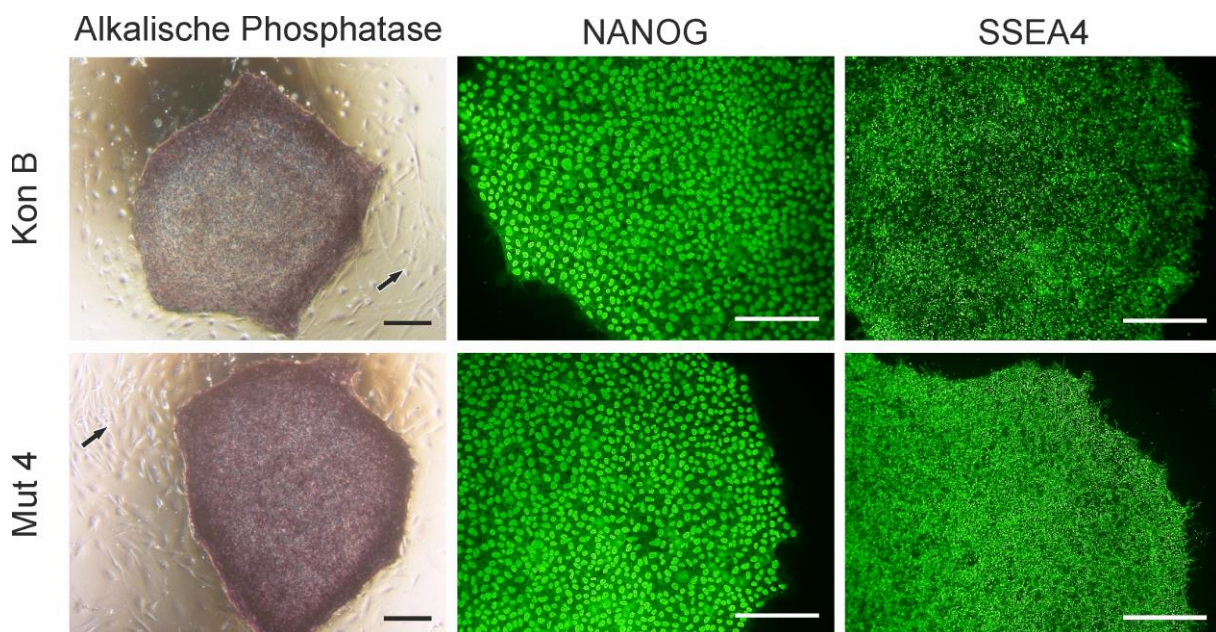


Abbildung 8: Nachweis der Pluripotenzmarker in den etablierten iPS-Zelllinien. Die iPS-Zellkolonien weisen eine dunkelviolette Färbung auf, welche die AP-Aktivität in undifferenzierten Stammzellen nachweist. Im Vergleich dazu wirken die umgebenden Feederzellen farblos (Pfeile). Zu sehen ist außerdem der immunzytochemische Nachweis der Pluripotenzmarker NANOG und SSEA4. Maßstab 200 μm .

Für die quantitative Analyse derselben Pluripotenz-assoziierten Proteine wurde die Durchflusszytometrie unter Verwendung der entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Primärantikörper angewandt. Die Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Histogramme eines intrazellulären (NANOG) und eines extrazellulären Pluripotenzmarkers (SSEA4) für jede iPS-Zelllinie. Die Darstellung der Pluripotenzmarker OCT4, TRA-1-60 und TRA-1-81 ist dem Anhang zu entnehmen (Abbildung 39). Die Quantifizierung ergab, dass nahezu alle Zellen beider iPS-Zelllinien positiv für die jeweiligen Pluripotenzmarker waren (Kon B: NANOG 97,0 %; OCT4 97,7 %; SSEA4 98,4 %, TRA-1-60 96,6 %; TRA-1-81 94,7 % und Mut 4: NANOG 98,9 %; OCT4 98,0 %, SSEA4 97,7 %, TRA-1-60 97,0 %, TRA-1-81 95,7 %).

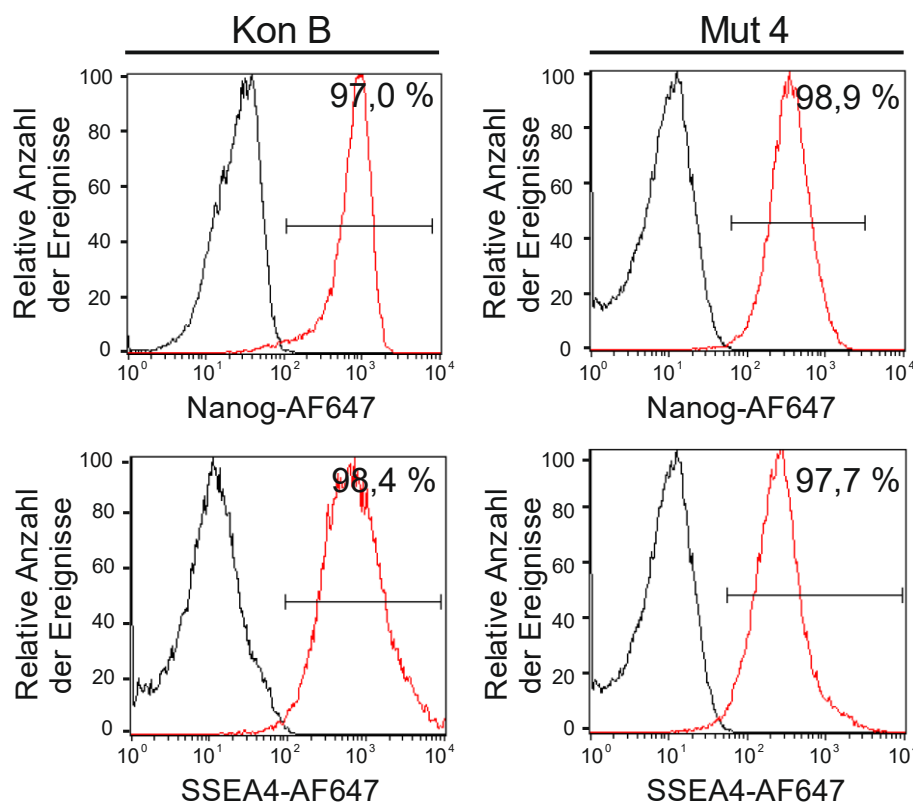


Abbildung 9: Nachweis Pluripotenz-assoziiierter Proteine mittels Durchflusszytometrie. Die repräsentativen Histogramme zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Pluripotenz-assoziierten Proteine NANOG bzw. SSEA4 in den iPS-Zelllinien Kon B und Mut 4 gegenüber der relativen Anzahl der Ereignisse. Die ungefärbte Negativkontrolle ist in schwarz dargestellt; in rot die Rechtsverschiebung des Signals nach Färbung mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Primärantikörpern. Die Zahlen in den Histogrammen bezeichnen den prozentualen Anteil positiver Zellen.

Auf Genebene erfolgte der Expressionsnachweis endogener Pluripotenz-assoziiierter Gene über die semiquantitative RT-PCR. Analysiert wurden die folgenden Markergene: *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *hTERT*, *ZFP296*, *FGF4* und *ESG1*. Die Primer wurden so entworfen, dass sie spezifisch nur die endogenen Transkripte detektieren. Wie in Abbildung 10 zu sehen

ist, konnte in beiden iPS-Zelllinien die Expression aller untersuchten endogenen Pluripotenzmarker nachgewiesen werden, während die Ursprungszellen, die Fibroblasten, zumeist negativ waren. Eine Ausnahme bilden die Gene *KLF4*, *c-MYC* und *ZFP296*, von denen vor allem für *KLF4* und *c-MYC* eine starke endogene Expression in den Fibroblasten nachgewiesen wurde. Dies wurde vielfach auch in anderen Studien gezeigt (Takahashi et al. 2007; Estève et al. 2019) und spricht dafür, dass diese Marker nicht spezifisch sind.

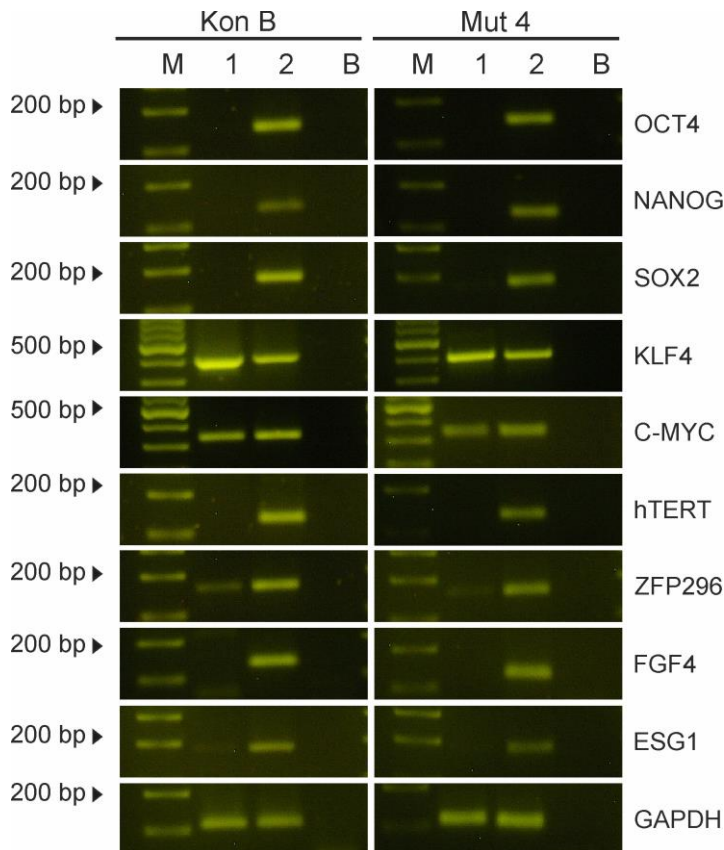


Abbildung 10: Nachweis Pluripotenz-assoziiertes Gene mittels RT-PCR.

Die Gegenüberstellung der Expression der Pluripotenz-assoziierten Gene in den Fibroblasten (1) und den korrespondierenden iPS-Zellen (2) zeigt, dass die iPS-Zellen alle getesteten Pluripotenzmarker exprimierten, wobei die Fibroblasten zumeist negativ waren. Als Referenz diente das *housekeeping*-Gen *GAPDH*. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Reaktionsansatz ohne RNA mitgeführt (BLANK, B). Anhand des Markers (M) kann die Größe der amplifizierten PCR-Produkte bestimmt werden (vgl. Tabelle A.13).

Analyse der Transgenexpression mittels RT-PCR

Ein weiteres Merkmal vollständig reprogrammierter iPS-Zellen ist die Inaktivierung der Transgene nachdem die endogenen Pluripotenz-assoziierten Gene aktiviert wurden (siehe Abbildung 10), ein Prozess der auch als „*gene silencing*“ bekannt ist. In beiden iPS-Zelllinien der Passage 24 wurden die Transkripte der transgenen Reprogrammierungsfaktoren *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *c-MYC* mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht, wobei keine transgenen Reprogrammierungsfaktoren mehr nachgewiesen werden konnten, was für vollständig reprogrammierte iPS-Zellen spricht (Abbildung 11).

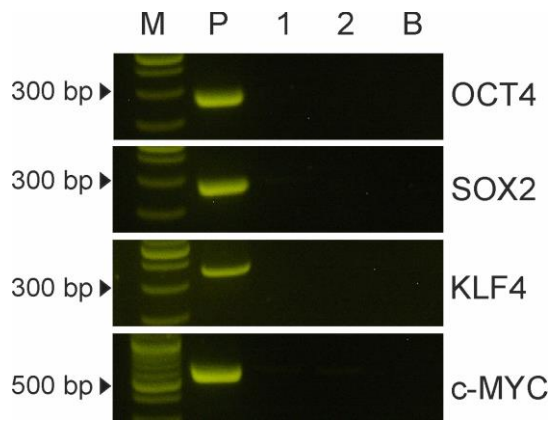


Abbildung 11: Expressionsanalyse der Transgene mittels RT-PCR. Die iPS-Zellen beider Zelllinien, Mut 4 (1) und Kon B (2), waren negativ für die Expression der Transgene *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* und *c-MYC*. Als Positivkontrolle diente jeweils das Plasmid (P, 10 pg). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Reaktionsansatz ohne RNA mitgeführt (BLANK, B). Anhand des Markers (M) kann die Größe der amplifizierten PCR-Produkte bestimmt werden (vgl. Tabelle A.13).

Bestimmung des *in vitro* Differenzierungspotenzials der iPS-Zellen

Pluripotenz ist definiert als die Fähigkeit in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) zu differenzieren. Diese Eigenschaft wurde *in vitro* über die Bildung von *Embryoid bodies* nachgewiesen. Für beide iPS-Zelllinien wurde mittels Immunfluoreszenz die Expression spezifischer Differenzierungsmarker für alle drei Keimblätter nachgewiesen. Die EBs zeigten eine positive Immunreaktivität auf die Antikörper für α -Fetoprotein (Endoderm), Muskelaktin (Mesoderm) bzw. Nestin (Ektoderm) (Abbildung 12), was ihr Differenzierungspotenzial in Zellen aller drei Keimblätter zeigt.

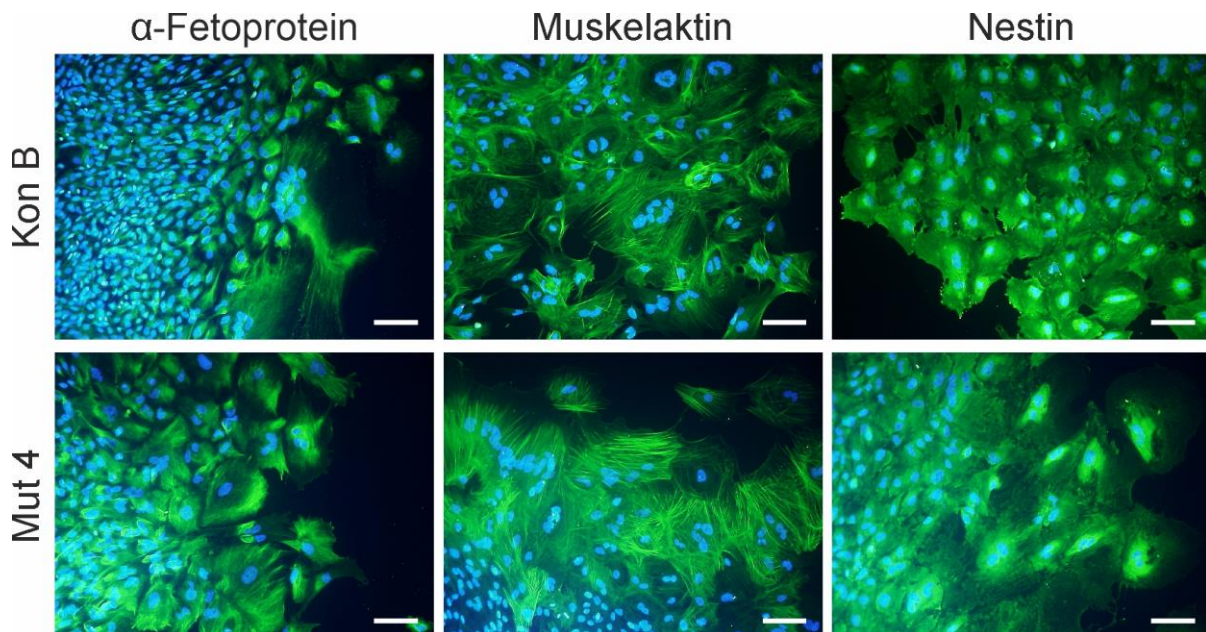


Abbildung 12: Nachweis des *in vitro* Differenzierungspotenzials der generierten iPS-Zellen. Zum Nachweis des *in vitro* Differenzierungspotenzials wurden EBs aus iPS-Zellkolonien differenziert und mit entsprechenden Markern für die einzelnen Keimblätter angefärbt. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine positive Färbung (grün) für Marker der drei Keimblätter: α -Fetoprotein (Endoderm), Muskelaktin (Mesoderm) bzw. Nestin (Ektoderm). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstab 100 μ m.

Analyse der genetischen Stabilität

Da es während des Prozesses der Reprogrammierung zu Veränderungen der Chromosomen kommen kann (Nikitina et al. 2019; Taapken et al. 2011), wurde für jede generierte iPS-Zelllinie ein Karyogramm angefertigt. Die repräsentativen Metaphasen der beiden iPS-Zelllinien zeigen die 22 humanen Autosomenpaare sowie die beiden Geschlechtschromosomen, wobei keine chromosomalen Abweichungen vom humanen, weiblichen Karyotyp (46,XX) nachgewiesen wurden (Abbildung 13).

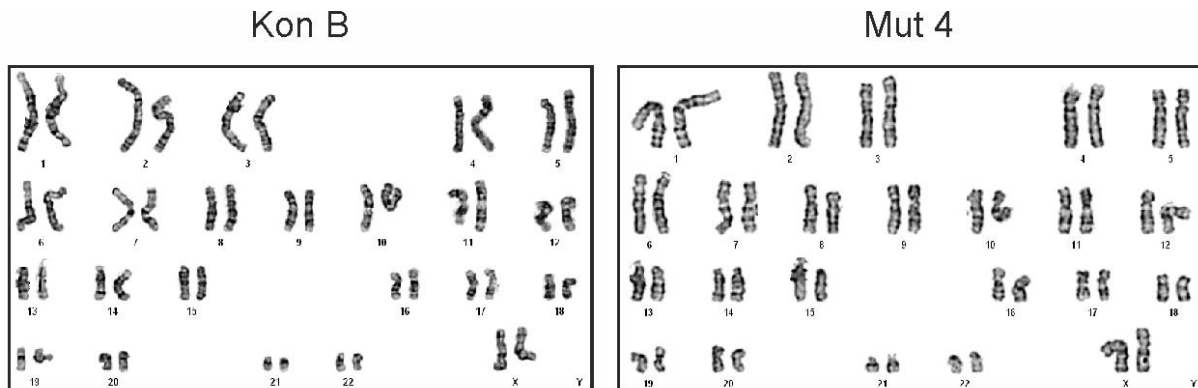


Abbildung 13: Karyogramm der etablierten iPS-Zelllinien. Dargestellt sind die 22 Autosomenpaare und die Geschlechtschromosomen XX als G-Banden Karyogramm zur Bestimmung des Karyotyps der iPS-Zelllinien. Die Zelllinien Kon B und Mut 4 weisen keine chromosomalen Aberrationen auf.

Short Tandem Repeat-Analyse

Um die Identität der Zelllinien zu bestätigen, wurde eine STR-Analyse der iPS-Zelllinien sowie der korrespondierenden Fibroblastenzellen durchgeführt. Die Analyse von 18 genomischen Loci ergab jeweils identische Polymorphismen der Fibroblasten und der daraus generierten iPS-Zelllinien (Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2). Die Zahlen geben jeweils die Anzahl der Wiederholungen der Nukleotidsequenz auf den beiden Allelen an. Die 100%ige Übereinstimmung der STRs bestätigt, dass die iPS-Zelllinien jeweils aus den korrespondierenden Fibroblasten-Zelllinien der Spenderin generiert wurden.

Tabelle 4.1: STR-Analyse der Zelllinie Kon B

Probe	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO
Fibroblasten	12,13	13,14	8,9	9,11	15,17	7,9,3	X	8,11	10,12
iPS-Zellen	12,13	13,14	8,9	9,11	15,17	7,9,3	X	8,11	10,12

Tabelle 4.2: STR-Analyse der Zelllinie Mut 4

Probe	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO
Fibroblasten	11	8,11	9,11	12	17	9	X	8	10,12
iPS-Zellen	11	8,11	9,11	12	17	9	X	8	10,12

Analyse von *NPCI*-Varianten

Für die Analyse von *NPCI*-Varianten wurde eine Mutationsanalyse mittels gezielter NGS-Sequenzierung des *NPCI*-Gens durch Mitarbeitende der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Während in den Fibroblasten und iPS-Zellen der Linie Kon B keine pathogenen *NPCI*-Varianten nachgewiesen wurden, wurden sowohl in den Fibroblasten als auch in den iPS-Zellen der Linie Mut 4 die beiden Mutationen V1023Sfs*15 bzw. G992R jeweils mit einer Allelfrequenz von etwa 50 % gefunden (Tabelle 4.3). Es handelt sich also um eine kombiniert heterozygote Mutante.

Tabelle 4.3: Ergebnis der Mutationsanalyse

Zelllinie	Zelltyp	Aminosäurenänderung	Allel-Verhältnis	Frequenz
Kon B	Fibroblasten	-	-	-
	iPS-Zellen	-	-	-
Mut 4	Fibroblasten	V1023Sfs*15	ATGTAACT=0,4997; AA=0,5003	50,03 %
		G992R	C=0,5103; G=0,4897	48,97 %
	iPS-Zellen	V1023Sfs*15	ATGTAACT=0,5101; AA=0,4899	48,99 %
		G992R	C=0,5111; G=0,4889	48,87 %

4.2 Generierung und Charakterisierung des neuronalen Zellmodells

Die Differenzierung in neural differenzierte Zellen erfolgte anhand eines in der Arbeitsgruppe etablierten Protokolls (Peter et al. 2017b). Die spontane Dichte-induzierte Differenzierung der iPS-Zellen (Abbildung 14A) führte zu der Bildung sogenannter neuraler Rosetten (Abbildung 14B, Dreiecke). Diese enthalten NPZs, die den Oberflächenmarker PSA-NCAM (engl. *polysialic acid neural cell adhesion molecule*) tragen und durch Verwendung von anti-PSA-NCAM-Antikörpern, welche an magnetische *Beads* gekoppelt sind, isoliert wurden (Abbildung 14C). Die isolierten NPZs waren positiv für die neuronalen Progenitorzellmarker Nestin, Pax6 und Sox2 (Anhang, Abbildung 41). Die Differenzierung der NPZs in NDZs fand über einen Zeitraum von sechs Wochen statt (Abbildung 14D). Bei den NDZs handelt es sich um eine Mischkultur aus β III-Tubulin⁺ Neuronen und GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*)⁺ Gliazellen (Abbildung 14E-J). β III-Tubulin ist ein Mikrotubuli-Element, das hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird und eine Rolle bei der Neurogenese, der neuronalen Zellproliferation sowie der Axonführung und -erhaltung spielt. GFAP ist ein Intermediärfilamentprotein, das im astroglialen Zytoskellet vorkommt (Žurek 2017).

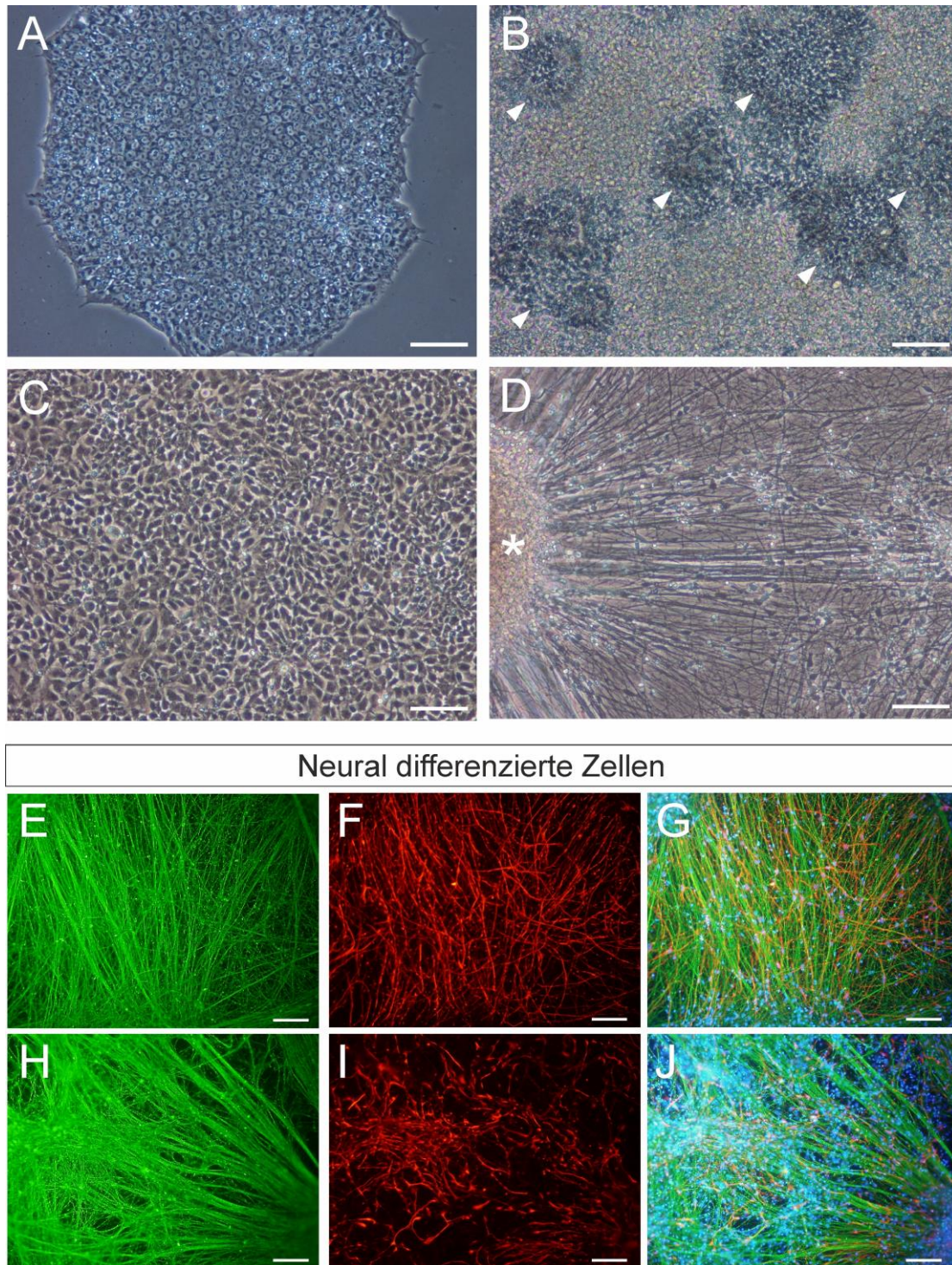
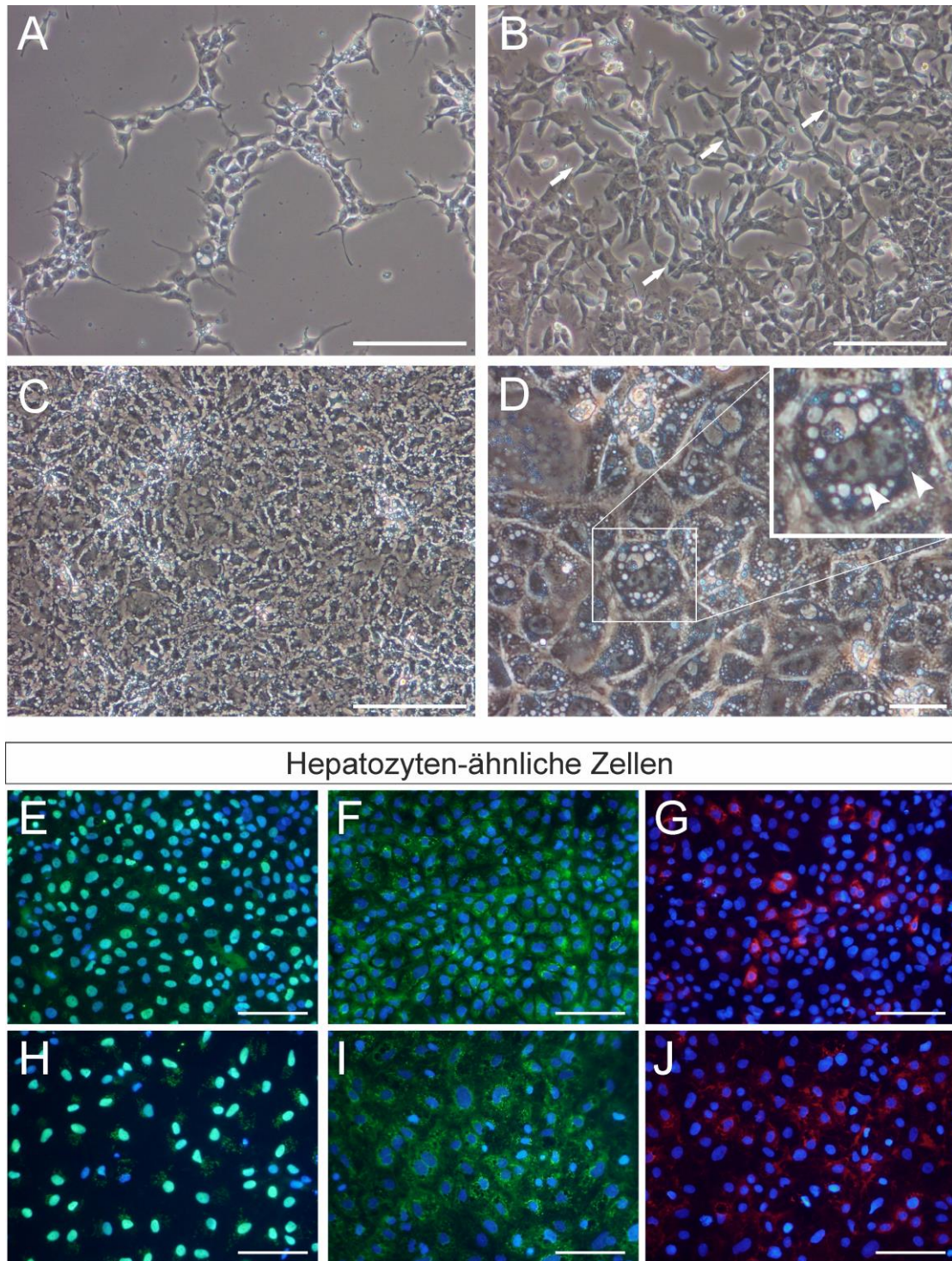


Abbildung 14: Neutrales Zellmodell. Die iPS-Zellen wurden in Form von Kolonien (A) auf Matrigel kultiviert. Die spontane Dichte-induzierte Differenzierung führte zur Bildung neuraler Rosetten (B, Dreiecke). Diese enthalten PSA-NCAM⁺ neuronale Progenitorzellen, welche durch magnetische Aufreinigung mit Hilfe von *Bead*-gekoppelten Antikörpern isoliert wurden. Die neuronalen Progenitorzellen (C) wurden expandiert und schließlich über einen Zeitraum von sechs Wochen zu neural differenzierten Zellen (D) differenziert. Die NDZs der Linie Kon B (E,F,G) und Mut 4 (H,I,J) sind positiv für den neuronalen Marker β III-Tubulin (grün; E,H,G,J) oder den glialen Marker GFAP (rot; F,I,G,J). Somit handelt es sich bei den NDZs um eine Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau; G,J) gefärbt. Maßstab 100 μ m.

4.3 Generierung und Charakterisierung des hepatischen Zellmodells

Die Differenzierung von iPS-Zellen in Hepatozyten-ähnliche Zellen erfolgte in Anlehnung an Wang und Kollegen (Wang et al. 2017) anhand eines 3-Schritte-Protokolls, das im Wesentlichen die embryonale Entwicklung der Leber imitiert. Die vereinzelt ausgesäten iPS-Zellen hatten an Tag 1 der Differenzierung einen netzartigen Verbund gebildet (Abbildung 15A) und wurden zunächst durch Zugabe von Activin A und Wnt3a in Zellen des Definitiven Endoderms (DE) differenziert. Activin A, als Mitglied der TGF- β -Superfamilie (engl. *Transforming Growth Factor*), induziert die Differenzierung in Zellen des DE durch Aktivierung des TGF- β -Signalwegs. Wnt3a interagiert spezifisch mit Activin A (Toivonen et al. 2013), wodurch die Produktion des DE gesteigert wird. Wie in Abbildung 15B zu sehen ist, füllten die Zellen des DE, welche sich durch eine dreieckige Zellmorphologie auszeichnen (Abbildung 15B, Pfeile), die Räume zwischen den ausgesäten iPS-Zellen. Die Zellen des DE waren positiv für die Markerproteine FoxA2 (engl. *Forkhead Box A2*) und Sox17 (engl. *SRY (sex determining region Y)-box 17*), die während der Embryonalentwicklung des DE exprimiert werden und das Endoderm des Vorderdarms spezifizieren, aus dem später die Zellen der Bauchspeicheldrüse und der Leber hervorgehen (Norrman et al. 2013). Entsprechend ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren, waren FoxA2 und Sox17 im Zellkern lokalisiert (Anhang, Abbildung 40). Im nächsten Schritt wurde durch Zugabe von DMSO die Differenzierung in hepatische Progenitorzellen (HPZs, Abbildung 15C) induziert (Hay et al. 2008; Sullivan et al. 2010). Es wird angenommen, dass DMSO seine Wirkung über Mechanismen wie die Deacetylierung von Histonen (Hay et al. 2007; Baxter et al. 2010), die Induktion der DNA-Methylierung (Basma et al. 2009) und die Stabilisierung von Zellmembranen (Duan et al. 2010) vermittelt. Die hepatischen Progenitorzellen waren positiv für die frühen hepatischen Marker α -Fetoprotein (AFP) und Hepatozyten-Kernfaktor 4 α (HNF4 α , engl. *hepatocyte nuclear factor 4 α*). Während HNF4 α als Transkriptionsfaktor im Zellkern lokalisiert war, wurde α -FP im Zytoplasma detektiert (Anhang, Abbildung 42). Die hepatische Reifung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen erfolgte durch Zugabe des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF, engl. *hepatocyte growth factor*) und Oncostatin M (OSM). Die HLZs an Tag 17 der Differenzierung haben ein polygonales Aussehen und vergrößerte Zellkerne mit einem erhöhten Verhältnis von Zytoplasma zu Zellkern, wobei einige Zellen mehrere Zellkerne aufweisen (Abbildung 15D, Pfeilspitzen), wie es auch typisch für primäre Hepatozyten ist. Die HLZs sind außerdem positiv für die hepatischen Markerproteine HNF4 α (Abbildung 15E,H), AFP (Abbildung 15F,I) und Albumin (ALB, Abbildung 15G,J).



Hepatozyten-ähnliche Zellen

Abbildung 15: Hepatisches Zellmodell. Die einzeln ausgesäten iPS-Zellen zeigen an Tag 1 der Differenzierung einen netzartigen Verbund (A). Durch Zugabe von Activin A und Wnt3a entwickelten sich Zellen des DE, welche eine dreieckige Zellmorphologie aufweisen (B, Pfeile). Die hepatische Spezifizierung zu hepatischen Progenitorzellen (C) wurde durch DMSO induziert. Die hepatische Reifung durch Zugabe von HGF und OSM resultierte in Hepatozyten-ähnliche Zellen (D). Diese weisen eine polygonale Zellmorphologie auf. Einige HLZs besitzen mehrere Zellkerne, wie es auch typisch für primäre Hepatozyten ist (Pfeilspitzen). Die HLZs der Linie Kon B (E,F,G) und Mut 4 (H,I,J) sind positiv für die hepatischen Marker HNF4 α (grün; E,H), AFP (grün; F,I) und Albumin (rot; G,J). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau; E-J) gefärbt. Maßstab 200 μ m.

Abschließend wurde die Funktionalität der HLZs beurteilt (Abbildung 16). Dazu wurde zunächst unter Durchführung der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion, engl. *periodic acid-Schiff reaction*) untersucht, ob die Zellen die Fähigkeit besitzen Glykogen zu speichern, ein Merkmal funktioneller Hepatozyten. Die positive Reaktion, welche anhand der intensiv rosa bis magenta-roten Färbung zu erkennen ist, zeigt, dass die HLZs funktionell in der Lage sind Glykogen zu speichern (Abbildung 16A,E). Weiterhin waren die Zellen in der Lage LDL aufzunehmen, was anhand der DiI-Ac-LDL Färbung zu sehen ist (Abbildung 16B,F). Außerdem wurde die Aufnahme und Sekretion von Indocyaningrün (ICG) untersucht. ICG ist ein ungiftiges organisches Anion, das ausschließlich von reifen Hepatozyten eliminiert wird. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, waren die HLZs in der Lage ICG aufzunehmen (Abbildung 16C,G) und es innerhalb von 6 h (Abbildung 16D,H) wieder abzugeben.

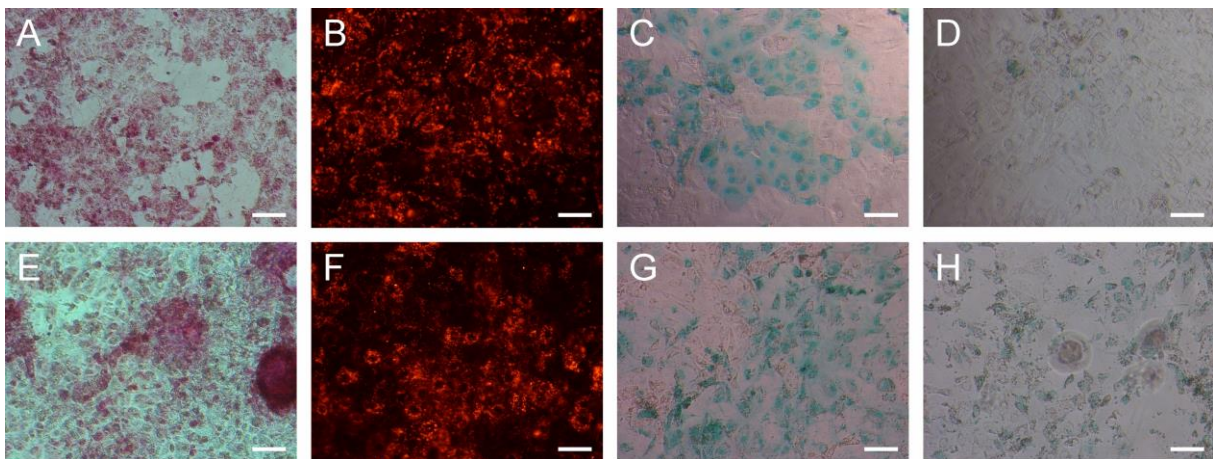


Abbildung 16: Funktionelle Charakterisierung der Hepatozyten-ähnlichen Zellen. Die HLZs der beiden Zelllinien Kon B (A-D) und Mut 4 (E-H) an Tag 17 der Differenzierung zeigen hepatozyten-ähnliche Funktionen. Zum Nachweis von Glykogen in den HLZs wurde eine PAS-Reaktion durchgeführt. Die charakteristische rosa bis dunkelrot-violette Färbung der Zellen zeigt das zytoplasmatische Glykogen (A,E). Durch die Verwendung von fluoreszierendem LDL wurde die Aufnahme von LDL in die HLZs nachgewiesen (B,F). Außerdem wurde die Metabolisierung von ICG untersucht. Die HLZs waren in der Lage das ICG aufzunehmen (C,G) und innerhalb von 6 h wieder abzugeben (D,H). Maßstab 100 µm.

4.4 Phänotypische Veränderungen bei Morbus Niemann-Pick Typ C1

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Kontrollzelllinien sowie vier NPC1-defiziente Zelllinien untersucht (vgl. Tabelle 3.1). Zwei der männlichen Kontrollzelllinien (Kon A1 und Kon A2) wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit im Folgenden nicht aufgeführt, da sie sich nicht signifikant unterschiedlich zu der Kontrollzelllinie Kon A verhielten. Die entsprechenden Daten sind der Vollständigkeit halber im Anhang aufgeführt (Abbildung 43 bis Abbildung 45). Die statistische Auswertung erfolgte getrennt nach Geschlechtern (männlich: Kon A, Mut 1, Mut 2 und Mut 3; weiblich: Kon B und Mut 4).

Cholesterolakkumulation

Da die Cholesterolakkumulation als Hauptmerkmal des NP-C1 beschrieben wird, wurde zunächst der intrazelluläre Cholesterolgehalt in allen patientenspezifischen Zelllinien und jeweils den drei Zelltypen Fibroblasten, NDZs und HLZs untersucht. Im Zuge dessen wurden Filipinfärbungen durchgeführt und anschließend das LSO-Kompartiment-Verhältnis bestimmt. Die Analyse der Fibroblasten ist in Abbildung 17 zu sehen. Die Fibroblasten der Kontrollzelllinien Kon A und Kon B zeigten insgesamt eine sehr geringe Fluoreszenzintensität und wiesen keine fluoreszierenden Vesikel auf (Abbildung 17A,E). Im Gegensatz dazu waren in den NPC1-defizienten Zelllinien fluoreszierende, punktförmige Vesikel um den Zellkern herum zu beobachten, was der Akkumulation von freiem Cholesterol entspricht. Diese perinukleären Muster waren in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Die NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 wiesen in fast allen Zellen eine Vielzahl von stark fluoreszierenden, perinukleären Vesikeln auf (Abbildung 17B,C,D). Sie sind demnach dem klassischen biochemischen NP-C1 Phänotyp zuzuordnen. Im starken Kontrast dazu, glichen die Zellen der NPC1-defizienten Zelllinie Mut 4 zum Großteil den Zellen der Kontrollzelllinien und waren optisch unauffällig. Nur einzelne Zellen zeigten kleine, schwach fluoreszierende Vesikel um den Zellkern herum (Abbildung 17F). Die Zelllinie Mut 4 wurde daher als Zelllinie mit variantem biochemischem Phänotyp eingestuft. Die Analyse des LSO-Kompartiment-Verhältnisses (Abbildung 17G) ergab signifikant erhöhte Werte in allen NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu der Kontrollzelllinie Kon A bzw. Kon B. Während die Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 eine deutliche Cholesterolakkumulation im Vergleich zu Kontrollzelllinie Kon A aufwiesen (Kon A: $0,3 \pm 0,2$; Mut 1: $10,3 \pm 1,2$; Mut 2: $18,8 \pm 2,9$; Mut 3: $22,6 \pm 2,3$), war das LSO-Kompartiment-Verhältnis der Mut 4 gegenüber Kontrollzelllinie Kon B nur geringfügig erhöht (Kon B: $0,2 \pm 0,07$; Mut 4: $1,8 \pm 0,4$).

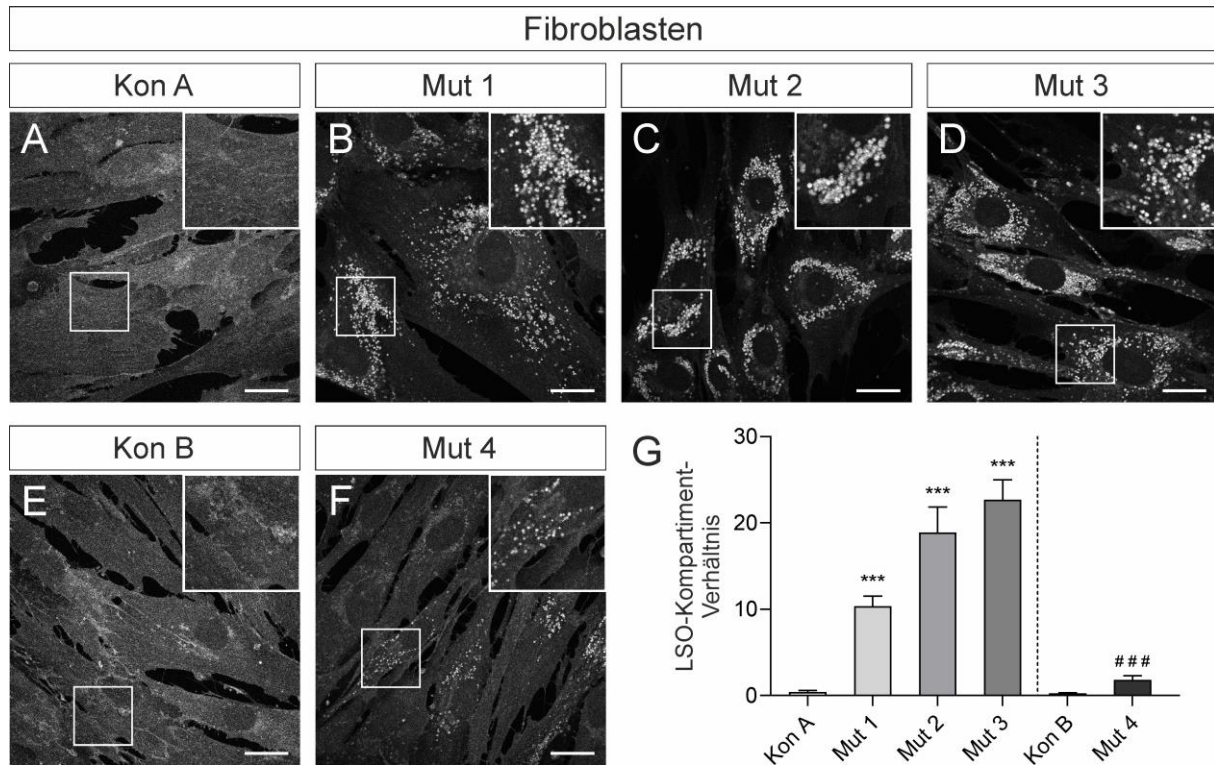


Abbildung 17: Analyse des Cholesterolgehalts in Fibroblasten. (A-F) Repräsentative Bilder der Filipin-gefärbten Fibroblastenzelllinien. Während die Fibroblasten der NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 stark fluoreszierende Vesikel in der perinukleären Region aufweisen, zeigt die Zelllinie Mut 4 größtenteils ein normales Erscheinungsbild, ähnlich der Kontrollzelllinien. Einige Zellen weisen schwach fluoreszierende Vesikel um den Zellkern herum auf. Maßstab 20 μ m. (G) Die Quantifizierung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses ergab eine deutliche Cholesterolakkumulation in den Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im Vergleich zu Kon A. Das LSO-Kompartiment-Verhältnis der Zelllinie Mut 4 war gegenüber Kon B geringfügig erhöht und wurde als varianter biochemischer Phänotyp eingestuft. (Mittelwert \pm SD; N=8; ***/### = $p < 0,001$ zu Kon A bzw. Kon B).

Die Analyse des Cholesterolgehalts in den NDZs ergab ein ähnliches Bild wie in den Ursprungszellen, den Fibroblasten. Während in den NPC1-defizienten Zelllinien punktförmige Cholesterolakkumulationen sichtbar waren (Abbildung 18B,C,D,F), waren diese in den Kontrollzelllinien Kon A und Kon B nicht zu beobachten (Abbildung 18A,E). Dabei konnten die fluoreszierenden Vesikel nicht nur in den Zellkörpern, sondern auch in den Fortsätzen der NDZs nachgewiesen werden (Abbildung 18F, Pfeil). Die Quantifizierung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses ergab signifikant höhere Werte in den NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien, wobei die Cholesterolakkumulation in Mut 4 nur sehr gering ausgeprägt war (Kon A: $0,1 \pm 0,1$; Mut 1: $2,4 \pm 0,6$; Mut 2: $4,7 \pm 2,0$; Mut 3: $4,9 \pm 2,5$; Kon B: $0,2 \pm 0,07$; Mut 4: $0,8 \pm 0,2$; Abbildung 18G).

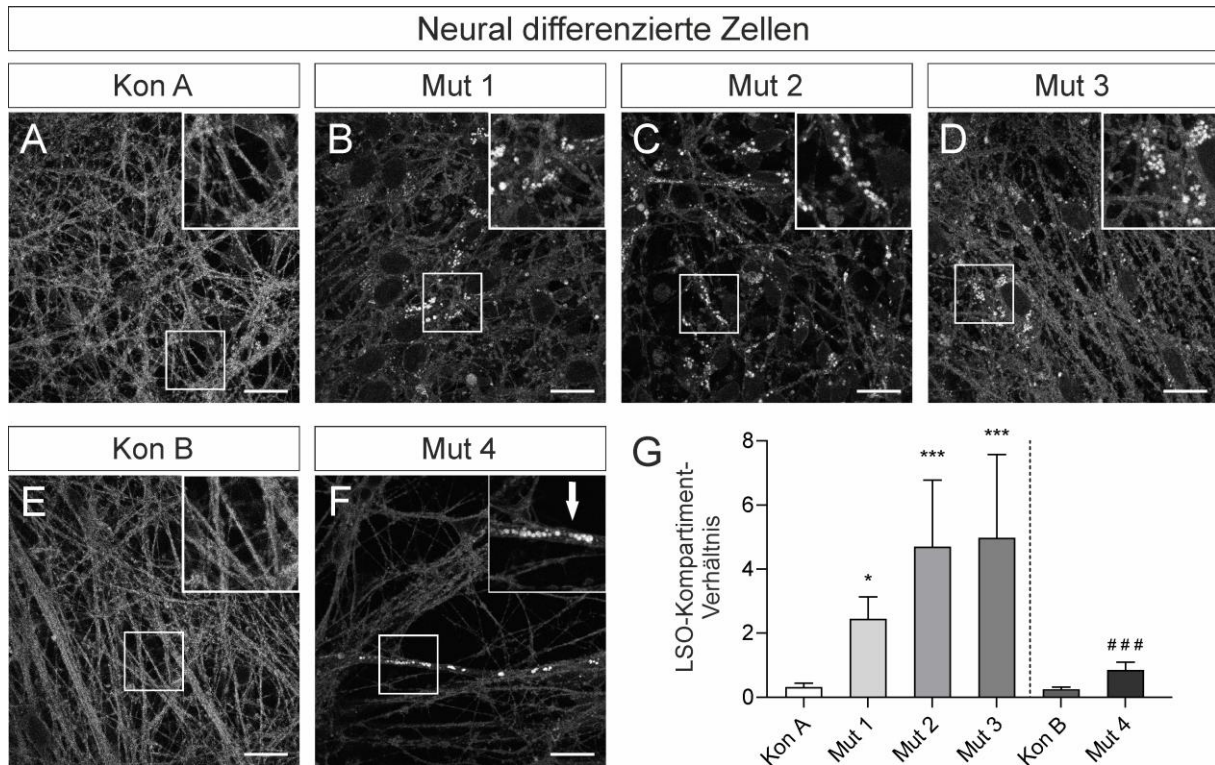


Abbildung 18: Analyse des Cholesterolgehalts in neural differenzierten Zellen. (A-F) Repräsentative Bilder der Filipin-gefärbten NDZs. In den NPC1-defizienten Zelllinien sind fluoreszierende Vesikel sowohl in den Zellkörpern als auch in den Fortsätzen der NDZs zu sehen (Pfeil). Maßstab 20 µm. (G) Die Quantifizierung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses ergab eine deutliche Cholesterolakkumulation in Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im Vergleich zur Kontrollzelllinie Kon A. Das LSO-Kompartiment-Verhältnis der Zelllinie Mut 4 war gegenüber Kontrollzelllinie Kon B nur geringfügig erhöht. (Mittelwert ± SD; N=8; *, # = p < 0,05; ***/### = p < 0,001 zu Kon A bzw. Kon B).

Auch in den Hepatozyten-ähnlichen Zellen waren vergleichbare Färbemuster wie in den Fibroblasten und NDZs zu beobachten (Abbildung 19). Die fluoreszierenden Punkte in den NPC1-defizienten Zelllinien waren, ebenso wie in den Fibroblasten, primär um den Zellkern herum lokalisiert. Die NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 wiesen im Vergleich zu Kontrollzelllinie Kon A ein signifikant erhöhtes LSO-Kompartiment Verhältnis auf (Kon A: $0,7 \pm 0,09$; Mut 1: $6,0 \pm 0,9$; Mut 2: $8,0 \pm 1,9$; Mut 3: $7,1 \pm 3,4$). Der Cholesterolgehalt der Mut 4 war im Vergleich zur Kontrollzelllinie Kon B nur geringfügig erhöht (Kon B: $0,2 \pm 0,1$; Mut 4: $2,9 \pm 1,0$).

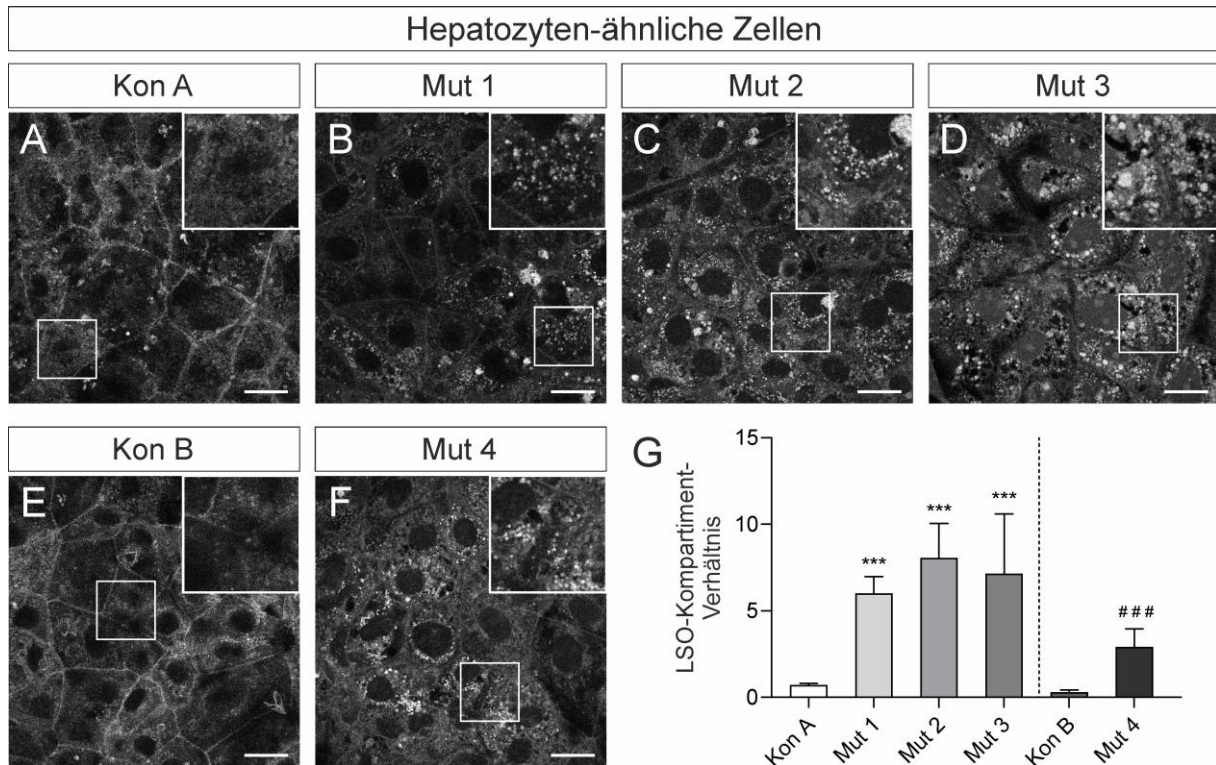


Abbildung 19: Analyse des Cholesterolgehalts in Hepatozyten-ähnlichen Zellen. (A-F) Repräsentative Bilder der Filippin-gefärbten HLZs. Während die HLZs der NPC1-defizienten Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 stark fluoreszierende Muster in der perinukleären Region aufweisen, fehlen diese vollständig in den Kontrollzelllinien. Maßstab 20 μ m. (G) Die Quantifizierung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses ergab eine deutliche Cholesterolakкумуляtion in Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im Vergleich zur Kontrollzelllinie Kon A. Der Cholesterolgehalt in Mut 4 war im Vergleich zu Kontrollzelllinie Kon B geringfügig erhöht. (Mittelwert \pm SD; N=8; ***/### = $p < 0,001$ zu Kon A bzw. Kon B).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse das Vorhandensein einer Cholesterolakкумуляtion als phänotypische Ausprägung in den NPC1-defizienten Fibroblasten, sowie in den iPScellbasierten NDZs und HLZs. Somit konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Modelle NPC1-spezifische pathophysiologische Merkmale aufweisen.

NPC1-Proteinexpression in NPC1-defizienten Zellen

In einem nächsten Schritt wurde mittels Western Blot untersucht, welche Auswirkungen die Mutationen auf die NPC1-Proteinexpression in den NPC1-defizienten Zelllinien haben. Wie anhand des repräsentativen Western Blots der Fibroblastenzelllinien (Abbildung 20A) zu sehen ist, weisen die unverdauten Zellysate (Endo H -) eine distinkte Bande von etwa 180 kDa auf, die der Gesamtmenge des NPC1-Proteins entspricht (NPC1_G). Während die Kontrollzelllinien Kon A und Kon B eine stabile Expression des NPC1-Proteins aufweisen, ist diese in den drei

NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2, und Mut 3 gegenüber der Kontrollzelllinie Kon A signifikant reduziert (Abbildung 20B). Dagegen ist die Gesamtmenge des NPC1-Proteins der NPC1-defizienten Zelllinie Mut 4 gegenüber Kontrollzelllinie Kon B nicht signifikant niedriger. Neben der Gesamtmenge des NPC1-Proteins wurde außerdem auch die Reife des NPC1-Proteins mit Hilfe eines biochemischen Ansatzes, dem Verdau durch Endoglykosidase H (Endo H) beurteilt. Endo H entfernt unreife N-verknüpfte Glykane von Proteinen im ER, kann sie aber nicht mehr spalten nachdem die Oligosaccharidkette im medialen Golgi modifiziert wurde (Varki et al. 2017). Eine Resistenz gegenüber dem Endo H-Verdau deutet daher darauf hin, dass das NPC1-Glykoprotein entlang des sekretorischen Signalwegs über den medialen Golgi hinaus gewandert sein muss. Ist das NPC1-Protein jedoch sensitiv gegenüber dem Endo H-Verdau deutet dies darauf hin, dass es im ER zurückgehalten wird. Zusammenfassend erlaubt also der Verdau mit Endo H eine erste Aussage über die intrazelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins. Nach Verdau der Fibroblastenzelllysate mit Endo H (Endo H⁺) sind jeweils zwei Banden zu erkennen (Abbildung 20A). Die obere, langsam migrierende Bande entspricht der Endo H-resistenten (Endo H_R) NPC1-Glykoform. Die untere, schneller migrierende Bande hingegen, entspricht dem Endo H-sensitiven (Endo H_S) Anteil der NPC1-Proteinmenge, welcher im ER zurückgehalten wird. Die Analyse der NPC1-Glykoformen ist in Abbildung 20C dargestellt und ergab, dass das NPC1-Protein in den Kontrollzelllinien hauptsächlich in der Endo H-resistenten Form vorliegt (Kon A: $93,7 \pm 3,4$ %; Kon B: $90,5 \pm 4,9$ %). In den NPC1-defizienten Zelllinien dagegen war dieser Anteil signifikant verringert. Während es in Mut 4 nur geringfügig weniger war (Mut 4: $81,5 \pm 5,4$ %), wiesen die Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 kaum Endo H-resistentes NPC1-Protein auf (Mut 1: $30,9 \pm 5,4$ %, Mut 2: $19,6 \pm 13,9$ %, Mut 3: $24,9 \pm 14,6$ %). Dies deutet daraufhin, dass die NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im ER zurückgehalten werden, während Mut 4 größtenteils korrekt weiter transportiert wird.

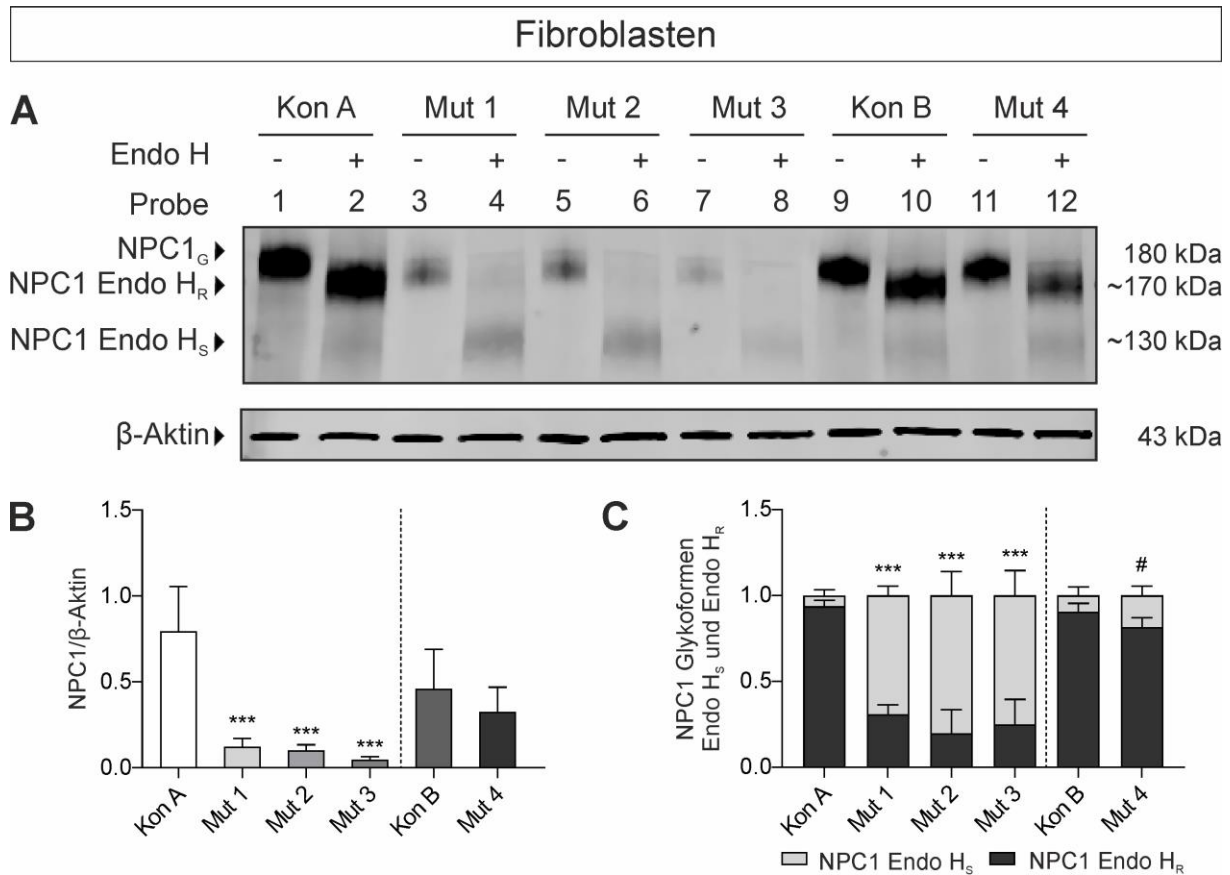


Abbildung 20: NPC1-Protein Analyse in Fibroblasten. (A) Die Zelllysate der Fibroblasten wurden mittels Western Blot auf die Expression des NPC1-Proteins untersucht. Die distinkte Bande bei etwa 180 kDa entspricht der Gesamtmenge des NPC1-Proteins (NPC1_G) in den unverdauten Proben (1, 3, 5, 7, 9 und 11). Durch Verdau der Zelllysate mit Endo H (Proben 2, 4, 6, 8, 10 und 12) wurden die NPC1-Glykoformen (Endo H_R ≈ 170 kDa bzw. Endo H_S ≈ 130 kDa) des NPC1-Proteins bestimmt. Als Referenzprotein wurde β-Aktin genutzt (43 kDa). (B) Die Analyse der Gesamtmenge des NPC1-Proteins ergab eine signifikante Reduktion des NPC1-Proteins in den NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im Vergleich zu Kontrollzelllinie Kon A. N=6. (C) Das NPC1-Protein der Kontrollzelllinien Kon A und Kon B, sowie auch der NPC1-Zelllinie Mut 4 mit variantem biochemischem Phänotyp, ist gegenüber dem Verdau mit Endo H größtenteils resistent. Mutiertes NPC1-Protein der Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 ist dagegen hauptsächlich Endo H-sensitiv, was darauf hindeutet, dass es im ER zurückgehalten wird. (Mittelwert ± SD; N=6; */ # = p < 0,05; ***/# # # = p < 0,001 zu Kon A bzw. Kon B).

Die Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Analyse der NPC1-Proteinexpression in den NDZs. Die Banden des NPC1-Proteins bei 180 kDa in den Kontrollzelllinien sind deutlich zu erkennen, während die Signalintensität in den NPC1-defizienten Zelllinien geringer ist (Abbildung 21A). Die Quantifizierung bestätigte diesen optischen Eindruck und ergab, ähnlich wie in den Fibroblasten, eine Reduktion der Gesamtmenge des NPC1-Proteins in den NPC1-defizienten Zelllinien (Abbildung 21B). Die Analyse der NPC1-Glykoformen in den NDZs zeigt, ebenso

wie in den Fibroblasten, dass die NPC1-Proteinmenge der Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 hauptsächlich sensitiv gegenüber dem Verdau mit Endo H sind (NPC1 Endo H_R in Mut 1: 34,1 ± 4,0 %; Mut 2: 17,3 ± 2,8 %, Mut 3: 26,0 ± 1,5 %), während es in den Kontrollzelllinien Kon A und Kon B hauptsächlich resistent ist (NPC1 Endo H_R in Kon A: 91,3 ± 3,4 %; Kon B: 91,3 ± 5,6 %). Der Anteil des Endo H-resistenten NPC1-Proteins in Mut 4 war gegenüber Kontrollzelllinie Kon B geringfügig niedriger (Mut 4: 82,4 ± 5,6 %) (Abbildung 21C).

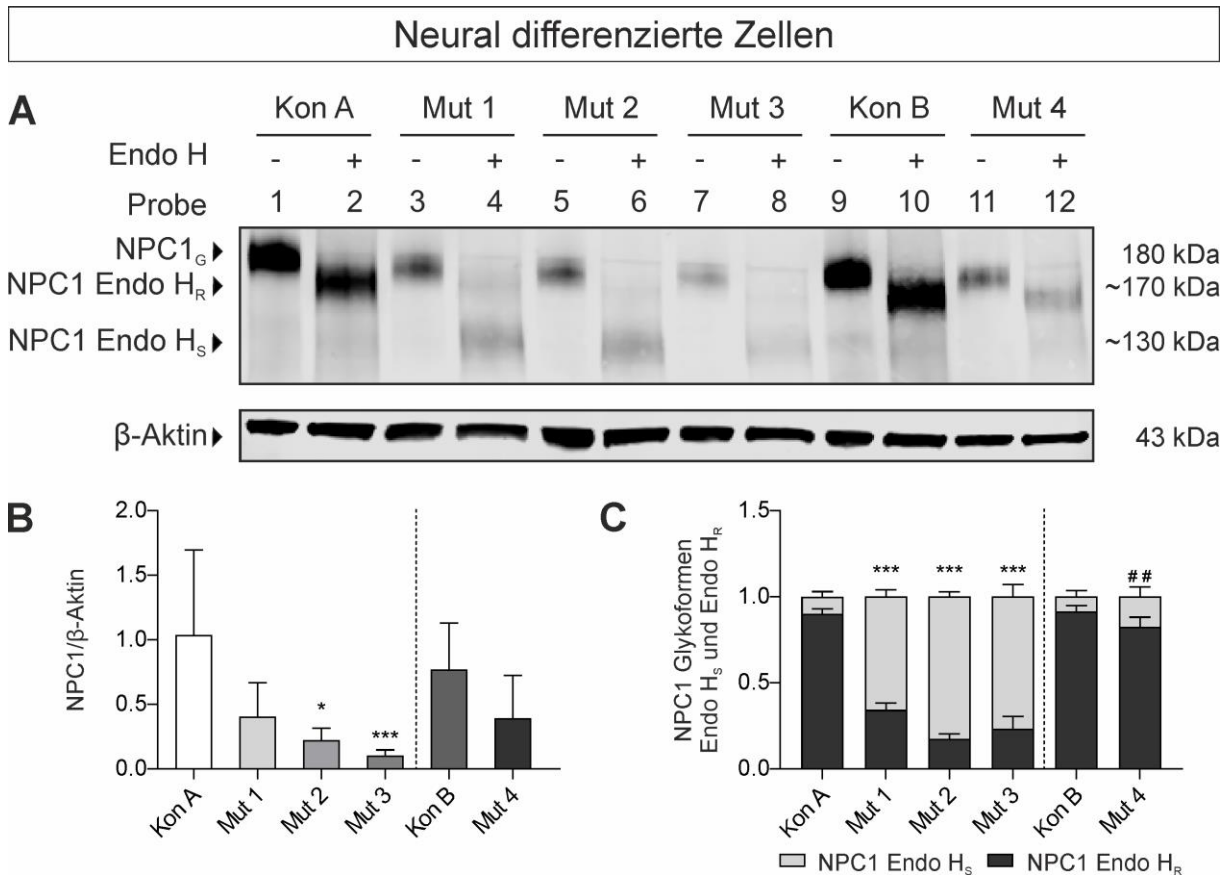


Abbildung 21: NPC1-Protein Analyse in neural differenzierten Zellen. (A) Die Zellysate der NDZs wurden mittels Western Blot hinsichtlich der NPC1-Proteinexpression untersucht. Die distinkte Bande bei etwa 180 kDa entspricht der Gesamtmenge des NPC1-Proteins (NPC1_G) in den Proben 1, 3, 5, 7, 9 und 11. Durch Verdau der Zellysate mit Endo H wurde der Anteil der Glykoformen (Endo H_R bzw. Endo H_S) des NPC1-Proteins in den Proben 2, 4, 6, 8, 10 und 12 bestimmt. β-Aktin diente als Referenzprotein. **(B)** Die Gesamtmenge des NPC1-Proteins war in den NPC1-defizienten Zelllinien Mut 2 und Mut 3 signifikant verringert. N=6. **(C)** Der Großteil des NPC1-Proteins in den Kontrollzelllinien Kon A und Kon B sowie in der NPC1-defizienten Zelllinie Mut 4 ist gegenüber dem Verdau mit Endo H resistent. Das mutierte NPC1-Protein der Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 ist dagegen hauptsächlich Endo H-sensitiv, was darauf hindeutet, dass es im ER zurückgehalten wird. (Mittelwert ± SD; N=6; */# = p < 0,05; **/# = p ≤ 0,01; ***/## = p < 0,001 zu Kon A bzw. Kon B).

Die Analyse der HLZs zeigt reduzierte NPC1-Bandensignale in den NPC1-defizienten Zelllinien (Abbildung 22A). Die Quantifizierung ergab, dass die NPC1-Proteinmenge in den

Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 gegenüber Kontrollzelllinie Kon A signifikant verringert ist. Die NPC1-Proteinmenge der Mut 4 war gegenüber Kontrollzelllinie Kon B statistisch nicht signifikant niedriger. Die Analyse der NPC1-Glykoformen zeigte in den Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 einen signifikant geringeren Anteil an Endo H-resistentem NPC1-Protein im Vergleich zu Kon A (Kon A: $95,5 \pm 3,1$ %; Mut 1: $52,9 \pm 7,7$ %; Mut 2: $29,3 \pm 6,0$ %; Mut 3: $29,5 \pm 15,5$ %). Die NPC1-defiziente Zelllinie Mut 4 wies dagegen einen hohen Anteil an Endo H-resistentem NPC1-Protein auf, der geringfügig unter dem Expressionsniveau der Kontrollzelllinie Kon B lag (Kon B: $94,8 \pm 2,6$ %; Mut 4: $92,8 \pm 1,7$ %).

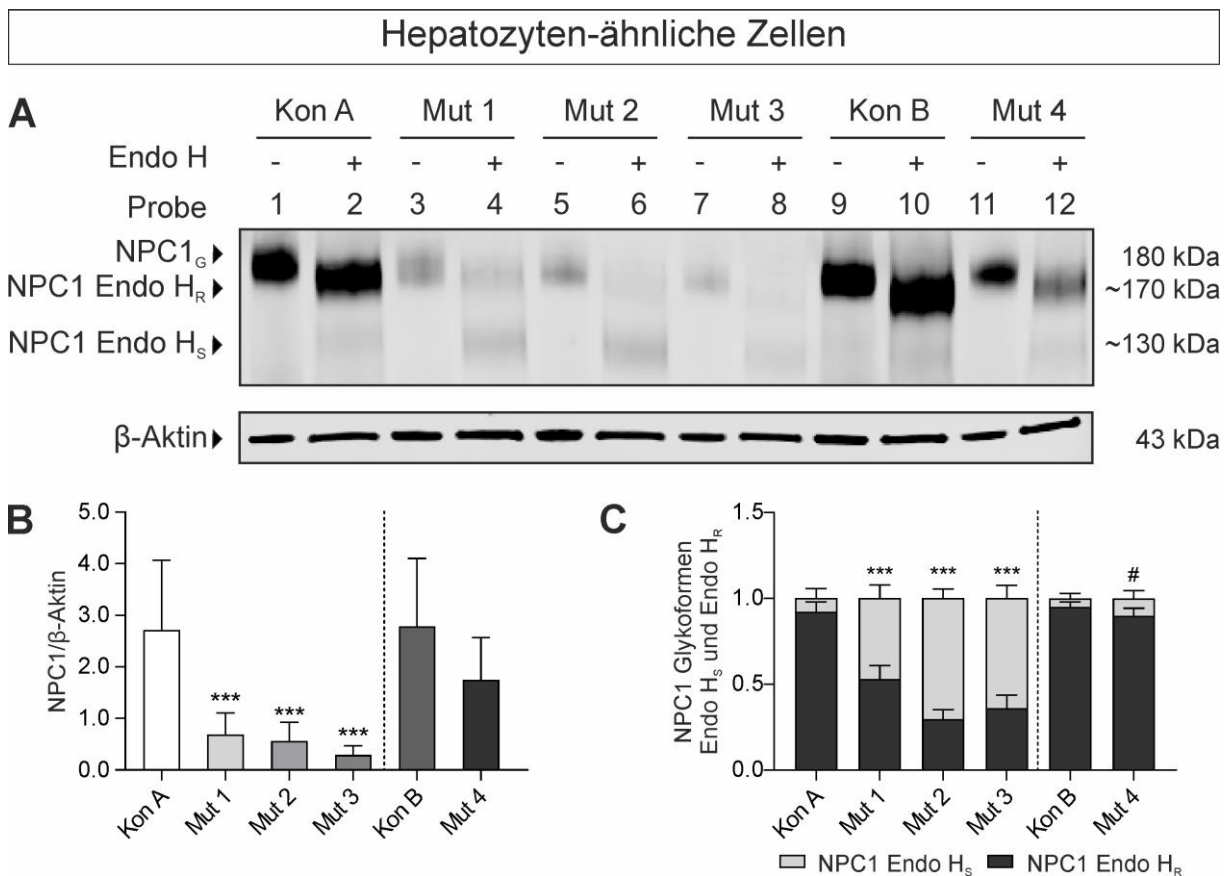


Abbildung 22: NPC1-Protein Analyse in Hepatozyten-ähnlichen Zellen. (A) Bei den Proben 1, 3, 5, 7, 9 und 11 handelt es sich um die unverdauten Zelllysate der HLZs. Diese zeigen eine distinkte Bande bei etwa 180 kDa, die der Gesamtmenge des NPC1-Proteins (NPC1_G) entspricht. Die Proben 2, 4, 6, 8, 10 und 12 wurden vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Endo H verdaut, um die Glykoformen des NPC1-Proteins: Endo H-resistent (≈ 170 kDa) bzw. Endo H-sensitiv (≈ 130 kDa) zu detektieren. (B) Die NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 weisen eine signifikant verringerte NPC1-Proteinmenge gegenüber Kontrollzelllinie Kon A auf. N=6. (C) Das NPC1-Protein in den Kontrollzelllinien Kon A und Kon B sowie in der NPC1-defizienten Zelllinie Mut 4 ist hauptsächlich Endo H-resistent. Das mutierte NPC1-Protein der Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 ist dagegen hauptsächlich Endo H-sensitiv, was auf eine Retention im ER hindeutet. (Mittelwert \pm SD; N=6; */# = $p < 0,05$; ***/### = $p < 0,001$ zu Kon A bzw. Kon B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den Fibroblasten, NDZs und HLZs der NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 eine Reduktion der Gesamtmenge des NPC1-Proteins gegenüber der Kontrollzelllinie Kon A zu beobachten war. Der Endo H-resistente Anteil der verbliebenen NPC1-Proteinmenge war gegenüber der Kontrollzelllinie Kon A verringert, was darauf hindeutet, dass die mutierten NPC1-Proteine im ER zurückgehalten wird. Die Zelllinie Mut 4 zeigte dagegen nur geringe Abweichungen von der Kontrollzelllinie Kon B. Dies lässt vermuten, dass das mutierte NPC1-Protein dieser Zelllinie über das ER hinaus entlang des sekretorischen Wegs transportiert wird.

Subzelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation des NPC1-Proteins wurden immunzytochemische Färbungen und anschließend Kolokalisationsanalysen von NPC1 und LAMP2, einem lysosomalen Markerprotein, durchgeführt (Abbildung 23). In Fibroblasten der Kontrollzelllinien Kon A und Kon B sind NPC1 und LAMP2 in Form von zytoplasmatischen Punkten um den Zellkern herum sichtbar. Optisch ist eine starke Überlappung der Fluoreszenzsignale von NPC1 und LAMP2 zu beobachten (Abbildung 23A,E). Im Gegensatz dazu war das NPC1-Fluoreszenzsignal in den NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 sehr schwach und zeigte ein diffuses Verteilungsmuster (Abbildung 23B,C,D). Die Fluoreszenzaufnahmen der Linie Mut 4 ähneln dagegen denen der Kontrollzelllinien in der Hinsicht, dass die Fluoreszenzsignale von NPC1 und LAMP2 eine starke Überlappung aufweisen. Jedoch zeigten die Zellen dieser Linie ein schwächeres Fluoreszenzsignal für NPC1 (Abbildung 23F). Die Analyse des Pearson-Korrelationskoeffizienten zur quantitativen Beurteilung der Kolokalisation von NPC1 und LAMP2 bestätigte den optischen Eindruck. Die Kontrollzelllinien Kon A und Kon B weisen einen hohen Pearson-Korrelationskoeffizienten auf (Kon A: $0,794 \pm 0,066$; Kon B: $0,778 \pm 0,044$). Die starke Kolokalisation deutet darauf hin, dass das NPC1-Protein hauptsächlich in den Lysosomen der Zellen lokalisiert ist. Der Pearson-Korrelationskoeffizient der NPC1-defizienten Zelllinien ist dagegen signifikant reduziert, wobei die NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 die niedrigsten Werte aufweisen (Mut 1: $0,248 \pm 0,036$; Mut 2: $0,226 \pm 0,050$; Mut 3: $0,256 \pm 0,032$; Mut 4: $0,615 \pm 0,056$; Abbildung 23G).

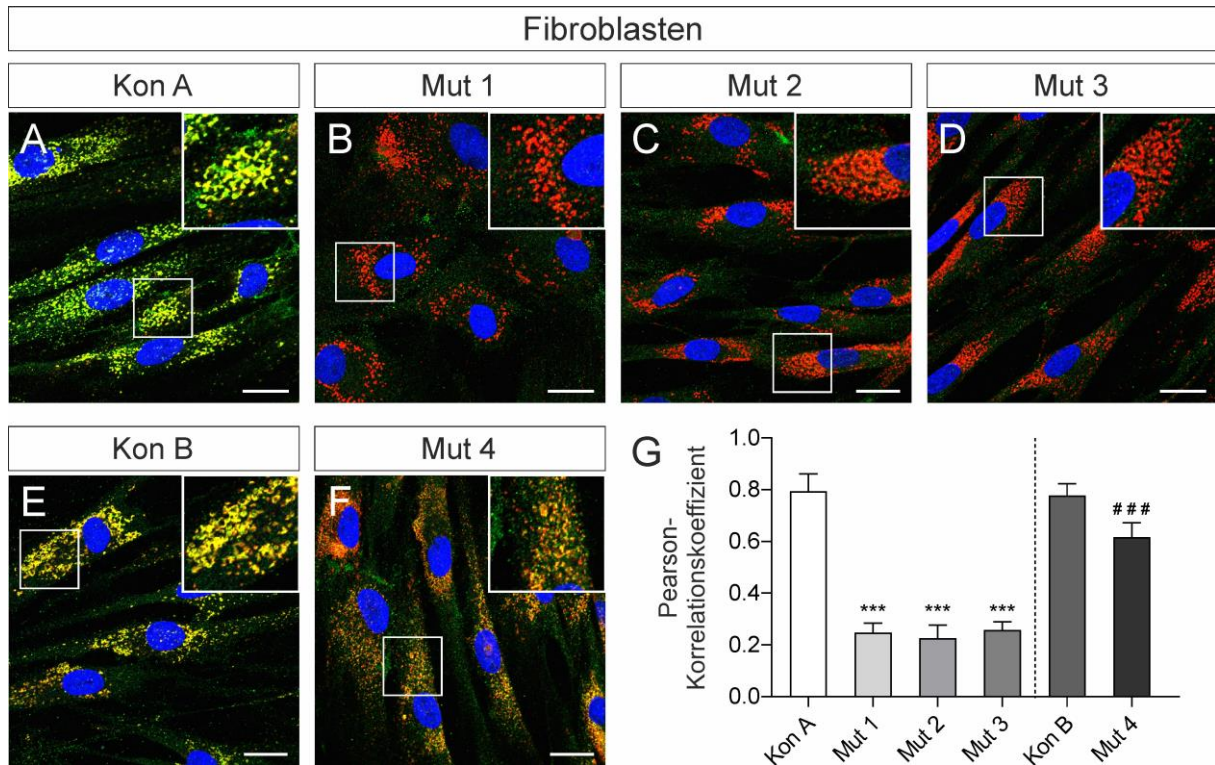


Abbildung 23: Kolokalisationsanalyse in Fibroblasten. (A-F) Das NPC1-Protein (grün) und der lysosomale Marker LAMP2 (rot) wurden durch immunzytochemische Färbungen in den Fibroblasten visualisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. In den Kontrollzelllinien sind NPC1 und LAMP2 in Form von perinukleären Punkten sichtbar, wobei die Fluoreszenzsignale eine starke Überlappung aufweisen (gelb). In den NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 war das NPC1 Signal sehr schwach und diffus verteilt. Maßstab 20 μ m. (G) Die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten zur quantitativen Analyse der Kolokalisation ergab signifikant reduzierte Werte in den NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. (Mittelwert \pm SD; N=8; ***/### = $p < 0,001$ zu Kon A bzw. Kon B).

Die Analyse der Fluoreszenzsignale für NPC1 und LAMP2 in den NDZs zeigt ein ähnliches Bild wie in den Fibroblasten. Auch hier weisen die Kontrollzelllinien Kon A und Kon B eine starke Expression von NPC1 und LAMP2 auf, was anhand der intensiven Fluoreszenzsignale in den Somata und den Ausläufern der NDZs sichtbar ist, während in den NPC1-defizienten Zelllinien deutlich schwächere und diffus verteilte Fluoreszenzsignale für NPC1 sichtbar waren (Abbildung 24). Die Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 mit dem klassischen biochemischen Phänotyp weisen niedrige Pearson-Korrelationskoeffizienten auf, was darauf hindeutet, dass kaum NPC1-Protein in den Lysosomen der Zelle lokalisiert ist (Mut 1: $0,328 \pm 0,066$; Mut 2: $0,272 \pm 0,032$; Mut 3: $0,194 \pm 0,061$). Der variante Phänotyp der Linie Mut 4 zeigt in der Kolokalisationsanalyse einen Pearson-Korrelationskoeffizienten von $0,500 \pm 0,055$, was gegenüber der Kontrollzelllinie Kon B signifikant verringert ist, aber dennoch für eine deutliche Lokalisation in der lysosomalen Membran spricht.

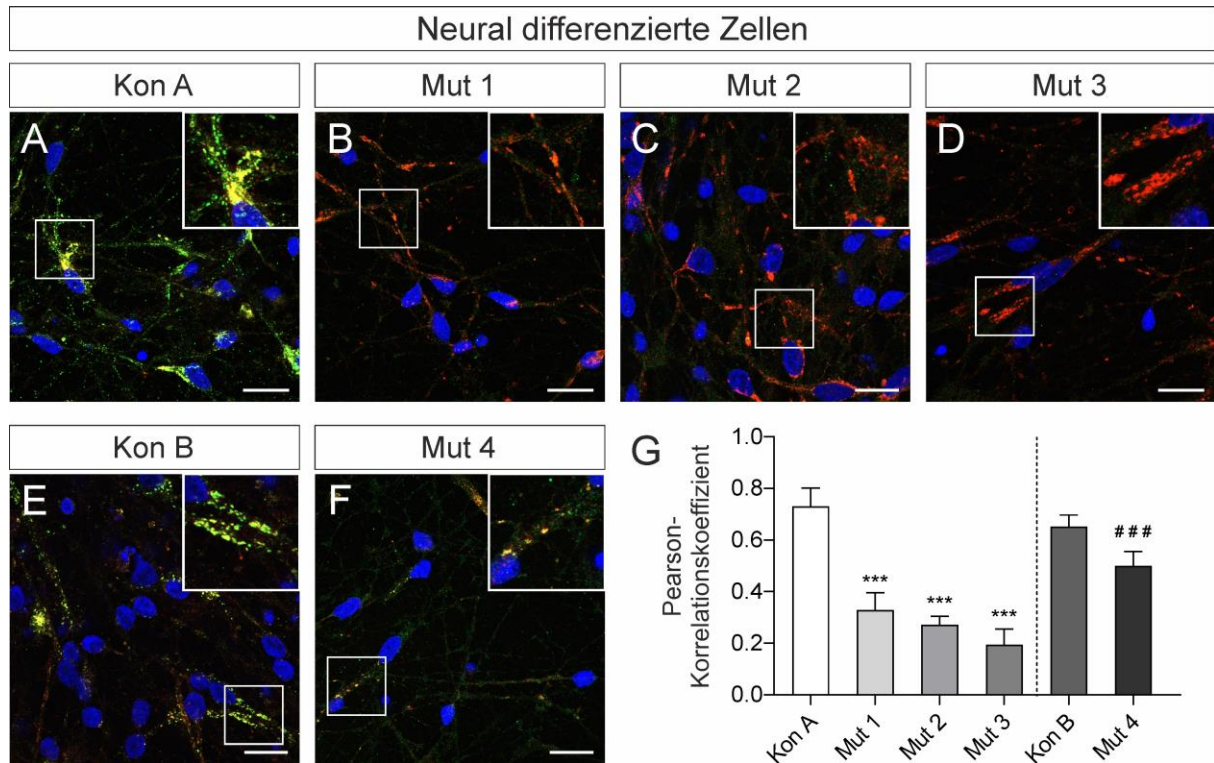


Abbildung 24: Kolokalisationsanalyse in neural differenzierten Zellen. (A-F) Die immunzytochemischen Färbungen zeigen Fluoreszenzsignale von NPC1 (grün) und LAMP2 (rot) in den Somata und Ausläufern der NDZs. DAPI wurde genutzt, um die Zellkerne anzufärben (blau). Maßstab 20 μ m. (G) Die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten zeigt eine signifikant reduzierte Kolokalisation von NPC1 mit dem lysosomalen Markerprotein LAMP2 in den NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. (Mittelwert \pm SD; N=8; ***/### = $p < 0,001$ zu Kon A bzw. Kon B).

Die Ergebnisse der Kolokalisationsanalysen in den HLZs sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Fluoreszenzsignale in den HLZs sind ebenso wie in den Fibroblasten vornehmlich im perinukleären Bereich zu finden. Auch in den HLZs sind die Pearson-Korrelationskoeffizienten in den NPC1-defizienten Zelllinien gegenüber den Kontrollzelllinien signifikant verringert (Kon A: $0,756 \pm 0,054$; Kon B: $0,736 \pm 0,014$; Mut 1: $0,386 \pm 0,095$; Mut 2: $0,234 \pm 0,028$; Mut 3: $0,271 \pm 0,059$; Mut 4: $0,686 \pm 0,042$), wobei die Mut 4 entsprechend ihres varianten biochemischen Phänotyps die höchste Kolokalisation von NPC1 und LAMP2 aufweist, was darauf hindeutet, dass das NPC1-Protein zum größten Teil seinen Zielort, die lysosomale Membran, erreicht.

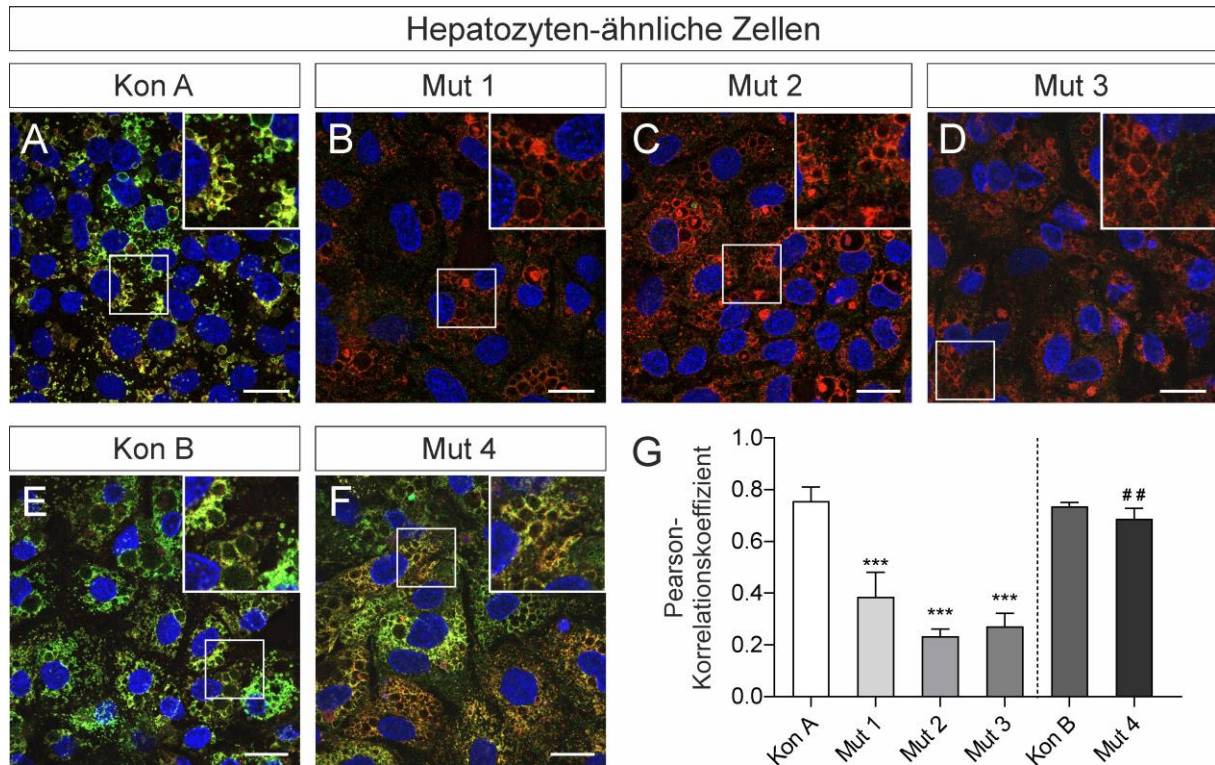


Abbildung 25: Kolokalisationsanalyse in Hepatozyten-ähnlichen Zellen. (A-F) Die konfokalen Aufnahmen zeigen NPC1 (grün) und den lysosomalen Marker LAMP2 (rot) in den HLZs. DAPI wurde genutzt, um die Zellkerne anzufärben (blau). Maßstab 20 μ m. (G) Die quantitative Analyse der Kolokalisation von NPC1 und LAMP2 ergab signifikant reduzierte Pearson-Korrelationskoeffizienten in den NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien Kon A und Kon B. (Mittelwert \pm SD; N=8; ***/### = $p < 0,001$ zu Kon A bzw. Kon B).

Proteasomaler Abbau des mutierten NPC1-Proteins

Um festzustellen, ob die Reduktion der NPC1-Proteinmenge, die in den Fibroblastenzelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 beobachtet wurde (vgl. Abbildung 20), auf eine erhöhte Rate des proteasomalen Abbaus zurückzuführen ist, wurden Kontroll- und NPC1-defiziente Fibroblastenzelllinien 24 h lang mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt und die NPC1-Proteinexpression mittels Western-Blot bestimmt (Abbildung 26). Während die Behandlung mit MG132 keine Auswirkungen auf die NPC1-Proteinmenge der Kontrollzellen hatte, führte sie zu einem signifikanten 2- bis 3-fachen Anstieg des NPC1-Proteins in den NPC1-defizienten Fibroblastenzelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3. In der Linie Mut 4 konnte dagegen kein signifikanter Anstieg des NPC1-Proteins nach Behandlung mit MG132 gemessen werden.

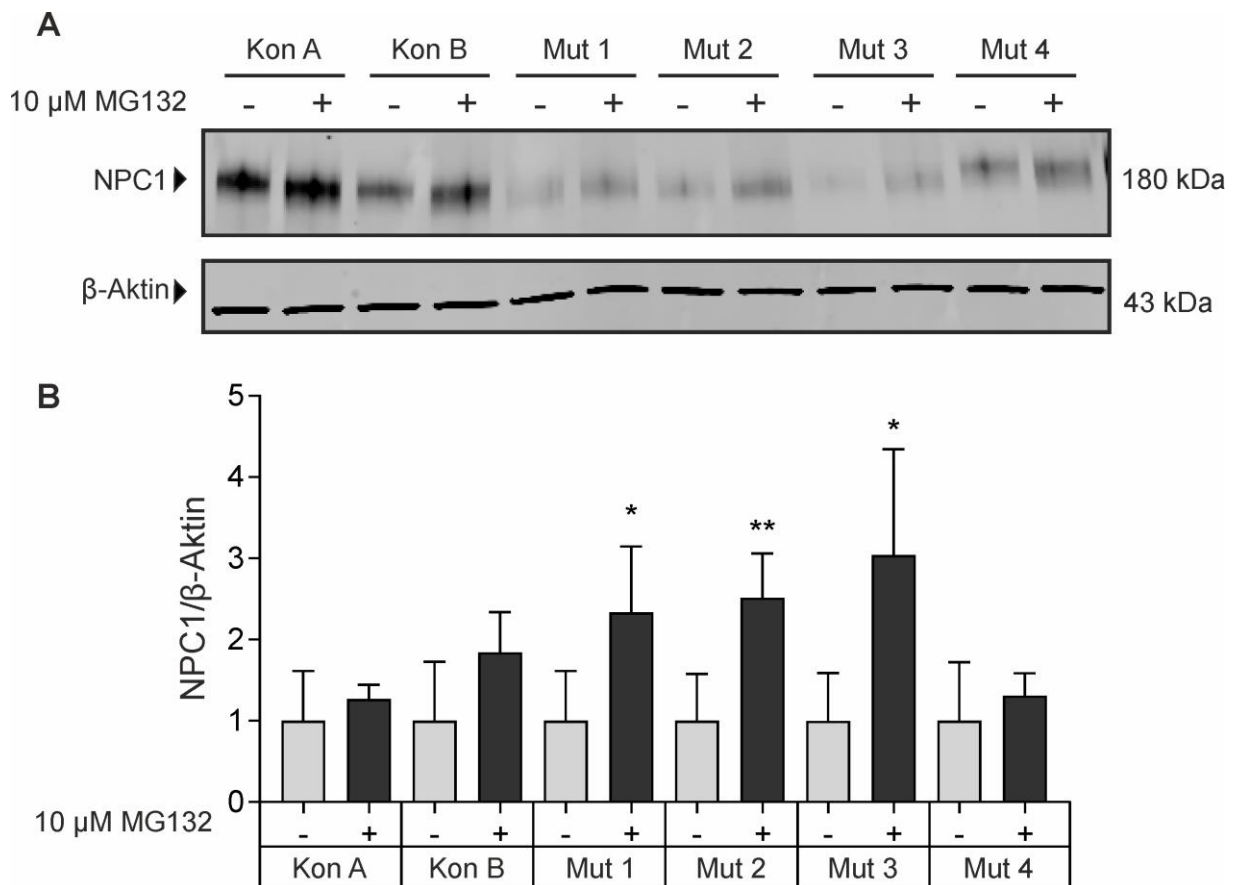


Abbildung 26: Proteasomaler Abbau des NPC1-Proteins in Fibroblasten. (A) Repräsentative Western Blot-Analyse des NPC1-Proteingehalts in Kontroll- und NPC1-defizienten Fibroblasten nach Behandlung mit MG132 für 24 h. β-Aktin wurde als Referenzprotein verwendet. (B) Die quantitative Analyse der NPC1-Bandensignale ergab einen signifikanten Anstieg des mutierten NPC1-Proteins in Mut 1, Mut 2 und Mut 3, nicht aber in Mut 4. (Mittelwert ± SD; N=4; * = p < 0,05; ** = p ≤ 0,01 zur jeweiligen DMSO-Kontrolle).

4.5 Behandlung des NP-C1 Phänotyps mit pharmakologischen Chaperonen

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, konnte in den NPC1-defizienten Zelllinien ein reduzierter NPC1-Proteingehalt, sowie eine verminderte Reifung und eine veränderte subzelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins nachgewiesen werden. Für die Mutation I1061T (Mut 1) wurde beschrieben, dass dieser Phänotyp auf eine mutationsbedingte Fehlfaltung des NPC1-Proteins beruht (Gelsthorpe et al. 2008). Der Lösungsansatz in dieser Arbeit sieht vor pharmakologische Chaperone einzusetzen, um das NPC1-Protein zu stabilisieren, dessen Transport zu der lysosomalen Membran zu ermöglichen und einer Cholesterollakkumulation entgegenzuwirken. Dazu wurden, wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben, potentielle pharmakologische Chaperone, die auf Grundlage eines zuvor durchgeführten *in silico* Screenings identifiziert wurden, *in vitro* getestet.

4.5.1 Identifizierung von potentiellen pharmakologischen Chaperonen

Die Identifizierung von potentiellen pharmakologischen Chaperonen zur Behandlung von NP-C1 erfolgte durch Dr. Pantoom (Arbeitsgruppe Medizinische Genetik, Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“, Universitätsmedizin Rostock) unter Anwendung eines *high throughput* Verfahrens, dem *Molecular Docking*. Dies ist ein *in silico* Verfahren zur Modellierung von Protein-Liganden-Wechselwirkungen und zur Vorhersage der Bindungsenergien dieser Protein-Liganden-Komplexe. Das Verfahren ist geeignet, um virtuelle Substanzbibliotheken mit hohem Durchsatz zu screenen und so Leitstrukturen für die weitere Entwicklung von Medikamenten zu identifizieren. Im Vorfeld der vorgelegten Arbeit wurde durch Dr. Pantoom die Substanzbibliothek „The Drugbank“ (The Drugbank) gescreent, um Substanzen zu identifizieren, die ein hohes Potential haben an das NPC1-Protein zu binden und somit potentiell als pharmakologisches Chaperon zu fungieren. Diese Substanzbibliothek enthält von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Medikamente (Wishart et al. 2006). Als Rezeptor diente die Kristallstruktur der cholesterolbindenden N-terminalen Domäne des NPC1-Proteins (*Protein Data Bank* Identifikator: 3GKI). Aus 2.162 Substanzen der Drugbank wurden diejenigen bestimmt, die eine niedrigere Bindungsenergie, also eine höhere Bindungsaffinität zur NTD des NPC1-Proteins haben, als der natürliche Ligand Cholesterol. Es wurden 10 hit compounds identifiziert (Tabelle 4.4). Außerdem enthält die Tabelle 4.4 die Bindungsenergie und Bindungseffizienz des bereits für NP-C1 beschriebenen experimentellen pharmakologischen Chaperons 25-Hydroxycholesterol (25-HC) (Ohgane et al. 2013), welches in der vorliegenden Arbeit als Positivsubstanz genutzt wurde. Die 10 *hit compounds* dienen als Basis für die nachfolgenden *in vitro* Analysen.

Tabelle 4.4: Hit compounds

	Drugbank ID	Freiname	Bindungsenergie [kcal/mol]
#1	DB00378	Dydrogesteron	-12,6
#2	DB06710	Methyltestosteron	-11,6
#3	DB04575	Quinestrol	-11,6
#4	DB09280	Lumacaftor	-12,1
#5	DB00984	Nandrolon Phenylpropionat	-11,6
#6	DB05812	Abirateron	-11,4
#7	DB06210	Eltrombopag	-11,4
#8	DB00977	Ethinylestradiol	-11,3
#9	DB01420	Testosteronpropionat	-11,3
#10	DB12598	Nafamostat	-11,3
Referenz	DB04540	Cholesterol	-11,3
Referenz	DB04705	25-Hydroxycholesterol	-11,7

4.5.2 Behandlung der NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten

Die *in vitro* Analyse wurde zunächst in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten der Zelllinie Mut 1, welche die Mutation I1061T in Homozygotie trägt, durchgeführt, da diese Mutante nachweislich ein funktionell aktives, aber fehlgefaltetes Protein kodiert (Gelsthorpe et al. 2008) und somit gegenüber der Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen zugänglich sein sollte. Als Positivkontrolle wurden Behandlungen mit 25-HC mitgeführt, da diese Substanz bereits als experimentelles pharmakologisches Chaperon in NPC1-defizienten Fibroblasten beschrieben wurde (Ohgane et al. 2013). Die Fibroblasten wurden jeweils 48 h mit 10 µM der zu testenden Substanz behandelt, mit Filipin gefärbt und anschließend das LSO-Kompartiment-Verhältnis berechnet, um den Cholesterolgehalt zu beurteilen (Abbildung 27). Die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) oder Abirateronacetat (#6) führte zu einer signifikanten Reduktion des Fluoreszenzsignals in den Filipin-gefärbten NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten, was anhand von weniger, sowie kleineren und schwächer fluoreszierenden Vesikeln sichtbar ist (Abbildung 27A). Die Quantifizierung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses bestätigte diesen visuellen Eindruck und zeigte signifikant reduzierte Werte nach Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) oder Abirateronacetat (#6), was einen verringerten Cholesterolgehalt um bis zu 92 % belegt (Abbildung 27B).

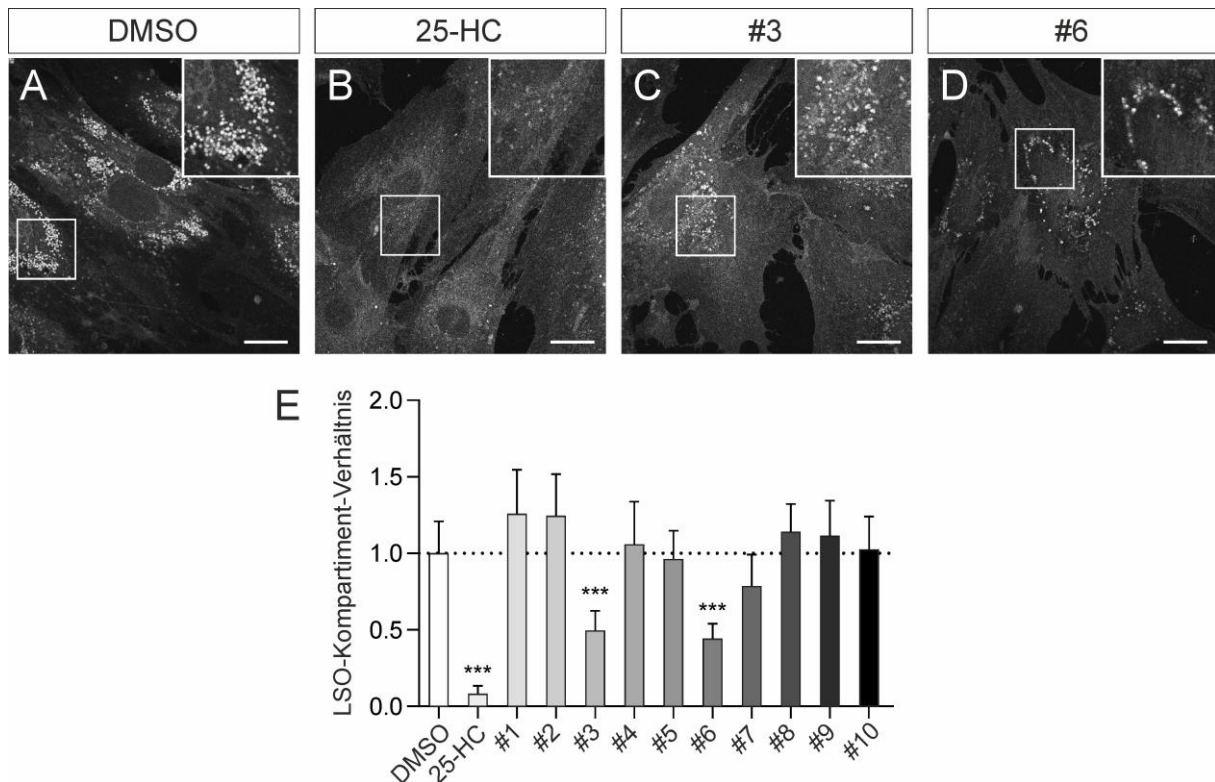


Abbildung 27: Analyse des Cholesterolgehalts in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten nach Behandlung mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen. Die NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1) wurden 48 h lang mit 10 μ M der jeweiligen Substanz (25-HC, potentielles pharmakologisches Chaperon #1-#10) behandelt und mit Filipin gefärbt. (A-D) Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass die Fibroblasten nach Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) deutlich weniger, sowie kleinere und weniger stark fluoreszierende Vesikel aufweisen, was auf einen reduzierten Cholesterolgehalt in den Lysosomen der Zellen hindeutet. Maßstab 20 μ m. (E) Die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) führt zu einer Reduktion des intrazellulären Cholesterolgehalts. (Mittelwert \pm SD; N=8; *** = $p < 0,001$ zur DMSO-Kontrolle).

Nachfolgend wurde untersucht, ob dieser reduzierte Cholesterolgehalt auf eine veränderte NPC1-Proteinexpression zurückzuführen ist. Wie auf dem repräsentativen Western Blot (Abbildung 28A) zu sehen ist, führt die Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) zu einer sichtbaren Zunahme der Endo H-resistenten Fraktion des NPC1-Proteins, was darauf hindeutet, dass durch die Wirkung dieser Substanzen ein Teil der mutierten NPC1-Proteinmenge über das ER hinaus transportiert wurde. Die Quantifizierung der NPC1-Glykoformen zeigt eine signifikante Zunahme der Endo H-resistenten NPC1-Proteinfraktion von $36,9 \pm 5,2$ % auf $54,0 \pm 5,6$ % nach Behandlung mit 25-HC bzw. auf $51,3 \pm 5,5$ % nach Behandlung mit Abirateronacetat (#6) (Abbildung 28C). Quinestrol (#3) hatte dagegen keinen Einfluss auf die Endo H-resistente NPC1-Proteinfraktion. Die Gesamtmenge des NPC1-Proteins nach Behandlung mit den Substanzen blieb unverändert (Abbildung 28B).

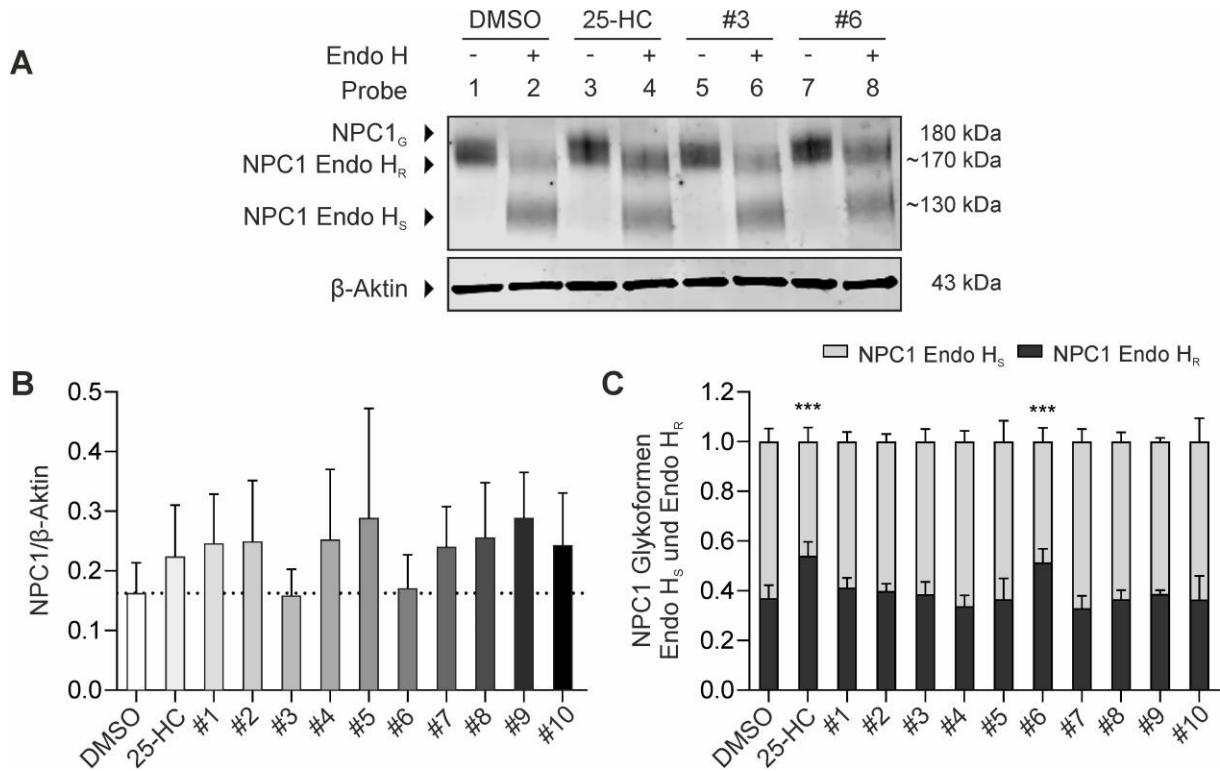


Abbildung 28: Analyse des NPC1-Proteins in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten nach Behandlung mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen. (A) Die Zellysate wurden mittels Western Blot auf die Expression von NPC1 untersucht. In den unverdauten Proben 1, 3, 5 und 7 konnte das NPC1-Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 180 kDa detektiert werden. Nach Verdau der Zellysate mit Endo H (Proben 2, 4, 6 und 8) waren zwei NPC1-Proteinbanden sichtbar: die Endo H-resistente NPC1-Proteinfraktion bei etwa 170 kDa und die Endo H-sensitive Proteinfraktion bei etwa 130 kDa, die im ER zurückgehalten wird. β-Aktin wurde als Referenzprotein genutzt. **(B)** Keine der getesteten Substanzen führte zu einer veränderten Gesamtmenge des NPC1-Proteins. (N=4-11). **(C)** Nach Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) wurde eine signifikante Erhöhung der Endo H-resistenten NPC1-Proteinfraktion gemessen. (Mittelwert ± SD; N=4-8; *** = p < 0,001 zur DMSO-Kontrolle).

Um festzustellen, ob diese Beobachtungen mit einer Korrektur der intrazellulären Lokalisation des mutierten NPC1-Proteins in den lysosomalen Kompartimenten einhergehen, wurden Kollokalisationsanalysen von NPC1 und dem lysosomalen Marker LAMP2 durchgeführt (Abbildung 29). Nach Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) ist eine deutliche Zunahme des NPC1-Signals (grün) zu erkennen, welches mit den LAMP2-positiven Vesikeln, die den Lysosomen der Zelle entsprechen, koloalisieren (Abbildung 29A). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Western Blot-Analyse (Abbildung 28B), wurden signifikant erhöhte Pearson-Korrelationskoeffizienten nach Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) gemessen (Abbildung 29B). Die Behandlung mit Quinestrol (#3) führte dagegen zu keinem signifikanten Anstieg der Kollokalisation von NPC1 und LAMP2.

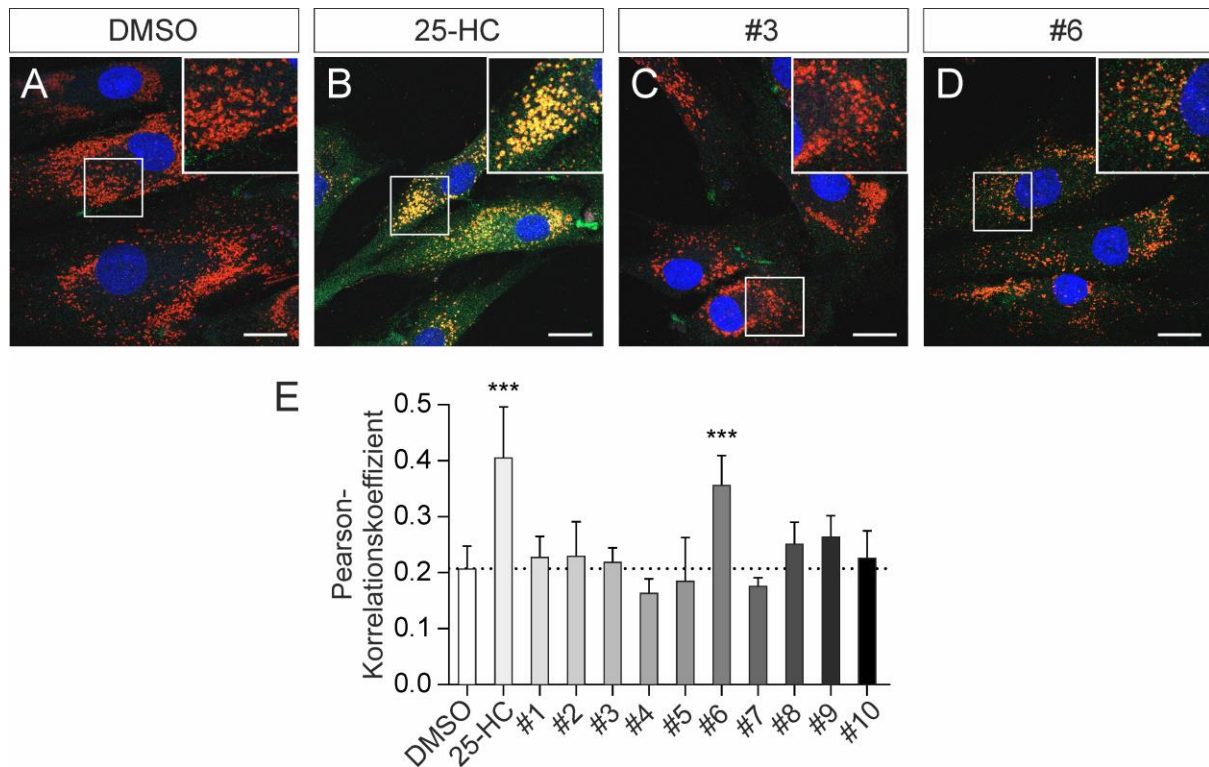


Abbildung 29: Kolokalisationsanalyse in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten nach Behandlung mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen. (A-D) Die konfokalen Mikroskopieaufnahmen zeigen die Lokalisation von NPC1 (grün) und LAMP2 (rot) in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten nach 48 h Behandlung mit 10 μ M 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Maßstab 20 μ m. (E) Die Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) führt zu einem signifikanten Anstieg des Pearson-Korrelationskoeffizienten (Mittelwert \pm SD; N=8; *** = $p < 0,001$ zur DMSO-Kontrolle).

Zusammengefasst führte die Behandlung mit Quinestrol (#3) und Abirateronacetat (#6), zu einer signifikanten Reduktion der Cholesterollakkumulation in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1). Die Reduktion des Cholesterolgehalts in Abirateronacetat-behandelten Zellen war auf die Zunahme der Endo H-resistenten NPC1-Proteinfraktion und damit einhergehend einer Korrektur der NPC1-Lokalisation in den Lysosomen der Zelle zurückzuführen. Das lässt vermuten, dass Abirateronacetat, ähnlich wie 25-HC, als pharmakologisches Chaperon die korrekte Faltung des mutierten NPC1-Proteins unterstützt, und somit dessen Transport zur lysosomalen Zellmembran ermöglicht, wodurch die Cholesterollakkumulation reduziert wird. Interessanterweise konnte in den Quinestrol-behandelten Zellen trotz Reduktion des Cholesterolgehalts um 50 % weder eine Veränderung der NPC1-Proteinexpression noch der subzellulären Lokalisation in den Lysosomen beobachtet werden.

4.5.3 Behandlung der NPC1^{I1061T/I1061T}-NDZs und -HLZs

Wie bereits gezeigt wurde, spiegeln die NDZs und HLZs die pathophysiologischen Merkmale des NP-C1, in Form von einem verminderten NPC1-Proteingehalt, einer gestörten subzellulären Lokalisation des NPC1-Proteins und einer erhöhten intrazellulären Cholesterollakkumulation wider. Nachdem gezeigt wurde, dass Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) einen cholesterolreduzierenden Effekt in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten haben, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die NDZs und HLZs desselben Patienten ebenfalls auf die Behandlung mit Quinestrol (#3) und Abirateronacetat (#6) reagieren. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, führt die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) zu einer signifikanten Reduktion des Cholesterolgehalts in den NDZs. Weiterhin konnte eine Zunahme der Endo H-resistenten NPC1-Glykoform nachgewiesen werden (Abbildung 32C), während bei den NPC1-defizienten Fibroblasten kein statistisch signifikanter Unterschied diesbezüglich zu beobachten war (Abbildung 28C). Die Gesamtmenge des NPC1-Proteins blieb unverändert (Abbildung 32B). Die Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) führte außerdem zu einem Anstieg des NPC1-Proteins in den lysosomalen Kompartimenten der NDZs (Abbildung 31).

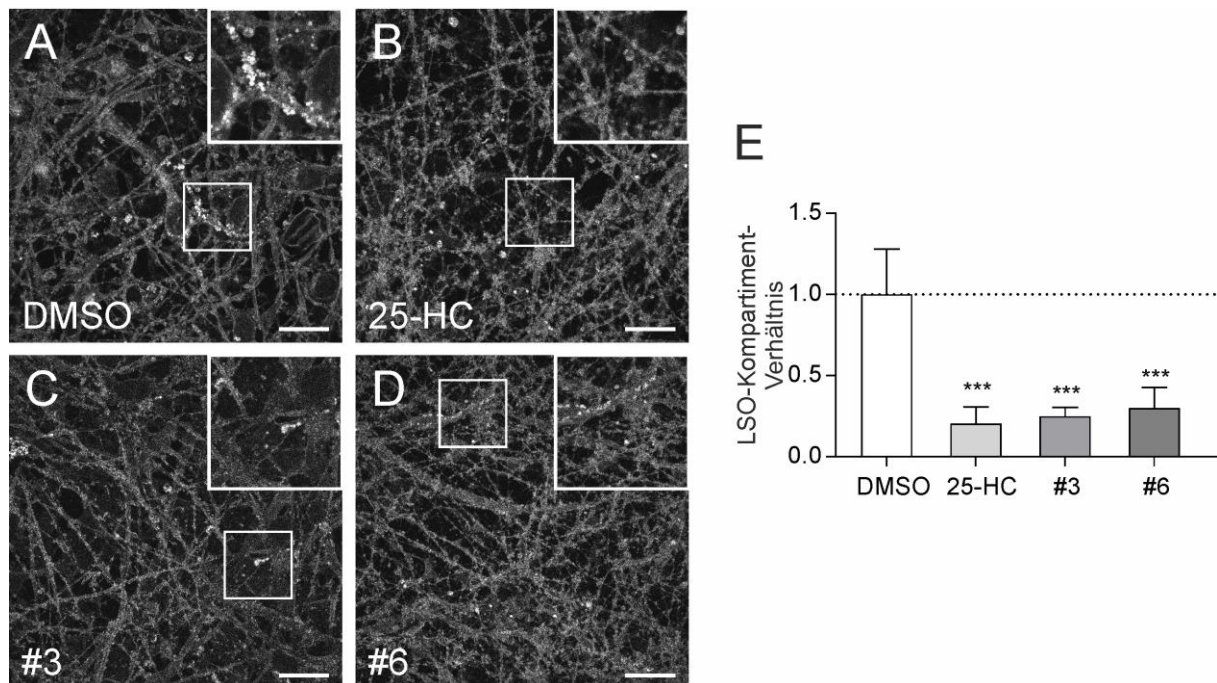


Abbildung 30: Analyse des Cholesterolgehalts in NPC1^{I1061T/I1061T}-NDZs nach Behandlung. (A-D) Die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) führt zu einer Reduktion der fluoreszierenden Vesikel in Filipin-gefärbten NDZs. Maßstab 20 µm. **(E)** Die quantitative Analyse des LSO-Kompartiment-Verhältnisses ergab eine Reduktion des Cholesterolgehalts nach Behandlung mit den Substanzen. (Mittelwert ± SD; N=8; *** = p < 0,001 zur DMSO-Kontrolle).

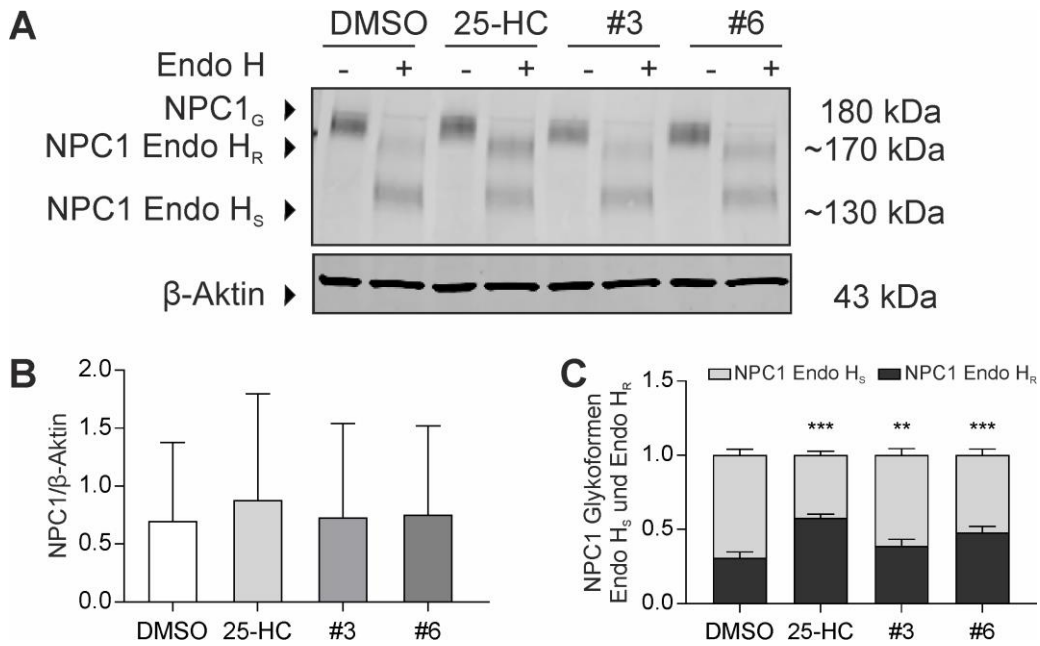


Abbildung 32: Analyse des NPC1-Proteins in NPC1^{I1061T/I1061T}-NDZs nach Behandlung. (A) Die Wirkung von 25-HC, Quinestrol (#3) und Abirateronacetat (#6) auf den NPC1-Proteingehalt wurde anhand von Western Blot Analysen untersucht. Es ist eine Zunahme der Endo H-resistenten NPC1-Proteinbanden nach Behandlung sichtbar. (B) Während keine Änderung der Gesamtmenge des NPC1-Proteins gemessen wurde, (C) führte die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) zu einer erhöhten Menge an Endo H-resistentem NPC1-Protein. (Mittelwert ± SD; N=6-7; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 zur DMSO-Kontrolle).

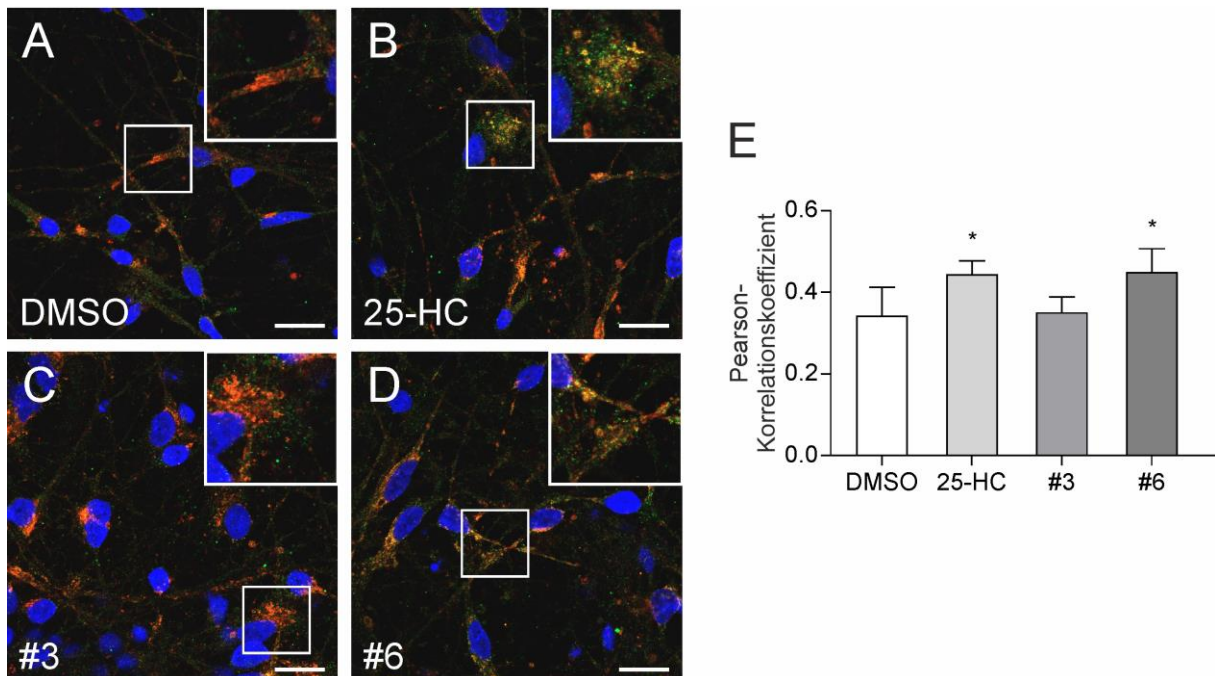


Abbildung 31: Kolokalisationsanalyse in NPC1^{I1061T/I1061T}-NDZs nach Behandlung. (A-D) Immunfluoreszenzfärbungen von NPC1 (grün) und dem lysosomalen Marker LAMP2 (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab 20 µm. (E) In den 25-HC- und Abirateronacetat (#6)-behandelten NDZs wurde ein erhöhter Pearson-Korrelationskoeffizient gemessen. (Mittelwert ± SD; N=4; * = p < 0,05 zur DMSO-Kontrolle).

In den NPC1^{I1061T/I1061T}-HLZs waren nach Behandlung mit den Substanzen vergleichbare Effekte wie in den NPC1^{I1061T/I1061T}-NDZs zu beobachten. Die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) führte zu einer signifikanten Reduktion des Cholesterolgehalts in den NPC1-defizienten HLZs (Abbildung 33). Während die Gesamtmenge des NPC1-Proteins unverändert blieb (Abbildung 35B), führte die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) zu einer Zunahme der Endo H-resistenten NPC1-Glykoform (Abbildung 35C). Außerdem wurde in den HLZs nach Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) ein Anstieg des NPC1-Proteins in den lysosomalen Kompartimenten nachgewiesen (Abbildung 34). Jedoch wurde ebenso wie in den Fibroblasten und den NDZs keine erhöhte lysosomale Lokalisation des mutierten NPC1^{I1061T}-Proteins nach Behandlung mit Quinestrol (#3) festgestellt (Abbildung 34).

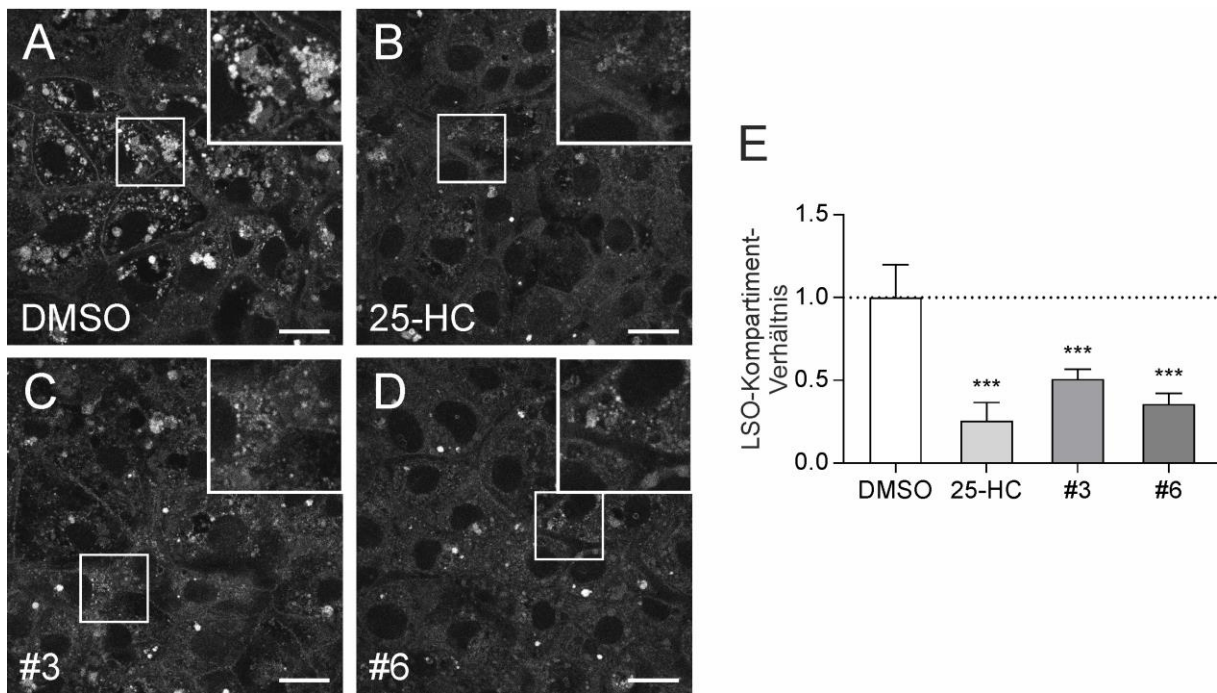


Abbildung 33: Analyse des Cholesterolgehalts in NPC1^{I1061T/I1061T} HLZs nach Behandlung. (A-D) Die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) führt zu einer Reduktion der Cholesterolakkumulation in Filipin-gefärbten HLZs. Maßstab 20 µm. (E) Die quantitative Analyse des LSO-Kompartiment-Verhältnisses ergab eine Reduktion des Cholesterolgehalts nach Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6). (Mittelwert ± SD; N=5; *** = p < 0,001 zur DMSO-Kontrolle).

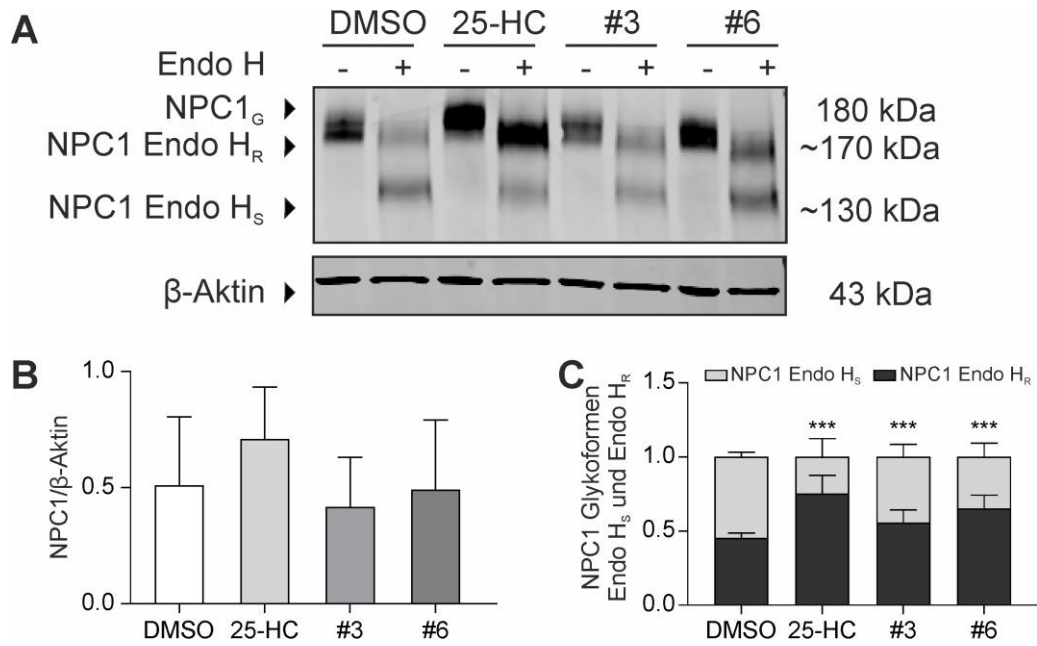


Abbildung 35: Analyse des NPC1-Proteins in NPC1^{I1061T/I1061T} HLZs nach Behandlung. (A) Der Western Blot zeigt die Analyse der Gesamtmenge des NPC1-Proteins (NPC1_G) und der NPC1-Glykoformen, Endo H-resistent (Endo H_R) und Endo H-sensitiv (Endo H_S). (B) Während keine Änderung der Gesamtmenge des NPC1-Proteins gemessen wurde, (C) führte die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) zu einer erhöhten Menge an Endo H-resistentem NPC1-Protein. (Mittelwert ± SD; N=4; *** = p < 0,001 zur DMSO-Kontrolle).

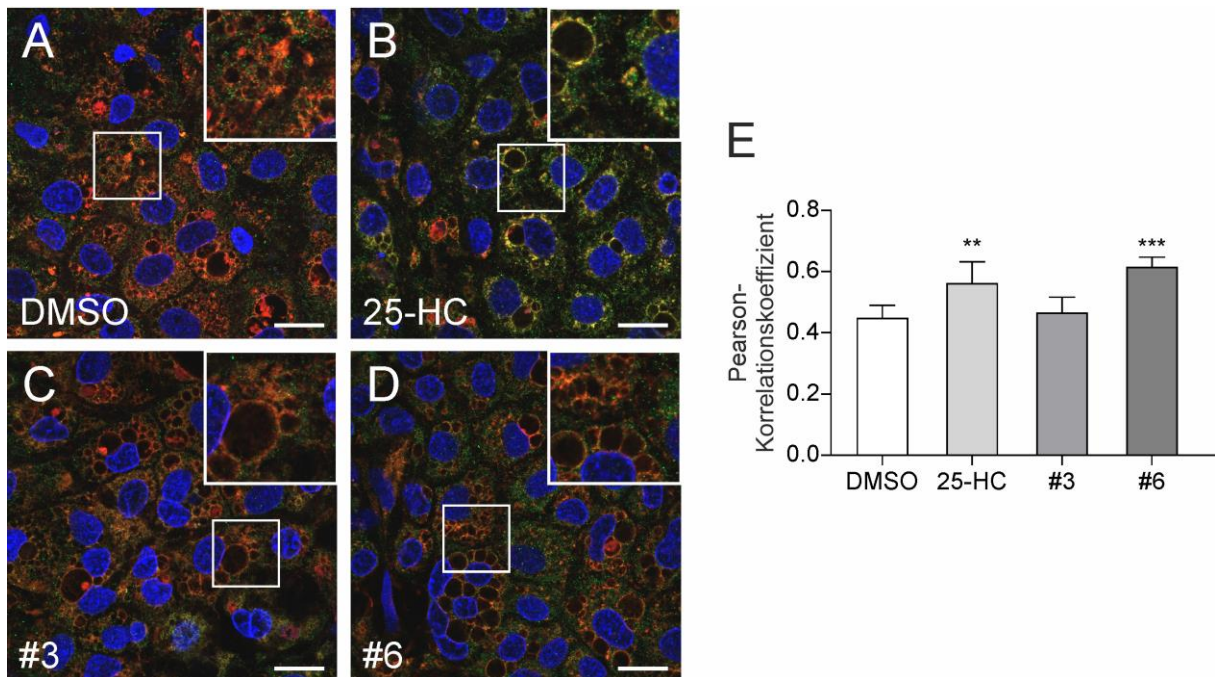


Abbildung 34: Kolokalisationsanalyse in NPC1^{I1061T/I1061T} HLZs nach Behandlung. (A-D) Immunfluoreszenzfärbungen von NPC1 (grün) und dem lysosomalen Marker LAMP2 (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab 20 µm. (E) Die Behandlung mit 25-HC bzw. Abirateronacetat (#6) führt zu einem Anstieg des Pearson-Korrelationskoeffizienten. (Mittelwert ± SD; N=6; ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 zur DMSO-Kontrolle).

4.5.4 Wirksamkeit pharmakologischer Chaperone in Mutanten mit *missense*-Mutation

Die Anwendbarkeit von pharmakologischen Chaperonen für NP-C1 ist zumeist auf *missense*-Mutationen beschränkt, die zwar aufgrund der Fehlfaltung im ER zurückgehalten und vorzeitig abgebaut werden, aber dennoch eine Restfunktionalität aufweisen und bei korrekter Lokalisation in der lysosomalen Membran funktionell aktiv wären. Da die meisten der bisher identifizierten krankheitsverursachenden NP-C1 Mutationen *missense*-Mutationen sind, könnte die Verwendung von pharmakologischen Chaperonen für eine Vielzahl von NP-C1 Patienten von Vorteil sein. Die Zugänglichkeit einzelner *missense*-Mutationen für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen muss jedoch individuell geprüft werden. Daher wurde die Wirksamkeit der in den NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1) bestätigten *hit compounds*, Quinestrol (#3) und Abirateronacetat (#6), auch in den Fibroblasten der Zelllinien Mut 2, Mut 3 und Mut 4 getestet (Abbildung 36). Die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) führte in allen getesteten Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion des Cholesterolgehalts, wie anhand von Filipinfärbungen gezeigt werden konnte (Abbildung 36A,B,C). Die Analyse des mutierten NPC1-Proteins mittels Western Blot konnte zeigen, dass dies in Mut 2 auf einen Anstieg des Endo-H resistenten NPC1-Proteins zurückzuführen war (Abbildung 36G). In den Zelllinien Mut 3 bzw. Mut 4, war eine nicht signifikante Erhöhung des Endo H-resistenten NPC1-Proteins zu beobachten (Abbildung 36H,I). Es wurden keine Veränderungen der Gesamtmenge der NPC1-Proteine festgestellt (Abbildung 36D,E,F). Die Behandlung mit dem bekannten NPC1-Chaperon 25-HC führte in allen getesteten Zelllinien Mut 2, Mut 3 und Mut 4 zu einem signifikanten Anstieg des NPC1-Proteins in den Lysosomen der Zellen (Abbildung 36J,K,L). In Abirateronacetat-behandelten Fibroblasten der Mut 2 wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg festgestellt. In den NPC1-defizienten Zelllinien Mut 3 und Mut 4 führte die Behandlung mit Abirateronacetat (#6) zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg des Pearson-Korrelationskoeffizienten (Abbildung 36J,K,L).

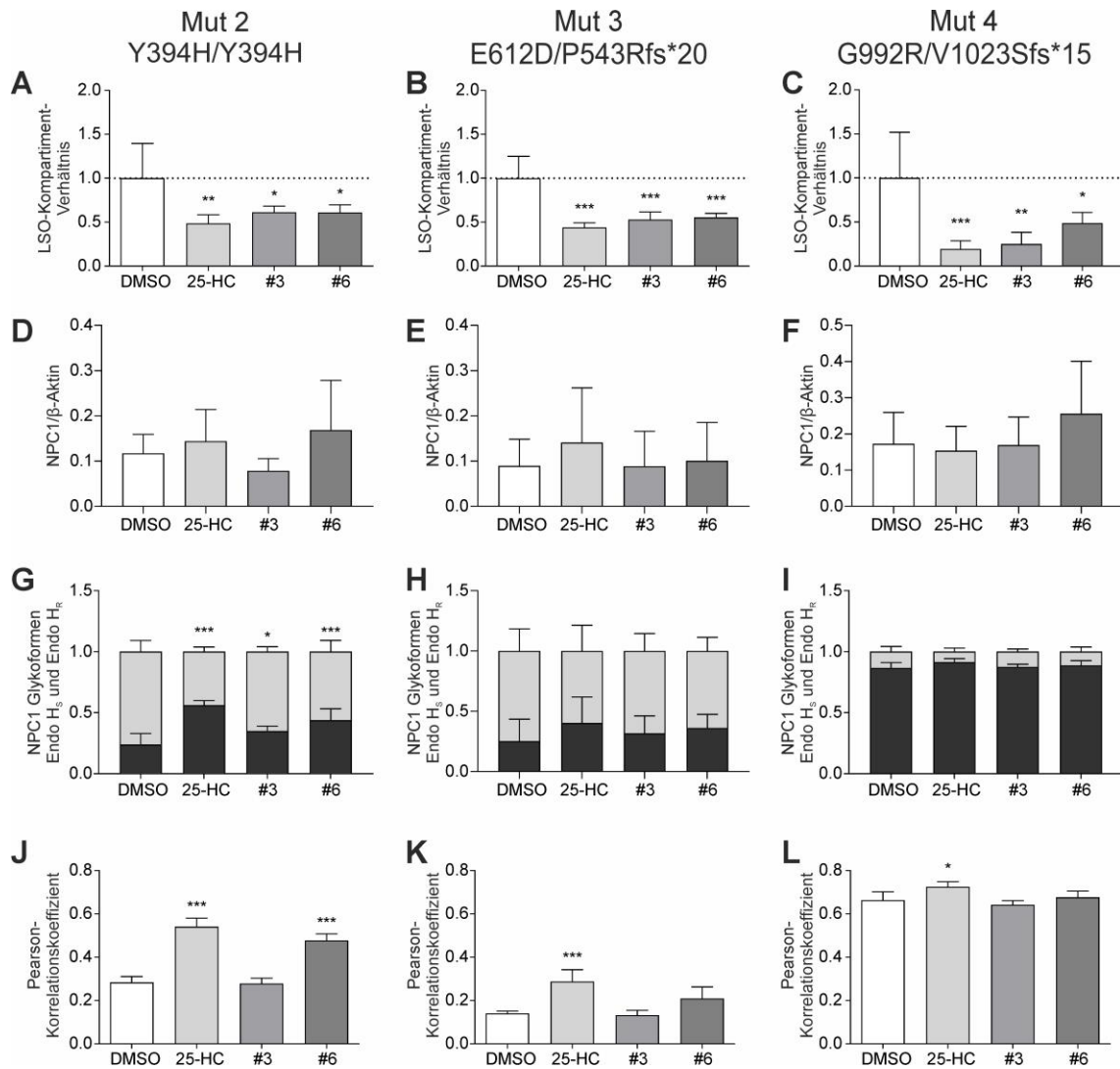


Abbildung 36: Behandlung NPC1-defizienter Zelllinien mit *missense*-Mutationen mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen. (A,B,C) Anhand von Filipinfärbungen konnte eine signifikante Reduktion des Cholesterolgehalts in allen NPC1-defizienten Zelllinien nach Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) festgestellt werden. (N=5). (D,E,F) In keinen der getesteten NPC1-defizienten Zelllinien führte die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) zu einer veränderten Gesamtmenge des NPC1-Proteins. (N=4-7). (G,H,I) Anhand von Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 25-HC, Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) zu einem Anstieg der Endo H-resistenten NPC1-Proteinmenge in Fibroblasten der Mut 2 führt. (N=4-7). (J,K,L) Die Kolokalisationsanalysen von NPC1 und LAMP2 ergaben, dass die Behandlung mit 25-HC in allen getesteten NPC1-defizienten Zelllinien zu einem Anstieg des NPC1-Proteins in den Lysosomen führt. In Mut 2 führte außerdem die Behandlung mit Abirateronacetat (#6) zu einem Anstieg der NPC1/LAMP2-Kolokalisation. (Mittelwert ± SD; N=4; * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle).

Die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in Abbildung 37 schematisch zusammengefasst.

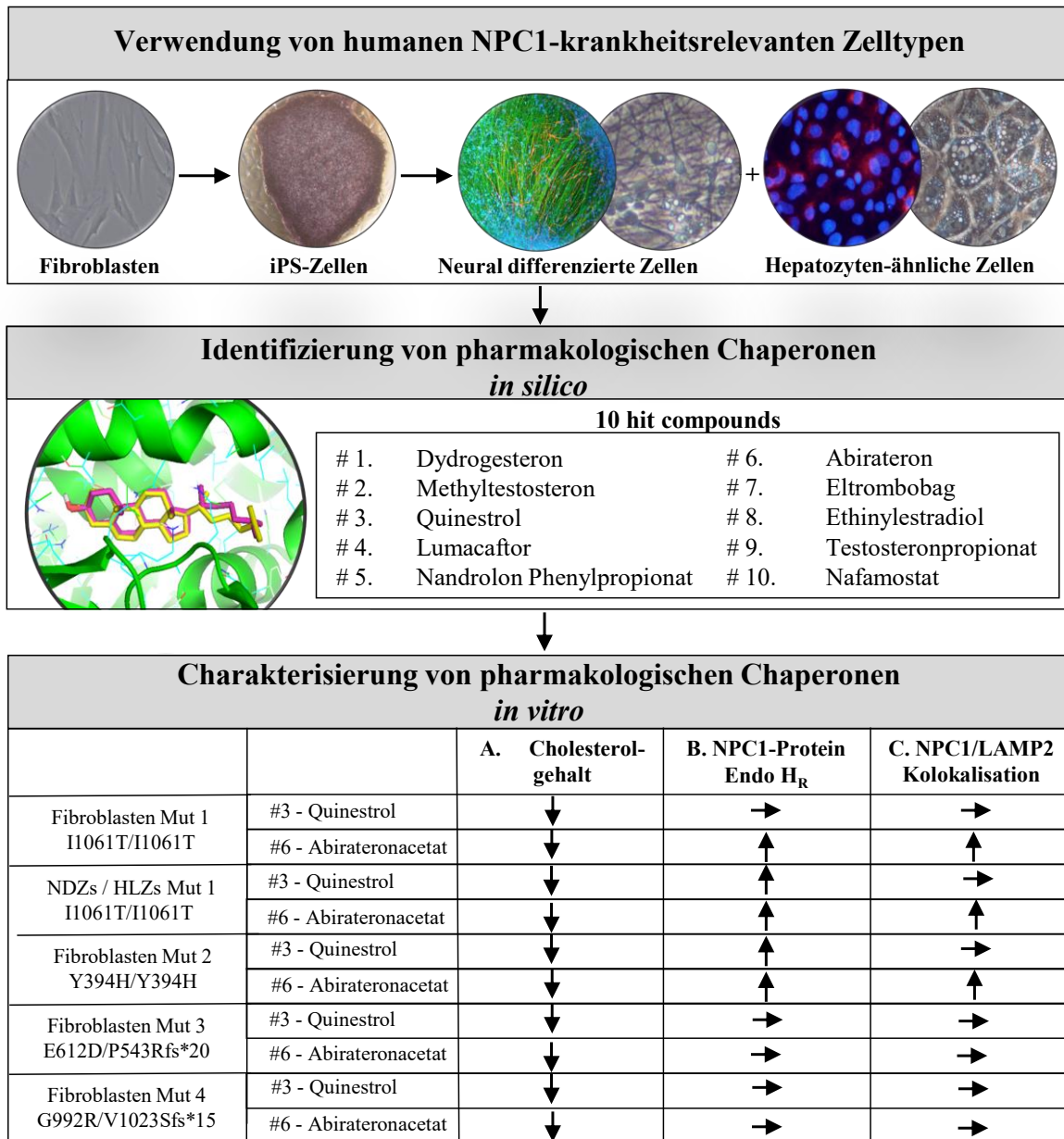


Abbildung 37: Darstellung der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit. Als Grundlage für die *in vitro* Untersuchungen der pharmakologischen Chaperone wurden aus patientenspezifischen Fibroblasten iPS-Zellen generiert, die erfolgreich in neural differenzierte und Hepatozyten-ähnliche Zellen differenziert wurden. In Vorarbeiten wurden über ein *in silico* Verfahren zehn hit compounds identifiziert, die eine hohe Bindungsaffinität zu der NTD des NPC1-Proteins aufweisen. Zwei dieser Substanzen, Quinestrol (#3) und Abirateronacetat (#6), hatten einen cholesterolreduzierenden Effekt in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1). Die Behandlung mit Abirateronacetat (#6) führte außerdem zu einem Anstieg der Endo H-resistenten NPC1-Glykoform und zu einer Korrektur der lysosomalen NPC1-Lokalisation. Die Wirkung von Quinestrol und Abirateronacetat wurde in den NPC1^{I1061T/I1061T}-NDZs und -HLZs bestätigt. Die Behandlung von Fibroblasten der Linien Mut 2, Mut 3 und Mut 4 mit Quinestrol (#3) bzw. Abirateronacetat (#6) führte zu einer Reduktion der Cholesterollakkumulation. ↓ = signifikante Reduktion; ↑ = signifikante Erhöhung; → = keine signifikante Veränderung.

5 Diskussion

5.1 Pathophysiologie des Morbus Niemann-Pick Typ C1

Zunächst sollte untersucht werden, welchen Einfluss die NPC1-Mutationen auf die Zellphysiologie der NPC1-defizienten Fibroblasten, NDZs und HLZs haben. Im Fokus stand dabei die Untersuchung von drei wesentlichen Aspekten in der Pathophysiologie von NP-C1: der intrazelluläre Cholesterolgehalt, die NPC1-Proteinexpression sowie die subzelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins.

Cholesterolakkumulation in NPC1-defizienten Zellen

Die lysosomale Cholesterolakkumulation gilt als Hauptmerkmal des NP-C1 und wurde in einer Vielzahl von *in vitro* NP-C1-Zellmodellen nachgewiesen, einschließlich patientenspezifischen Fibroblasten (Pentchev et al. 1985), iPS-Zellen (Trilck et al. 2013) und iPS-Zellderivaten, wie neuronalen Stammzellen (Sung et al. 2017), neuronal differenzierten Zellen (Yu et al. 2014a) sowie Hepatozyten-ähnlichen Zellen (Maetzel et al. 2014; Soga et al. 2015).

In filipingefärbten NPC1-defizienten Fibroblasten wird die lysosomale Anhäufung von Cholesterol typischerweise als punktförmiges, fluoreszierendes Muster im perinukleären Bereich beschrieben (Vanier und Latour 2015; Sitarska und Ługowska 2019). Dieses charakteristische Verteilungsmuster und eine signifikante Cholesterolakkumulation konnte auch in den in dieser Arbeit verwendeten NPC1-defizienten Fibroblastenzelllinien gezeigt werden. In Bezug auf die Zelllinie Mut 4 wurde ein varianter biochemischer Phänotyp festgestellt, der in bis zu 15 % aller NP-C1 Patienten beobachtet wird (Vanier 2010). Zellen mit einem varianten biochemischen Phänotyp sind durch eine schwache Filipinfärbung und nahezu normale Cholesterolveresterungsraten gekennzeichnet (Vanier et al. 1991; Argoff et al. 1991). Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit für diese Mutante eine sehr geringe Cholesterolakkumulation in Fibroblasten, sowie in NDZs und HLZs nachgewiesen.

In den neural differenzierten Zellen waren die Cholesterolakkumulationen in Übereinstimmung mit anderen Studien sowohl in den Somata als auch in Verzweigungen der neural differenzierten Zellen zu beobachten (Trilck et al. 2013; Maetzel et al. 2014), wobei der Gesamtcholesterolgehalt im Vergleich zu den Kontrollzelllinien insgesamt nur geringfügig erhöht war. Dies ist konsistent mit Studien aus dem BALB/c-Npc1^{nih}-Mausmodell, die zeigen, dass im Gehirn vorrangig Glykosphingolipide, vor allem die Ganglioside GM2 und GM3, aber auch Glucosylceramid und Lactosylceramid akkumulieren (te Vruchte et al. 2004; Lloyd-Evans

und Platt 2010). Die geringe bis fehlende Cholesterolakкумуляtion im Gehirn wurde im NP-C1 Mausmodell durch eine altersabhängige Demyelinisierung erklärt, die mit zunehmendem Alter der Tiere sogar zu einer Reduktion des Cholesterolgehalts im Gehirn führen kann (Xie et al. 2000). Eine weitere Erklärung liefert eine Studie, in der ein Cholesterolungleichgewicht zwischen neuronalen Zellkörpern und distalen Axonen nachgewiesen wurde (Karten et al. 2002). In kultivierten Neuronen von NPC1-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass sich Cholesterol zwar in den Zellkörpern anreichert, aber in den distalen Axonen vermindert ist, was auf einen defekten anterograden Transport des Cholesterols hindeutet (Karten et al. 2002). In entwicklungsbiologisch jungen, humanen iPS-zellbasierten neuronalen Zellmodellen wird zumeist eine erhöhte Gesamtcholesterolmenge beschrieben (Trilck et al. 2013; Yu et al. 2014a; Maetzel et al. 2014). Nur in einer Studie wurde kein erhöhter Cholesterolgehalt in iPS-zellbasierten neuronalen Stammzellen und Neuronen nachgewiesen (Efthymiou et al. 2015). Dies könnte durch das Fehlen einer geeigneten externen Cholesterolquelle im verwendeten Zellkultursystem erklärt werden. Tatsächlich sind Neurone nur sehr bedingt in der Lage selbst Cholesterol zu synthetisieren. Sie sind daher auf Astrozyten angewiesen, von denen sie das Cholesterol in Form von Lipoproteinen endozytotisch aufnehmen (Vance 2012; Zhang und Liu 2015). In reinen neuronalen Kulturen entfällt diese Möglichkeit. Darüber hinaus werden Neurone zumeist serumfrei kultiviert. Die Supplementierung mit einer alternativen Cholesterolquelle, wie das in dieser und anderen Arbeiten verwendete LDL (Yu et al. 2014a; Soga et al. 2015), ist daher Voraussetzung für die Untersuchung der Cholesterolakкумуляtion in neuronalen Zellkulturen.

Neben der primären Akкумуляtion von freiem Cholesterol resultiert eine NPC1-Defizienz in Patienten und im Mausmodell in der Sequestrierung von sekundären Lipiden wie Glykosphingolipiden (Glucosylceramid, Lactosylceramid und die Ganglioside GM2 und GM3), Phospholipiden (Sphingomyelin und Bis(monoacylglycero)phosphat) und freien Sphingoidbasen (Sphingosin und Sphinganin) (Walkley und Vanier 2008). In peripheren Geweben, wie der Leber und der Milz, ist eine moderate Akкумуляtion dieser genannten Lipide beschrieben, wobei keines vorrangig akkumuliert (Vanier 2010). Die Akкумуляtion von freiem Cholesterol wurde auch in der vorliegenden Arbeit in den NPC1-defizienten HLZs gezeigt und entspricht dem perinukleären Verteilungsmuster, das in anderen iPS-zellbasierten hepatischen Modellen beschrieben wurde (Maetzel et al. 2014; Soga et al. 2015).

Zusammengefasst weisen alle getesteten NPC1-defizienten Zelllinien eine signifikante Cholesterollakkumulation auf, die sowohl in den patientenspezifischen Fibroblasten als auch in den daraus abgeleiteten NDZs und HLZs zu beobachten war. Die genannten Zellmodelle spiegeln somit ein wesentliches pathophysiologisches Merkmal von NP-C1 wider und sind daher für die Testung von cholesterolreduzierenden Substanzen geeignet.

Expression und subzelluläre Lokalisation der NPC1-Proteinvarianten

Die meisten NPC1-Mutationen führen zu einer signifikanten Reduktion der NPC1-Proteinmenge (Zampieri et al. 2012; Shamma et al. 2019). In Fibroblasten, welche die NPC1-Mutation I1061T in Homozygotie tragen, wurde eine mutationsbedingte Fehlfaltung als molekulare Grundlage der Krankheitsentstehung identifiziert (Gelsthorpe et al. 2008). *Molecular Docking* Simulationen zeigten, dass das mutierte NPC1^{I1061T}-Protein im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine bemerkenswerte Instabilität aufweist (Macías-Vidal et al. 2014). In patientenspezifischen Fibroblasten wurde ein beschleunigter proteasomaler Abbau sowie ein ineffizienter Transport des mutierten NPC1^{I1061T}-Proteins entlang des sekretorischen Wegs beschrieben, wodurch letztendlich die intrazellulär verfügbare Menge an funktionellem NPC1-Protein in der lysosomalen Membran reduziert ist (Gelsthorpe et al. 2008). In Übereinstimmung mit dieser und anderen Studien (Shamma et al. 2019; Tiscione et al. 2019; Rauniyar et al. 2015) wurde in der vorliegenden Arbeit in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1) eine signifikante Reduktion der NPC1^{I1061T}-Proteinmenge um 85 % gemessen. Die NPC1^{I1061T}-Proteinexpression in anderen, krankheitsrelevanten Zelltypen, wie Neuronen und Hepatozyten, wurde bisher nur im *Npc1*^{tm(I1061T)^{Dso}}-Mausmodell untersucht, wobei in Leber- und Hirnlysaten ein ähnliches Ausmaß der NPC1^{I1061T}-Proteinreduktion gezeigt wurde (Praggastis et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte diese signifikante Reduktion erstmals auch in humanen NDZs und HLZs nachgewiesen werden. Die zuvor noch nicht beschriebene NPC1-Mutation Y394H (Mut 2) führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der NPC1-Proteinmenge. In Bezug auf die Analyse der NPC1-Proteinexpression in den kombiniert heterozygoten Linien Mut 3 und Mut 4, die jeweils eine *missense*- und eine *frameshift*-Mutation tragen, sei erwähnt, dass der in dieser Arbeit verwendete NPC1-Antikörper am C-Terminus des NPC1-Proteins bindet. *Frameshift*-Mutationen, die aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons ein verkürztes NPC1-Protein exprimieren, fehlt dieser C-Terminus und werden folglich nicht detektiert. Die Detektion des NPC1-Proteins in Western Blot- und Kolokalisationsanalysen entspricht also jeweils dem NPC1-Protein des Allels mit *missense*-Mutation, NPC1^{E612D} (Mut 2) oder NPC1^{G992R} (Mut 3). Erwartungsgemäß war die NPC1^{E612D}-Proteinmenge (Mut 3) signifikant

reduziert. Die NPC1^{G992R}-Proteinmenge (Mut 4) war dagegen nicht signifikant niedriger als die Proteinmenge in den Kontrollzellen. Eine Erklärung dafür liefern Untersuchungen an NPC1-patientenspezifischen Fibroblasten, die zeigen, dass zwei Allele nicht unbedingt in gleichem Maße exprimiert werden, ein Phänomen, das als allelisches Ungleichgewicht bezeichnet wird. Während die allelische Expression von zwei *missense*-Mutationen zumeist bei 50/50 liegt, ist das Expressionsverhältnis bei Kombinationen aus einer *frameshift*- und einer *missense*-Mutation in der Regel zugunsten der *missense*-Mutation verschoben (Musalkova et al. 2020). Des Weiteren scheint die Mutation G992R unabhängig von der Mutation auf dem zweiten Allel mit einem varianten biochemischen Phänotyp assoziiert zu sein und führt in patientenspezifischen Fibroblasten sowohl in Homozygotie als auch in Kombination mit einer *frameshift*-Mutation zu einer wildtypähnlichen Expression des NPC1-Proteins (Millat et al. 2001).

Zusammengefasst führen also mit Ausnahme der Mutation G992R alle in dieser Arbeit getesteten *missense*-Mutationen zu einer signifikanten Reduktion der NPC1-Proteinmenge. Die reduzierte NPC1-Proteinmenge ist häufig die Folge eines erhöhten proteasomalen Abbaus (Gelsthorpe et al. 2008; Zampieri et al. 2012). Die Behandlung der NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten mit dem Proteasominhibitor MG132 führte zu einer Verdopplung der NPC1^{I1061T}-Proteinmenge in Mut 1 und bestätigt somit einen erhöhten proteasomalen Abbau. Darüber hinaus konnte dies erstmals auch für die mutierten Proteine NPC1^{Y394H} und NPC1^{E612D} der NPC1-defizienten Zelllinien Mut 2 bzw. Mut 3 gezeigt werden.

Neben der NPC1-Proteinmenge wurde außerdem der Transport der NPC1-Varianten entlang des sekretorischen Wegs bis zu der lysosomalen Membran untersucht. Dafür wurde ein biochemischer Assay mit Endoglykosidase H genutzt, ein Enzym, das nur bestimmte N-Glykane des Glykoproteins NPC1 schneidet und somit einen ersten Hinweis auf die intrazelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins erlaubt. Endo H unterscheidet zwischen der mannosereichen, unreifen Form von NPC1-Proteinen, die sich im ER oder im frühen Sekretionsweg befinden, und ihren komplex glykosylierten reifen Gegenstücken, die im medialen Golgi-Apparat verarbeitet wurden (Varki et al. 2017). Nach Verdau mit Endo H wurden in Übereinstimmung mit anderen Studien eine schnell migrierende, Endo H-resistente Glykoform und eine langsam migrierende, Endo H-sensitive Glykoform des NPC1^{I1061T}-Proteins detektiert (Gelsthorpe et al. 2008; Schultz et al. 2018; Shammas et al. 2019; Wang et al. 2019; Brogden et al. 2020). Dabei war der Großteil der NPC1^{I1061T}-Proteinmenge Endo H-sensitiv und bestätigt damit Beobachtungen aus Untersuchungen in patientenspezifischen

Fibroblasten, in denen der Großteil der endogenen NPC1^{I1061T}-Proteinmenge im ER zurückgehalten wird (Gelsthorpe et al. 2008; Schultz et al. 2018). In einem heterologen Zellmodell, bei dem NPC1-Flag Konstrukte in COS-1-Zellen überexprimiert wurden, wurde sogar eine vollständige Retention des NPC1^{I1061T}-Proteins im ER und somit ein schwerwiegenderer Phänotyp gezeigt (Shammas et al. 2019). Allerdings ist zu beachten, dass eine starke Überexpression und/oder GFP-Tagging leichter zu einer ER-Retention führen als eine geringe Expression des nicht getaggten/endogenen Proteins (Blom et al. 2003). Die genannten Unterschiede könnten daher auf die unterschiedlichen Zellmodelle zurückzuführen sein und unterstreichen den Nutzen von patientenspezifischen Zellmodellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, da sie die Untersuchung der endogenen Expression von NPC1-Proteinvarianten ermöglichen.

Ähnlich der Mutation I1061T sind auch die *missense*-Mutationen Y394H und E612D der NPC1-defizienten Zelllinien Mut 2 bzw. Mut 3 hauptsächlich Endo H-sensitiv, was darauf hindeutet, dass auch sie, möglicherweise aufgrund einer Fehlfaltung, im ER zurückgehalten werden. Alle drei NPC1-Varianten sind in der mittleren luminalen Domäne oder in der Cystein-reichen Schleife lokalisiert; zwei Domänen, in denen Mutationen häufig zu einem besonders ineffizienten Transport entlang des sekretorischen Wegs führen (Wang et al. 2019). Eine Ausnahme bildet erneut das NPC1^{G992R}-Protein der Mut 4, dessen Mutation ebenfalls in der Cystein-reichen Schleife lokalisiert ist, aber ähnlich des Wildtyp-NPC1-Proteins, hauptsächlich Endo H-resistent ist. Das lässt vermuten, dass es der ERAD entkommt, das ER verlässt und über den Golgi-Apparat, vermutlich bis zu den Lysosomen transportiert wird. Die Kolokalisationsanalysen bestätigten diese Annahme und zeigen eine hohe Kolokalisation des NPC1^{G992R}-Proteins mit dem lysosomalen Marker LAMP2. Für die Proteinvarianten NPC1^{I1061T}, NPC1^{Y394H} und NPC1^{E612D} der Mut 1, Mut 2 bzw. Mut 3 wurden dagegen sehr niedrige Kolokalisationswerte gemessen. Dies ist konsistent mit Untersuchungen an NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten, in denen anhand von Kolokalisationsanalysen ebenfalls eine gestörte subzelluläre Lokalisation des NPC1-Proteins beschrieben wurde (Yu et al. 2012).

Zusammengefasst führen die Mutationen I1061T, Y394H und E612D der Mut 1, Mut 2 bzw. Mut 3 zu einer signifikanten Reduktion der NPC1-Proteinmenge, die auf einem erhöhten proteasomalen Abbau beruht. Die reduzierten Endo H-resistenten NPC1-Glykoformen und die verminderten Kolokalisationswerte von NPC1 und LAMP2 zeigen, dass die intrazellulär verfügbare Menge des NPC1-Proteins in den Lysosomen vermindert ist, was zu den zuvor beschriebenen Cholesterollakkumulationen führt. Für die Zelllinie Mut 4 wurden phänotypische

Ausprägungen beschrieben, die sich grundsätzlich von dem beobachteten pathophysiologischen Profil der Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 unterscheiden. Die NPC1^{G992R}-Variante zeigte eine wildtypähnliche Proteinexpression sowie einen effizienten Transport entlang des sekretorischen Wegs bis hin zu den Lysosomen, was zu geringen Cholesterollakkumulationen führt. Im Folgenden wird daher die G992R als ursächliche Mutation für den beobachteten varianten biochemischen Phänotyp diskutiert. Außerdem werden bekannte Therapiemöglichkeiten von NPC1-Patienten mit variantem biochemischem Phänotyp besprochen und es wird der Frage nachgegangen, ob die pharmakologische Chaperontherapie in diesen seltenen Fällen zur Anwendung kommen kann.

Varianten biochemischer Phänotyp

Der variante biochemische Phänotyp ist mit bestimmten Mutationen assoziiert, darunter unter anderem D948N, R958Q, R978C, G992W, S1004L und P1007A (Ribeiro et al. 2001; Sun et al. 2001; Millat et al. 2001). Interessanterweise sind solche Mutationen fast ausschließlich in der Cystein-reichen Schleife (Aminosäuren 855-1098) lokalisiert, insbesondere zwischen Aminosäure 943 und 1007 (Millat et al. 2001). In Ausnahmefällen kann dies aber auch andere Domänen betreffen, wie anhand der Mutation C177Y in der N-terminalen Domäne gezeigt wurde (Ribeiro et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mut 4, welche die zuvor noch nicht beschriebene *frameshift*-Mutation V1023Sfs*15 in Kombination mit der bekannten *missense*-Mutation G992R trägt, aufgrund der geringen Cholesterollakkumulation als Zelllinie mit variantem biochemischem Phänotyp eingestuft. Es ist davon auszugehen, dass die Mutation G992R unabhängig von der *frameshift*-Mutation ursächlich für diesen varianten biochemischen Phänotyp ist. Die *frameshift*-Mutation V1023Sfs*15 wurde bisher noch nicht beschrieben. Allerdings gibt es Daten zu einer *missense*-Mutation desselben Codons, V1023G, die zu einer massiven Reduktion des NPC1-Proteins in Fibroblasten führt (Zampieri et al. 2012). Des Weiteren resultieren Behandlungen dieser NPC1-Variante mit dem Proteasominhibitor MG132 zwar in einem Anstieg der NPC1-Proteinmenge, führen aber nicht zu einer Reduktion des Cholesterolgehalts, was vermuten lässt, dass die Mutation V1023G die Funktionalität des NPC1-Proteins direkt beeinträchtigt (Zampieri et al. 2012). Daher ist davon auszugehen, dass auch die *frameshift*-Mutation V1023Sfs*15, mit Verlust des C-Terminus, welcher für den Transport zu den Lysosomen relevant ist (Watari et al. 1999), zu einem klassischen biochemischen Phänotyp und einem schweren klinischen Verlauf führen würde. Die Tatsache,

dass in der vorliegenden Arbeit in Kombination mit der G992R jedoch ein varianter biochemischer Phänotyp nachgewiesen wurde, unterstützt demnach die Hypothese von Millat et al., die besagt, dass es eine Art Hierarchie der Mutationen zu geben scheint, bei der eine wildtypähnliche Mutante, wie NPC1^{G992R}, unabhängig von der Mutation auf dem zweiten Allel, das gesamte biochemische Muster der Krankheit bestimmt (Millat et al. 2001). Die Mutation G992R wird durch Austausch der Aminosäure Guanin durch Cytosin an Position 2974 der DNA-Sequenz ausgelöst (c.2974G>C). Diese Nukleotidposition ist hochgradig polymorph. Für sie wurden bereits zahlreiche Substitutionen gezeigt (Piña-Aguilar et al. 2014), die zu verschiedenen Varianten des Codons 992 führen, darunter neben G992R, auch G992A sowie G992W (Sévin et al. 2007). Auch diese führen zu einem biochemisch varianten Phänotyp (Romanello et al. 2016).

Trotz der geringen Cholesterolakкумуляtion zeigen Patienten mit einem varianten biochemischen Phänotyp einen schweren klinischen Phänotyp, wobei die neurologischen Symptome zumeist erst im Erwachsenenalter beginnen. So zeigte ein Patient mit der homozygoten Mutation G992R zwar eine isolierte Splenomegalie, aber selbst im Alter von 66 Jahren noch keine neurologischen Symptome (Millat et al. 2001). In Kombination mit der Mutation I1061T wurde die Mutation G992R bei einer Patientin beschrieben, die erste neuropsychiatrische Symptome im Alter von 57 Jahren (Ataxie, Dysphagie, Dysarthrie) und erste viszerale Symptome in Form einer Splenomegalie im Alter von 64 Jahren zeigte (Watari et al. 1999). Wie anhand dieser Beispiele deutlich wird, weisen Patienten mit einem varianten biochemischen Phänotyp häufig die adulte Form von NP-C1 auf. Die ersten neurologischen Symptome treten meist in der zweiten oder dritten Lebensdekade auf. Der variante biochemische Phänotyp ist daher bei Patienten mit der adulten Form überrepräsentiert (Vanier et al. 1991; Ribeiro et al. 2001). Diese Patienten können außerdem viele Jahre lang isolierte psychiatrische Symptome aufweisen, bevor motorische und kognitive Beeinträchtigungen auftreten (Shulman et al. 1995; Walterfang et al. 2006). In Übereinstimmung damit zeigte auch die Spenderin der in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten der Mut 4 diesen typischen Krankheitsverlauf (Völkner et al. 2021). Erst im Alter von 24 Jahren manifestierten sich erste Symptome in Form einer Psychose. Die Patientin fiel weiterhin durch unspezifische Symptome wie Zurückgezogenheit, Interessenlosigkeit, eine verwaschene Sprache sowie durch Gleichgewichtsstörungen auf. Im Alter von 33 Jahren manifestierten sich charakteristische Merkmale, einschließlich Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie, eine vertikale supranukleäre Blickparese und eine Hepatosplenomegalie, sodass im Alter von 34 Jahren die vorläufige

Diagnose NP-C1 gestellt wurde und durch eine anschließende Sequenzierung bestätigt wurde (Völkner et al. 2021).

Die Therapieoptionen für Patienten mit variantem biochemischem Phänotyp beschränken sich, wie auch für Patienten mit einem klassischen biochemischen Phänotyp, auf die Behandlung mit Miglustat. Miglustat ist ein kleiner Iminozucker, der reversibel die Glycosylceramid-Synthase hemmt. Diese katalysiert den ersten Schritt der Glycosphingolipid Synthese, sodass eine Hemmung zu einer Reduktion der Glykosphingolipide in den Lysosomen führt (Lyseng-Williamson 2014). Die tägliche Behandlung mit Miglustat führte bei einem 21-jährigen Mann mit progressiver Ataxie, Hepatosplenomegalie und einem varianten biochemischen Phänotyp zu einer Verbesserung der Koordinationsbewegungen, des Ganges, der Dysphagie und der Sprache. Außerdem wurde eine Normalisierung der Stimmungsstörungen beobachtet (Jamrozik et al. 2013). In einer anderen Studie wurde über einen 33-jährigen Mann mit motorischen Schwierigkeiten, einer Gangataxie, Dysarthrie, Dysphagie, einer vertikalen supranukleären Blickparese und einer Splenomegalie berichtet, welcher einen varianten biochemischen Phänotyp aufwies. Ein Behandlungsregime mit einer Initialbehandlung von 200 mg Miglustat alle 8 Stunden führte innerhalb von zwei Jahren zu einer Verbesserung des Ganges, der Koordinationsbewegungen und der Schluckfähigkeit (Jesús et al. 2013).

Die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen ist ein Therapieansatz, der für viele lysosomale Speichererkrankungen diskutiert wird. Ziel der pharmakologischen Chaperontherapie ist die Stabilisierung des fehlgefalteten Proteins und eine Reduktion des proteasomalen Abbaus. Dadurch soll die intrazellulär verfügbare Menge des Proteins in den Lysosomen erhöht und die Substratakkumulation reduziert werden. In der NPC1-defizienten Zelllinie Mut 4 wurde eine sehr geringe Cholesterolakкумуляtion gemessen, was darauf hindeutet, dass die Mutation G992R keinen direkten Einfluss auf die Funktionalität des NPC1-Proteins hat. Solche *missense*-Mutationen sind grundsätzlich für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen zugänglich (Liguori et al. 2020). Obwohl das NPC1-Protein in dieser Zelllinie nicht signifikant reduziert ist und keine erhöhte proteasomale Degradation gemessen wurde, waren reduzierte Endo H-resistente NPC1-Proteinmengen und reduzierte Pearson-Korrelationskoeffizienten von NPC1 und dem lysosomalen Marker LAMP2 in den Fibroblasten, NDZs und HLZs der Mut 4 zu beobachten. Dies deutet auf eine moderate Destabilisierung des NPC1-Proteins hin, was durch die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen korrigiert werden könnte. Die Zugänglichkeit einzelner *missense*-Mutationen muss jedoch *in vitro* getestet werden (vgl. 5.4).

5.2 Pharmakologische Chaperone als experimentelle Therapeutika für die lysosomale Speichererkrankung NP-C1

Bei der lysosomalen Speichererkrankung NP-C1 führt die Proteinefehlfaltung zu einem *loss-of-function*-Phänotyp. Das unterscheidet sie pathophysiologisch von klassischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und der Creutzfeld-Jakob-Krankheit, die als Gruppe der *gain-of-toxic-function* Erkrankungen klassifiziert werden, bei denen die Proteinefehlfaltung zur Bildung toxischer Aggregate und dadurch zum neuronalen Zelltod führt (Winklhofer et al. 2008; Chaudhuri und Paul 2006). Der experimentelle Behandlungsansatz in der vorliegenden Arbeit sah vor über die spezifische Bindung niedermolekularer Substanzen, den pharmakologischen Chaperonen, an das NPC1-Protein die mutationsbedingte Fehlfaltung durch eine Stabilisierung zu korrigieren. Der Vorteil einer solchen Therapie leitet sich aus ihrem Angriffspunkt in der frühen Pathophysiologie der Krankheit ab. Somit könnte einer Störung des Cholesterolfstoffwechsels vorgebeugt und die daraus resultierende Neurodegeneration verhindert werden.

Mit 1-Desoxygalaktonojirimycin (DGJ, Freiname: Migalastat, Handelsname: Galafold™) als Monotherapie bei Morbus Fabry ist bereits das erste pharmakologische Chaperon zur Behandlung einer lysosomalen Speichererkrankung zugelassen (Moran 2018). Außerdem wird die pharmakologische Chaperontherapie im Kontext weiterer lysosomaler Speichererkrankungen, wie Morbus Gaucher (Han et al. 2020), Morbus Pompe (Borie-Guichot et al. 2021), Morbus Krabbe (Hill et al. 2015), GM1- und GM2-Gangliosidose (Takai et al. 2013; Maegawa et al. 2007) und Aspartylglucosaminurie (Banning et al. 2016) diskutiert. Für NP-C1 sind in der Fachliteratur einige wenige experimentelle Studien beschrieben (Ohgane et al. 2013; Ohgane et al. 2014; Fukuda et al. 2017; Shioi et al. 2020). Das Oxysterol 25-Hydroxycholesterol wurde als erstes experimentelles pharmakologisches Chaperon für das mutierte Protein NPC1^{I1061T} in einem HEK293-basierten Überexpressionssystem sowie in patientenspezifischen Fibroblasten beschrieben (Ohgane et al. 2013). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ohgane et al. wurde ein signifikanter Anstieg der Endo H-resistenten Glykoform des NPC1^{I1061T}-Proteins in Fibroblasten der Mut 1 nach Behandlung mit 25-HC gezeigt. Damit konnten die Ergebnisse von Ohgane et al. bestätigt und die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten als Zellsystem validiert werden. Darüber hinaus wurde erstmals in einem endogenen System und in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus dem HEK293-basierten Überexpressionssystem (Ohgane et al. 2013) eine Korrektur der

subzellulären Lokalisation des NPC1^{I1061T}-Proteins in den Lysosomen nach Behandlung mit 25-HC gezeigt.

Die Identifizierung neuer pharmakologischer Chaperone erfolgt zumeist mittels einer strukturbasierten Strategie, sofern die Struktur für das Zielprotein, beispielsweise in Form von hochauflösenden Röntgenkristallstrukturen, vorhanden ist. Dazu werden mittels *in silico* Screening, Liganden identifiziert, die an eine potentielle Bindungsstelle auf der Proteinoberfläche binden (Shin und Lim 2017). Dieses Verfahren wurde als Grundlage für die vorliegende Arbeit und in Kombination mit zellbasierten *in vitro*-Assays genutzt, um pharmakologische Chaperone für NP-C1 zu identifizieren. Als Bindungsstelle wurde die cholesterolbindende N-terminale Domäne des NPC1-Proteins genutzt (Infante et al. 2008b), deren dreidimensionale Struktur als röntgenkristallographische Struktur mit einer hohen Auflösung von 1,8 Å verfügbar ist (Kwon et al. 2009). Dies ermöglichte es Liganden zu identifizieren, die mit der N-terminalen Domäne des NPC1-Proteins interagieren und als potentielle pharmakologische Chaperone wirken. Über die Bindung an die N-terminale Domäne können auch Proteinvarianten stabilisiert werden, deren Mutationen in anderen Domänen lokalisiert sind, da spezifische Ligandenbindungsstellen, wie die N-terminale Domäne, oft an Grenzflächen zwischen Proteindomänen oder Subdomänen lokalisiert sind (Ringe und Petsko 2009). Die N-terminale Domäne beispielsweise teilt Grenzflächen mit der mittleren luminalen Domäne und der Cystein-reichen Schleife, in denen die Mutationen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien lokalisiert sind (Li et al. 2017). Über ein solches Netzwerk aus Seitenketteninteraktionen kann die Bindung eines Liganden an die N-terminale Domäne die Konformationsänderungen über das gesamte Protein hinweg kommunizieren und so zur Stabilisierung beitragen (Ringe und Petsko 2009).

Für NP-C1 wurde kürzlich eine bildbasierte Screening-Methode angewandt, bei der 758 von der FDA zugelassene Substanzen als potentielle pharmakologische Chaperone für NP-C1 getestet wurden (Shioi et al. 2020). Dieser Ansatz, bei dem bekannte Wirkstoffsubstanzen auf neue therapeutische Ziele angewandt werden, ist als *Drug-Repurposing*-Strategie bekannt und ist auch Grundlage der vorliegenden Arbeit. Insgesamt 2.162 von der FDA zugelassene Substanzen der Drugbank wurden für das *in silico* Screening genutzt (Wishart et al. 2006; The Drugbank), was die Phasen des rationalen Wirkstoffentwurfs beschleunigen und somit zu einem schnellen Einsatz in der Klinik führen kann (Pushpakom et al. 2019). Shio et al. identifizierten einige Azol-Antimykotika, darunter Itraconazol, als pharmakologische Chaperone für NPC1 (Shioi et al. 2020).

Aufgrund der strukturbasierten Screeningmethode, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, weisen die hit compounds eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu dem natürlichen Liganden, Cholesterol, auf. Eine strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat ist, mit wenigen Ausnahmen, für alle der bisher beschriebenen experimentellen pharmakologischen Chaperone für lysosomale Speichererkrankungen beschrieben (Parenti et al. 2015). Das seit 2016 zur Behandlung von Morbus Fabry zugelassene pharmakologische Chaperon DGJ beispielsweise ist ein Glykomimetikum vom Iminozucker-Typ. Es wird angenommen, dass die Wirksamkeit von DGJ als Chaperon weitgehend auf seine Fähigkeit zurückzuführen ist den α -Galaktopyranosid-Anteil des natürlichen Substrats Gb3 zu imitieren (Yu et al. 2014b). Gleichzeitig wirken Substanzen, die an das aktive Zentrum binden auch als Inhibitor. Das Paradoxon, dass ein Inhibitor die Enzymaktivität erhöhen kann, erklärt sich aus der Tatsache, dass der therapeutische Effekt bei subinhibitorischen intrazellulären Konzentrationen erzielt wird. Des Weiteren tragen die hohen Konzentrationen des natürlichen Substrats, welches sich in den Lysosomen ansammelt, sowie der saure pH-Wert innerhalb der Lysosomen dazu bei das pharmakologische Chaperon zu verdrängen und das aktive Zentrum für die Bindung des natürlichen Substrats wieder freizugeben. Dieses Konzept wurde auch auf orthosterische Liganden für Rezeptoren (Beerepoot et al. 2017) sowie auf Korrektoren für Transporter, wie der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), erweitert (Vauthier et al. 2017) und könnte somit auch für das NPC1-Protein gelten.

5.3 Wirkmechanismus der identifizierten Substanzen als pharmakologische Chaperone für NP-C1

Pharmakologische Chaperone sind kleine Moleküle, die sich durch die direkte und spezifische Bindung an ihr Zielprotein auszeichnen und so als *Scaffold* für Faltungsintermediate fungieren, um über eine Stabilisierung die korrekte Faltung des mutierten Proteins zu unterstützen. Die Aufklärung der Bindungsstellen und der genauen Wirkmechanismen stellt dabei eine Herausforderung dar. In der vorgelegten Arbeit wurden Quinestrol und Abirateronacetat als Substanzen identifiziert, die einen cholesterolreduzierenden Effekt in den vier getesteten NPC1-Zelllinien hatten und somit als pharmakologische Chaperone wirken könnten.

Quinestrol ist ein synthetisches Estrogen, das erstmals 1961 beschrieben wurde (Jaschevatzky et al. 1979). Quinestrol wurde in der Hormontherapie, der hormonellen Geburtenkontrolle und gelegentlich zur Behandlung von Brust- und Prostatakrebs eingesetzt, wird aber in den Vereinigten Staaten nicht mehr vermarktet (Meikle 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde

gezeigt, dass Quinestrol in NPC1-defizienten Zellen einen cholesterolreduzierenden Effekt hat. Da es in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1) nicht zu einem Anstieg der Endo H-resistenten NPC1-Glykoform und auch zu keiner erhöhten Kolo-kalisation mit dem lysosomalen Marker LAMP2 führte, ist jedoch davon auszugehen, dass dieser Effekt nicht durch eine chaperonartige Aktivität ausgeübt wird. In den NDZs und HLZs desselben Patienten wurde zwar ein geringer Anstieg der Endo H-resistenten NPC1-Proteinmenge gemessen, allerdings war das NPC1-Protein auch in diesen Zellen nach Behandlung mit Quinestrol nicht vermehrt in den Lysosomen lokalisiert. Die fehlende lysosomale Lokalisation des NPC1-Proteins deutet daraufhin, dass der cholesterolreduzierende Effekt in Quinestrol-behandelten Zellen unabhängig vom NPC1-Protein erfolgt.

Bereits 2018 war Quinestrol Teil einer Studie, in der in einem *high-throughput* Verfahren der Effekt von 2.013 verschiedenen von der FDA zugelassenen Substanzen in NPC1-defizienten Zellen getestet wurde (Pugach et al. 2018). In dieser Studie zeigte Quinestrol in Fibroblasten mit der kombiniert heterozygoten Mutation E612D/P543Rfs*20 keinen cholesterolreduzierenden Effekt. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der in Fibroblasten derselben Zelllinie (Mut 3) eine Reduktion des Cholesterolgehalts um etwa 50 % gemessen wurde. Diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnten durch die Verwendung von verschiedenen Analysemethoden erklärt werden. Pugach et al. nutzten eine automatische Screening-Methode, bei der die mittlere Filipinintensität bestimmt wurde. Dabei war das Signal der unbehandelten NPC1-defizienten Zellen etwa doppelt so hoch wie das der Kontrollzellen (Pugach et al. 2018) und ermöglichte somit zwar eine ausreichende Unterscheidung zwischen NPC1-defizienten Zellen und Kontrollzellen, ist aber möglicherweise ungeeignet für die Identifizierung von cholesterolreduzierenden Substanzen. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das LSO-Kompartiment-Verhältnis berechnet, das die Akkumulation des freien Cholesterols ins Verhältnis zu der Gesamtfläche der Zellen setzt und eine bessere Unterscheidung ermöglicht (Pipalia et al. 2006).

Abirateronacetat ist in der Europäischen Union und den USA in Kombination mit Prednison oder Prednisolon für die Behandlung des kastrationsresistenten Prostatakrebs zugelassen (Zytiga®) (Hoy 2013). Es wird nach oraler Verabreichung zu dem aktiven Metaboliten Abirateron hydrolysiert und wirkt als Antiandrogen, indem es die Aktivität des CYP17 Enzyms hemmt. Die vorliegende Arbeit legt eine Wirkung von Abirateronacetat als pharmakologisches Chaperon für NPC1 nahe. Grundlage für diese Annahme sind zwei Beobachtungen aus dem *in vitro* Screening: Abirateronacetat führt, ebenso wie 25-HC, in Fibroblasten, NDZs und HLZs

der Mut 1 zu einer Reifung des NPC1^{I1061T}-Proteins zu Endo H-resistenten Glykoformen und zu einem Anstieg der Kolokalisation von NPC1 und LAMP2, was für einen gesteigerten Transport des NPC1^{I1061T}-Proteins entlang des sekretorischen Wegs zu den Lysosomen spricht. Außerdem legt die hohe Bindungsaffinität zur N-terminalen Domäne, die im *in silico* Screening für Abirateronacetat vorausgesagt wurde, nahe, dass Abirateronacetat seinen stabilisierenden Effekt über die spezifische Bindung an die N-Terminale Domäne ausübt. Um diese Annahme zu bestätigen, könnten zukünftige Analysen den Nachweis einer direkten Bindung von Abirateronacetat an die N-terminale Domäne zum Inhalt haben. Zu diesem Zweck haben sich *Photo-Crosslinking* Studien als effektiv erwiesen, durch welche die Bindung von Substanzen an das NPC1-Protein bewertet werden kann (Ohgane et al. 2013; Shioi et al. 2020).

Auch 25-HC zeigte in den *in silico* Molecular Docking Simulationen eine hohe Bindungsaffinität zur N-terminalen Domäne. Die direkte Bindung von 25-HC an die N-terminale Domäne wurde außerdem bereits in mehreren Studien gezeigt (Infante et al. 2008a; Liu et al. 2009; Kwon et al. 2009). Infante et al. beispielsweise beschreiben, dass [³H]-markiertes 25-HC mit hoher Affinität an die N-terminale Domäne des NPC1-Proteins (K_d 10 nM) bindet (Infante et al. 2008a). Später wurde jedoch gezeigt, dass das Vorhandensein der N-terminalen Domäne nicht obligatorisch für die Chaperonwirkung von 25-HC ist. Ohgane et al. nutzten dafür eine NTD-deletierte Version des mutierten NPC1^{I1061T}-Proteins, Δ NTD-I1061T, und zeigten, dass die Behandlung mit 25-HC, ebenso wie in dem NPC1^{I1061T}-Protein mit N-terminaler Domäne, zu einer Korrektur der Lokalisation in den Lysosomen führte (Ohgane et al. 2013). Die Autoren nahmen daher an, dass es eine zweite Sterolbindungsstelle geben muss, deren Position jedoch bis heute unbekannt ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von 25-HC und Abirateronacetat, wäre es denkbar, dass auch Abirateronacetat an diese zweite Bindungsstelle bindet. Es sind bereits experimentelle pharmakologische Chaperone beschrieben, die an mehrere Bindungsstellen ihres Zielproteins binden, z.B. Pentosanpolysulfat an das Prionprotein (Petrosyan et al. 2021) oder N-Acetylcystein an die α -Glucosidase bei Morbus Pompe (Roig-Zamboni et al. 2017). Auch ein komplexes pH-abhängiges Bindungsverhalten, wie es bei dem experimentellen Chaperon Ambroxol für Morbus Gaucher beschrieben ist, wäre denkbar. Anhand von Molecular Docking und Molekulardynamik-Simulationen wurde gezeigt, dass Ambroxol in Fibroblasten von Morbus Gaucher Patienten als pH-abhängiger Mischtyp-Inhibitor der fehlgefalteten Glucocerebrosidase wirkt (Kopytova et al. 2021). Bei neutralem pH, wie im ER, bindet Ambroxol das aktive Zentrum der Glucocerebrosidase, wodurch eine stabilisierende aber hemmende Wirkung beobachtet wird. Bei saurem pH, wie im Lysosom, verlässt Ambroxol das aktive Zentrum und

bindet allosterisch, wodurch keine hemmende Aktivität mehr besteht (Maegawa et al. 2009; Kopytova et al. 2021).

Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz als pharmakologisches Chaperon ist, dass die Bindung von Abirateronacetat nicht die Funktion des NPC1-Proteins als Cholesteroltransporter einschränkt. Kürzlich wurde Itraconazol als pharmakologisches Chaperon für das mutierte NPC1^{I1061T}-Protein beschrieben. Die Behandlung mit 10 µM Itraconazol hatte zwar einen stabilisierenden Effekt auf das NPC1^{I1061T}-Protein, führte aber nur zu einer geringen Reduktion des Cholesterolgehalts um weniger als 50 % in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten, und wies damit einen geringeren cholesterolreduzierenden Effekt als die in dieser Arbeit identifizierten Substanzen, Quinestrol und Abirateronacetat, auf. Für Itraconazol wurde, ebenso wie für 25-HC, gezeigt, dass der stabilisierende Effekt nicht von der Bindung an die N-terminale Domäne abhängt, sondern, dass es eine zweite sterolbindende Domäne geben muss (Shioi et al. 2020). Molecular Docking Studien legen nahe, dass Itraconazol an einen Tunnel im NPC1-Protein bindet und mehrere hydrophobe Kontakte mit der Sterol-sensitiven Domäne eingeht, wodurch der Tunnel blockiert wird. Die Blockierung dieses Tunnels stört den NPC1-vermittelten Austritt von freiem Cholesterol aus den Lysosomen (Long et al. 2020). Der vergleichsweise starke cholesterolreduzierende Effekt in den Abirateronacetat-behandelten Zellen deutet darauf hin, dass die Bindung dieses pharmakologischen Chaperons nicht zu einer Beeinträchtigung der Cholesteroltransportfunktion des NPC1-Proteins führt.

Eine weitere Voraussetzung für pharmakologische Chaperone ist es, die Bindungstasche nach erfolgreichem Transport zu den Lysosomen wieder freizugeben. Bei dem für Morbus Fabry zugelassenen pharmakologischen Chaperon DGJ wird dies experimentell durch Waschschriffe unterstützt (Ringe und Petsko 2009). In Fibroblasten wurde gezeigt, dass eine diskontinuierliche Behandlung mit DGJ von sieben Tagen, gefolgt von einem dreitägigen Waschschriff, zu einem stärkeren Anstieg der α -Galaktosidase A-Aktivität führt als eine kontinuierliche Behandlung für zehn Tage (Benjamin et al. 2009). Die Vorteile einer intermittierenden Verabreichung von DGJ lassen sich durch die Tatsache erklären, dass die Halbwertszeit der meisten α -Galaktosidase A-Mutanten länger ist als die Halbwertszeit von DGJ *in vivo*. In Gegenwart des pharmakologischen Chaperons, also während der Behandlungsphase, wird das Enzym stabilisiert, aber gehemmt und während des Waschschriffs, also in Abwesenheit des pharmakologischen Chaperons, ist das Enzym aktiv, wird aber langsam abgebaut. Ein solch intermittierendes Behandlungsschema wurde auf die Behandlung von Patienten adaptiert, wobei das Medikament jeden zweiten Tag eingenommen wird (Moran

2018). Entsprechende Behandlungsschemata könnten auch für NPC1 entwickelt werden. Alternativ dazu können pharmakologische Chaperone der zweiten Generation entwickelt werden (Tran et al. 2020). Diese pharmakologischen Chaperone binden selektiv an eine andere Bindungsstelle als das aktive Zentrum und wirken so als nicht-inhibitorische Liganden. Die Entwicklung solcher Liganden ist jedoch sehr anspruchsvoll, da weder die potentielle Bindungsstelle noch die Struktur eines Liganden als Referenz zur Verfügung steht. Obwohl man lange davon ausgegangen ist, dass im Wesentlichen die gesamte Oberfläche eines Proteins für die Bindung kleiner Moleküle zur Verfügung steht, wurde Anfang der 1990er Jahre festgestellt, dass dies tatsächlich nur für eine kleine Anzahl von Stellen gilt, da gebundenes Wasser den Zugang zu einem Großteil der Proteinoberfläche verhindert (Ringe 1995). Trotz dieser Herausforderungen wurde kürzlich auf der Grundlage der Struktur eines pharmakologischen Chaperons der ersten Generation, Lumacaftor, ein pharmakologisches Chaperon der zweiten Generation, Tezacaftor, für die Behandlung der Zystischen Fibrose entwickelt. Tezacaftor verbessert nachweislich die Faltung und die Funktion des CFTR-Proteins und weist bessere pharmakokinetische Eigenschaften sowie weniger unerwünschte Nebenwirkungen als Lumacaftor auf (Lopes-Pacheco 2019). In Anlehnung an diesen Ansatz könnte auch die in dieser Studie identifizierte Substanz Abirateronacetat als vielversprechende Leitsubstanz für weitere Strukturoptimierungen dienen, um ein pharmakologisches Chaperon der zweiten Generation für NP-C1 zu entwickeln.

5.4 Zugänglichkeit der getesteten NPC1-Varianten gegenüber pharmakologischen Chaperonen

Pharmakologische Chaperone sind nicht für die Behandlung von allen NP-C1 Patienten geeignet, sondern nur für diejenigen, die eine Proteinvariante tragen, die auf die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen ansprechen (Parenti et al. 2015). In der Fachliteratur wird in diesem Zusammenhang von der „Zugänglichkeit“ bestimmter Mutationen gegenüber pharmakologischen Chaperonen gesprochen. Prinzipiell sind vor allem *missense*-Mutationen zugänglich für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen, aber auch kleine In-Frame-Deletionen und -Insertionen (Valenzano et al. 2011). Die Zugänglichkeit einzelner Mutationen ist jedoch nicht vorherzusagen und muss daher einzeln getestet werden. Bestimmte *missense*-Mutationen, die zu einem nicht funktionellen NPC1-Protein führen, sind nicht zugänglich für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen. In diesem Zusammenhang ist die Mutation P691S in der funktionell bedeutenden Sterol-sensitiven Domäne des NPC1-Proteins zu nennen. Das NPC1-Protein mit dieser Mutation wird zwar korrekt entlang des

sekretorischen Wegs bis hin zur lysosomalen Membran transportiert, aber die Bindung und damit der Export des freien Cholesterols ist gestört (Ohgami et al. 2004; Lu et al. 2015; Trinh et al. 2017). Grundsätzlich ungeeignet für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen sind Mutationen, wie große Deletionen, Stop-Gain-Mutationen, Spleißmutationen oder Mutationen in der regulatorischen Region, die dazu führen, dass das Protein nicht (korrekt) exprimiert wird (Liguori et al. 2020). Auch *frameshift*-Mutationen gehen häufig mit großen strukturellen Veränderungen einher und führen zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und somit zu einem stark verkürzten Protein, was sie für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen ausschließt (Liguori et al. 2020). *Frameshift*-Mutationen bei NP-C1 führen außerdem zum Verlust des carboxy-terminalen Zielmotivs (Watari et al. 1999). Diese NPC1-Proteinvarianten werden also nicht zu der lysosomalen Membran transportiert, und können ihre Funktion als Cholesteroltransporter nicht erfüllen. *Frameshift*-Mutationen können daher a priori für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen ausgeschlossen werden.

Die Zugänglichkeit von *missense*-Mutationen gegenüber einer pharmakologischen Chaperontherapie kann mit hohem Durchsatz in Überexpressionssystemen bestimmt werden. Bezüglich NP-C1 wurde bisher jedoch nur die Mutation I1061T untersucht. Für andere lysosomale Speichererkrankungen, wie Morbus Fabry beispielsweise, wurden breit angelegte *in vitro* Studien durchgeführt, um die Zugänglichkeit von hunderten von α -Galaktosidase A-Mutationen gegenüber dem pharmakologischen Chaperon DGJ zu bestimmen (Flanagan et al. 2009; Andreotti et al. 2010; Benjamin et al. 2017). Die meisten Mutationen wurden mit Hilfe eines standardisierten, nach guter Laborpraxis-validierten *in vitro*-Assays auf der Basis eines Überexpressionssystems in HEK293-Zellen untersucht (Benjamin et al. 2017). Dabei wurde unter Verwendung eines fluorogenen Substrats die Aktivität der α -Galaktosidase A nach fünftägiger Behandlung mit 10 μ M DGJ bestimmt. Derzeit sind 1.384 „zugängliche“ Mutationen gelistet, darunter hauptsächlich *missense*-Mutationen und einige wenige In-Frame-Deletionen oder -Insertionen. Weitere 754 Mutationen sind als „nicht-zugängliche“ Mutationen gelistet (Galafold® Amenability Table).

Auf Grundlage solcher experimenteller Daten, wurden für Morbus Fabry *in silico* Verfahren entwickelt, welche die Zugänglichkeit von α -Galaktosidase A-Mutationen auf die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen vorhersagen (Andreotti et al. 2010; Woodard et al. 2021). Mit Hilfe dieser *in silico* Verfahren wurde beschrieben, dass *missense*-Mutanten, die im Vergleich zum Wildtyp-Protein besonders destabilisiert sind bzw. Mutationen, welche in Domänen lokalisiert sind, die früh im Faltungsprozess gefaltet werden, eher nicht auf eine

pharmakologische Chaperonbehandlung ansprechen (Woodard et al. 2021). Vergleichbare Daten für NP-C1 fehlen jedoch. Bisher wurde lediglich die Mutation I1061T untersucht (Ohgane et al. 2013; Shioi et al. 2020). Die Zugänglichkeit dieser NPC1-Proteinvariante gegenüber pharmakologischen Chaperonen wurde erstmals in einer 2013 veröffentlichten Studie in einem HEK293-basierten Überexpressionssystem anhand von Behandlungen mit 25-HC und Oxysterol-Derivaten beschrieben (Ohgane et al. 2013). In Übereinstimmung mit dieser Studie konnte in der vorliegenden Arbeit in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1) ein Anstieg der Endo H-resistenten NPC1-Glykoform sowie ein Anstieg des NPC1-Proteins in der lysosomalen Membran gezeigt werden, was zu einer Reduktion der Cholesterollakkumulation führte. Außerdem konnten diese Erkenntnisse auf humane NDZs und HLZs, die bei NP-C1 besonders betroffen sind, übertragen werden. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die Zugänglichkeit der Mutation I1061T gegenüber der Behandlung mit dem pharmakologischen Chaperon 25-HC.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es außerdem erstmals auch andere *missense*-Mutationen bezüglich ihrer Zugänglichkeit für pharmakologische Chaperone zu testen. Die Definition der Zugänglichkeit ist dabei eine Herausforderung und wird im Kontext vieler lysosomaler Speichererkrankungen mit Proteinfaltungsdefekt kontrovers diskutiert, da unklar ist, welches Aktivitätsniveau benötigt wird, um eine symptomatische Erkrankung zu verhindern. Eine frühe Studie, in der Fibroblasten von Patienten mit GM2-Gangliosidosen und Metachromatischer Leukodystrophie untersucht wurden, legt nahe, dass 10-15 % Restaktivität ausreichen könnten, um eine Wildtyp-ähnliche Umsatzrate des jeweiligen Substrats zu erreichen (Leinekugel et al. 1992). Bei dem standardisierten *in vitro* Zugänglichkeits-Assay in HEK293-Zellen für DGJ bei Morbus Fabry sind zugängliche Mutationen als solche definiert, bei denen eine fünftägige Behandlung mit 10 µM DGJ zu einer α -Galaktosidase A-Aktivität führt, die mindestens das 1,2-fache des Ausgangswertes beträgt, mit einem absoluten Anstieg von ≥ 3 % der Wildtyp α -Galaktosidase A (Benjamin et al. 2017). Inwiefern die genannten Angaben, welche sich auf die Aktivität von Enzymen beziehen, auch auf Transporter wie NPC1 zu übertragen sind, bleibt noch zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten drei weitere Zelllinien mit *missense*-Mutation auf einem oder beiden Allelen getestet. In allen drei dieser Zelllinien konnte eine Reduktion der Cholesterollakkumulation und eine Korrektur der lysosomalen Lokalisation nach Behandlung mit 25-HC gezeigt werden. Während in den Fibroblasten der Mut 2 (Y394H/Y394H) außerdem ein signifikanter Anstieg der Endo H-

resistenten NPC1-Glykoform gemessen wurde, war der Anstieg in den Mutanten Mut 3 (E612D/P543Rfs*20) und Mut 4 (G992R/V1023Sfs*15) nicht signifikant. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der homozygoten Zelllinie Mut 2 alle NPC1-Proteine zugänglich für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen sind, während in Mut 3 und Mut 4 nur jeweils ein Allel mit *missense*-Mutation zugänglich ist.

Besonders NPC1-Proteinvarianten mit Mutationen in der mittleren luminalen Domäne und der Cystein-reichen Schleife sind zugänglich für die Behandlung mit Substanzen sind, die über eine Stabilisierung des mutierten NPC1-Proteins wirken, wie der Histondeacetylase-Inhibitor SAHA (Wang et al. 2019). In Übereinstimmung damit legen die vorliegenden Daten nahe, dass die *missense*-Mutationen Y394H, E612D und G992R, welche in der mittleren luminalen Domäne bzw. in der Cystein-reichen Schleife des NPC1-Proteins lokalisiert sind, zugänglich gegenüber der Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen sind.

Die Häufigkeit von Mutationen, die auf die pharmakologische Chaperonbehandlung ansprechen, ist bei verschiedenen lysosomalen Speichererkrankungen unterschiedlich. Für die lysosomale Speichererkrankung Morbus Fabry, bei der die meisten Mutationen privat sind und zumeist keine hohe Prävalenz aufweisen, wird der Anteil dieser Mutationen auf 30-50 % geschätzt (Parenti et al. 2015; Pereira et al. 2018). Die häufigsten NPC1-Mutationen sind die Mutationen I1061T, P1007A und G992W (Bountouvi et al. 2017). Darüber hinaus gibt es auch bei NP-C1 viele private Mutationen (Dardis et al. 2020; Fancello et al. 2009), die häufig in kombinierter Heterozygotie auftreten (Bountouvi et al. 2017), was die Interpretation von Ergebnissen erschwert. Etwa 60 % aller bekannten NPC1-Mutationen sind *missense*-Mutationen (The Human Gene Mutation Database) und somit potentiell zugänglich für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen. Zukünftige Studien sollten daher eine systematisierte Untersuchung bekannter NPC1-Mutationen zur Beurteilung ihrer Zugänglichkeit gegenüber pharmakologischen Chaperonen zum Inhalt haben.

6 Zusammenfassung

Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NP-C1) ist eine seltene lysosomale Speichererkrankung, die durch Mutationen im *NPCI*-Gen verursacht wird. Die Dysfunktion des kodierten NPC1-Proteins, das als Transmembranprotein den Export von freiem Cholesterol aus späten Endosomen und Lysosomen realisiert, führt zu einer Sequestrierung des Cholesterols in diesen Kompartimenten. Auf zellulärer Ebene führen bestimmte *missense*-Mutationen, darunter die häufig vorkommende Mutation I1061T, zu einer Fehlfaltung des NPC1-Proteins. Obwohl solch fehlgefaltete Proteine eine gewisse Restaktivität besitzen können, werden sie im Rahmen der endoplasmatischen-Retikulum assoziierten Degradation abgebaut, was einen *loss-of-function*-Phänotyp zur Folge hat. Eine Strategie solch fehlgefaltete Proteine vor der Degradation zu schützen und so deren vorhandene, wenn auch eingeschränkte Funktion auszunutzen, besteht in der Anwendung von pharmakologischen Chaperonen. Dies sind kleine Moleküle, die durch spezifische Bindung und Stabilisierung ihres jeweiligen Zielproteins dessen korrekte Faltung unterstützen und somit dem Abbau entgegenwirken. Therapien unter Verwendung von pharmakologischen Chaperonen stehen aktuell für NP-C1 und andere lysosomale Speichererkrankungen im Fokus der Forschung und es war daher das Ziel der vorliegenden Arbeit pharmakologische Chaperone zur Behandlung von NP-C1 zu identifizieren und zu charakterisieren.

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Medizinische Genetik, an der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht-Kossel“, wurden mit Hilfe eines *in silico* Verfahrens aus von der FDA zugelassenen Substanzen potentielle pharmakologische Chaperone identifiziert. Dies erfolgte durch *Molecular Docking*, bei dem die Bindungsenergien der Substanzen zu der cholesterolbindenden N-terminalen Domäne des NPC1-Proteins bestimmt wurden. Dabei wurden zehn Liganden identifiziert, die eine niedrigere Bindungsenergie aufweisen als der natürliche Ligand Cholesterol. Diese zehn hit compounds wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro* im Hinblick auf die Verbesserung des pathophysiologischen zellulären Phänotyps untersucht. Um dem neuroviszeralen Charakter der Krankheit gerecht zu werden, erfolgten die Untersuchungen sowohl in patientenspezifischen Fibroblasten als auch in neural differenzierten Zellen (NDZs) und Hepatozyten-ähnlichen Zellen (HLZs), die aus induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleitet wurden. Zunächst wurden vier verschiedene NPC1-defiziente Zelllinien im Hinblick auf ihren zellulären pathophysiologischen Phänotyp untersucht. Dabei handelte es sich um zwei Zelllinien mit homozygoten Mutationen (Mut 1: I1061T/I1061T und Mut 2: Y394H/Y394H) und zwei

Zelllinien mit kombiniert heterozygoten Mutationen (Mut 3: E612D/P543Rfs*20 und Mut 4: G992R/V1023Sfs*15).

Für alle NPC1-defizienten Zelllinien wurde in den Fibroblasten, NDZs und HLZs eine Akkumulation von freiem Cholesterol nachgewiesen. Dabei wies die NPC1-defiziente Zelllinie Mut 4 die geringsten Cholesterolwerte auf und wurde als varianter biochemischer Phänotyp identifiziert. Des Weiteren wurde in allen NPC1-defizienten Zelllinien, mit Ausnahme der Mut 4, ein reduzierter NPC1-Proteingehalt nachgewiesen. Dies wurde auf eine erhöhte proteasomale Degradation zurückgeführt und der Großteil der verbliebenen NPC1-Proteinmenge war als ER-ständige Glykoform detektiert worden. In Übereinstimmung damit konnte anhand von Kollokalisationsanalysen mit dem lysosomalen Marker LAMP2 gezeigt werden, dass in den NPC1-defizienten Zellen signifikant weniger NPC1-Protein in den Lysosomen lokalisiert ist.

Von den zuvor durch *Molecular Docking* identifizierten Substanzen konnte für Quinestrol und Abirateronacetat eine Verbesserung des zellulären pathophysiologischen Phänotyps beobachtet werden. Quinestrol und Abirateronacetat, zeigten einen cholesterolreduzierenden Effekt in NPC1^{I1061T/I1061T}-Fibroblasten (Mut 1). Für Abirateronacetat konnte zudem eine Korrektur der subzellulären Lokalisation des NPC1-Proteins in den Lysosomen gezeigt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass Abirateronacetat eine Wirkung als pharmakologisches Chaperon entfaltet. Im Gegensatz dazu führte Quinestrol zu keiner Korrektur der lysosomalen Lokalisation des NPC1-Proteins. Vergleichbare Ergebnisse wurden in den NDZs und HLZs der Mut 1 beobachtet, was die klinische Relevanz der identifizierten Substanzen hervorhebt. Die klinische Relevanz der identifizierten Substanzen wurde außerdem durch Untersuchungen an weiteren Zelllinien mit *missense*-Mutation, hinsichtlich ihrer Zugänglichkeit gegenüber pharmakologischen Chaperonen, bestärkt. Die Behandlung der Mut 2 (Y394H/Y394H) mit Abirateronacetat führte ebenfalls zu einer Korrektur der lysosomalen Lokalisation des NPC1-Proteins und zu einer Cholesterolreduktion. Auch in den kombiniert heterozygoten Zelllinien Mut 3 (E612D/P543Rfs*20) und Mut 4 (G992R/V1023Sfs*15), in denen nur ein Allel mit *missense*-Mutation vorliegt, führte die Behandlung mit Abirateronacetat zu einer Cholesterolreduktion, die von einer, zwar nicht signifikanten, Erhöhung der Kollokalisation von NPC1 und dem lysosomalen Marker LAMP2 begleitet wurde. Diese Daten zeigen auf, dass die NPC1-Mutationen Y394H, E612D und G992R zugänglich für die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen sind. Abirateronacetat könnte somit als Leitsubstanz für Strukturoptimierungen genutzt werden und besitzt das Potenzial für den klinischen Einsatz als pharmakologisches Chaperon zur Behandlung von einer Vielzahl von NP-C1 Patienten.

7 Literaturverzeichnis

- Al Abbar, A.; Ngai, S. C.; Nograles, N.; Alhaji, S. Y.; Abdullah, S. (2020): Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *BioResearch open access* 9 (1), S. 121–136. DOI: 10.1089/biores.2019.0046.
- Andreotti, G.; Guarracino, M. R.; Cammisa, M.; Correra, A.; Cubellis, M. V. (2010): Prediction of the responsiveness to pharmacological chaperones: lysosomal human alpha-galactosidase, a case of study. *Orphanet journal of rare diseases* 5, S. 36. DOI: 10.1186/1750-1172-5-36.
- Argoff, C. E.; Comly, M. E.; Blanchette-Mackie, J.; Kruth, H. S.; Pye, H. T.; Goldin, E.; Kaneski, C.; Vanier, M. T. et al. (1991): Type C Niemann-Pick disease: cellular uncoupling of cholesterol homeostasis is linked to the severity of disruption in the intracellular transport of exogenously derived cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1096 (4), S. 319–327. DOI: 10.1016/0925-4439(91)90068-K.
- Arhar, T.; Shkedi, A.; Nadel, C. M.; Gestwicki, J. E. (2021): The interactions of molecular chaperones with client proteins: why are they so weak? *The Journal of biological chemistry* 297 (5), S. 101282. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101282.
- Banning, A.; Gülec, C.; Rouvinen, J.; Gray, S. J.; Tikkanen, R. (2016): Identification of Small Molecule Compounds for Pharmacological Chaperone Therapy of Aspartylglucosaminuria. *Scientific reports* 6, S. 37583. DOI: 10.1038/srep37583.
- Basma, H.; Soto-Gutiérrez, A.; Yannam, G. R.; Liu, L.; Ito, R.; Yamamoto, T.; Ellis, E.; Carson, S. D. et al. (2009): Differentiation and Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Gastroenterology* 136 (3), 990-999.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.047.
- Baxter, M. A.; Rowe, C.; Alder, J.; Harrison, S.; Hanley, K. P.; Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; Goldring, C. E. et al. (2010): Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem cell research* 5 (1), S. 4–22. DOI: 10.1016/j.scr.2010.02.002.
- Beerepoot, P.; Nazari, R.; Salahpour, A. (2017): Pharmacological chaperone approaches for rescuing GPCR mutants: Current state, challenges, and screening strategies. *Pharmacological research* 117, S. 242–251. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.036.
- Benjamin, E. R.; Della Valle, M. C.; Wu, X.; Katz, E.; Pruthi, F.; Bond, S.; Bronfin, B.; Williams, H. et al. (2017): The validation of pharmacogenetics for the identification of Fabry patients to be treated with migalastat. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 19 (4), S. 430–438. DOI: 10.1038/gim.2016.122.
- Benjamin, E. R.; Flanagan, J. J.; Schilling, A.; Chang, H. H.; Agarwal, L.; Katz, E.; Wu, X.; Pine, C. et al. (2009): The pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin increases alpha-galactosidase A levels in Fabry patient cell lines. *Journal of inherited metabolic disease* 32 (3), S. 424–440. DOI: 10.1007/s10545-009-1077-0.
- Blom, T. S.; Linder, M. D.; Snow, K.; Pihko, H.; Hess, M. W.; Jokitalo, E.; Veckman, V.; Syvänen, A.-C. et al. (2003): Defective endocytic trafficking of NPC1 and NPC2 underlying infantile Niemann-Pick type C disease. *Human Molecular Genetics* 12 (3), S. 257–272. DOI: 10.1093/hmg/ddg025.
- Borie-Guichot, M.; Tran, M. L.; Génisson, Y.; Ballereau, S.; Dehoux, C. (2021): Pharmacological Chaperone Therapy for Pompe Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (23). DOI: 10.3390/molecules26237223.
- Bountouvi, E.; Papadopoulou, A.; Vanier, M. T.; Nyktari, G.; Kanellakis, S.; Michelakakis, H.; Dinopoulos, A. (2017): Novel NPC1 mutations with different segregation in two related Greek patients with Niemann-Pick type C disease: molecular study in the extended pedigree and clinical correlations. *BMC Medical Genetics* 18 (1). DOI: 10.1186/s12881-017-0409-4.
-

- Boyd, R. E.; Lee, G.; Rybczynski, P.; Benjamin, E. R.; Khanna, R.; Wustman, B. A.; Valenzano, K. J. (2013): Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases. *Journal of medicinal chemistry* 56 (7), S. 2705–2725. DOI: 10.1021/jm301557k.
- Brogden, G.; Shammash, H.; Walters, F.; Maalouf, K.; Das, A. M.; Naim, H. Y.; Rizk, S. (2020): Different Trafficking Phenotypes of Niemann-Pick C1 Gene Mutations Correlate with Various Alterations in Lipid Storage, Membrane Composition and Miglustat Amenability. *International journal of molecular sciences* 21 (6). DOI: 10.3390/ijms21062101.
- Carstea, E. D.; Morris, J. A.; Coleman, K. G.; Loftus, S. K.; Zhang, D.; Cummings, C.; Gu, J.; Rosenfeld, M. A. et al. (1997): Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis. *Science* 277 (5323), S. 228–231. DOI: 10.1126/science.277.5323.228.
- Chaudhuri, T. K.; Paul, S. (2006): Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *The FEBS journal* 273 (7), S. 1331–1349. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05181.x.
- Cianciola, N. L.; Carlin, C. R.; Kelley, T. J. (2011): Molecular pathways for intracellular cholesterol accumulation: common pathogenic mechanisms in Niemann-Pick disease Type C and cystic fibrosis. *Archives of biochemistry and biophysics* 515 (1-2), S. 54–63. DOI: 10.1016/j.abb.2011.08.012.
- Dardis, A.; Zampieri, S.; Gellera, C.; Carrozzo, R.; Cattarossi, S.; Peruzzo, P.; Dariol, R.; Sechi, A. et al. (2020): Molecular Genetics of Niemann-Pick Type C Disease in Italy: An Update on 105 Patients and Description of 18 NPC1 Novel Variants. *Journal of clinical medicine* 9 (3). DOI: 10.3390/jcm9030679.
- Davies, J. P.; Ioannou, Y. A. (2000): Topological Analysis of Niemann-Pick C1 Protein Reveals That the Membrane Orientation of the Putative Sterol-sensing Domain Is Identical to Those of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Sterol Regulatory Element Binding Protein Cleavage-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry* 275 (32), S. 24367–24374. DOI: 10.1074/jbc.M002184200.
- Deffieu, M. S.; Pfeffer, S. R. (2011): Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (47), S. 18932–18936. DOI: 10.1073/pnas.1110439108.
- Duan, Y.; Ma, X.; Zou, W.; Wang, C.; Bahbahan, I. S.; Ahuja, T. P.; Tolstikov, V.; Zern, M. A. (2010): Differentiation and Characterization of Metabolically Functioning Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 28 (4), S. 674–686. DOI: 10.1002/stem.315.
- Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H. (2011): A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300 (4), C723–C742. DOI: 10.1152/ajpcell.00462.2010.
- Efthymiou, A. G.; Steiner, J.; Pavan, W. J.; Wincovitch, S.; Larson, D. M.; Porter, F. D.; Rao, M. S.; Malik, N. (2015): Rescue of an in vitro neuron phenotype identified in Niemann-Pick disease, type C1 induced pluripotent stem cell-derived neurons by modulating the WNT pathway and calcium signaling. *Stem cells translational medicine* 4 (3), S. 230–238. DOI: 10.5966/sctm.2014-0127.
- Estève, J.; Blouin, J.-M.; Lalanne, M.; Azzi-Martin, L.; Dubus, P.; Bidet, A.; Harambat, J.; Llanas, B. et al. (2019): Generation of induced pluripotent stem cells-derived hepatocyte-like cells for ex vivo gene therapy of primary hyperoxaluria type 1. *Stem cell research* 38, S. 101467. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101467.
- Fan, J. Q.; Ishii, S.; Asano, N.; Suzuki, Y. (1999): Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature medicine* 5 (1), S. 112–115. DOI: 10.1038/4801.
- Fanello, T.; Dardis, A.; Rosano, C.; Tarugi, P.; Tappino, B.; Zampieri, S.; Pinotti, E.; Corsolini, F. et al. (2009): Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann-Pick C Italian patients: identification and structural modeling of novel mutations. *Neurogenetics* 10 (3), S. 229–239. DOI: 10.1007/s10048-009-0175-3.

- Flanagan, J. J.; Rossi, B.; Tang, K.; Wu, X.; Mascioli, K.; Donaudy, F.; Tuzzi, M. R.; Fontana, F. et al. (2009): The pharmacological chaperone 1-deoxyojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase. *Human mutation* 30 (12), S. 1683–1692. DOI: 10.1002/humu.21121.
- Fog, C. K.; Kirkegaard, T. (2019): Animal models for Niemann-Pick type C: implications for drug discovery & development. *Expert opinion on drug discovery* 14 (5), S. 499–509. DOI: 10.1080/17460441.2019.1588882.
- Fukuda, H.; Karaki, F.; Dodo, K.; Noguchi-Yachide, T.; Ishikawa, M.; Hashimoto, Y.; Ohgane, K. (2017): Phenanthridin-6-one derivatives as the first class of non-steroidal pharmacological chaperones for Niemann-Pick disease type C1 protein. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 27 (12), S. 2781–2787. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.04.062.
- Galafold® Amenability Table. Online verfügbar unter <https://www.galafoldamenabilitytable.com/>, zuletzt geprüft am 05.03.2022.
- Geberhiwot, T.; Moro, A.; Dardis, A.; Ramaswami, U.; Sirrs, S.; Marfa, M. P.; Vanier, M. T.; Walterfang, M. et al. (2018): Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet journal of rare diseases* 13 (1), S. 50. DOI: 10.1186/s13023-018-0785-7.
- Gelsthorpe, M. E.; Baumann, N.; Millard, E.; Gale, S. E.; Langmade, S. J.; Schaffer, J. E.; Ory, D. S. (2008): Niemann-Pick Type C1 I1061T Mutant Encodes a Functional Protein That Is Selected for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Due to Protein Misfolding. *Journal of Biological Chemistry* 283 (13), S. 8229–8236. DOI: 10.1074/jbc.M708735200.
- Giese, A.-K.; Mascher, H.; Grittner, U.; Eichler, S.; Kramp, G.; Lukas, J.; te Vruchte, D.; Al Eisa, N. et al. (2015): A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet journal of rare diseases* 10, S. 78. DOI: 10.1186/s13023-015-0274-1.
- Han, T.-U.; Sam, R.; Sidransky, E. (2020): Small Molecule Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease and GBA1-Associated Parkinson Disease. *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 271. DOI: 10.3389/fcell.2020.00271.
- Hay, D. C.; Zhao, D.; Fletcher, J.; Hewitt, Z. A.; McLean, D.; Urruticoechea-Uriguen, A.; Black, J. R.; Elcombe, C. et al. (2008): Efficient Differentiation of Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells Exhibiting Markers Recapitulating Liver Development In Vivo. *STEM CELLS* 26 (4), S. 894–902. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0718.
- Hay, D. C.; Zhao, D.; Ross, A.; Mandalam, R.; Lebkowski, J.; Cui, W. (2007): Direct Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Hepatocyte-like Cells Exhibiting Functional Activities. *Cloning and Stem Cells* 9 (1), S. 51–62. DOI: 10.1089/clo.2006.0045.
- Hill, C. H.; Viuff, A. H.; Spratley, S. J.; Salamone, S.; Christensen, S. H.; Read, R. J.; Moriarty, N. W.; Jensen, H. H. et al. (2015): Azasugar inhibitors as pharmacological chaperones for Krabbe disease. *Chemical Science* 6 (5), S. 3075–3086. DOI: 10.1039/c5sc00754b.
- Hoy, S. M. (2013): Abiraterone acetate: a review of its use in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drugs* 73 (18), S. 2077–2091. DOI: 10.1007/s40265-013-0150-z.
- Infante, R. E.; Abi-Mosleh, L.; Radhakrishnan, A.; Dale, J. D.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2008a): Purified NPC1 Protein. *Journal of Biological Chemistry* 283 (2), S. 1052–1063. DOI: 10.1074/jbc.M707943200.
- Infante, R. E.; Radhakrishnan, A.; Abi-Mosleh, L.; Kinch, L. N.; Wang, M. L.; Grishin, N. V.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2008b): Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop. *The Journal of biological chemistry* 283 (2), S. 1064–1075. DOI: 10.1074/jbc.M707944200.
- Ioannou, Y. A. (2000): The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Molecular Genetics and Metabolism* 71 (1-2). DOI: 10.1006/mgme.2000.3061.

- Jamrozik, Z.; Szczudlik, P.; Lugowska, A.; Weiß, S.; Rolfs, A.; Czartoryska, B.; Kweciński, H. (2013): A case report of 'variant' biochemical phenotype of Niemann-Pick C disease and a discussion of therapeutic options. *Neurologia i neurochirurgia polska* 47 (1), S. 86–89. DOI: 10.5114/ninp.2012.31548.
- Jaschevatzky, O. E.; Anderman, S.; Shalit, A.; Kampf, D.; Grünstein, S. (1979): The treatment of postmenopausal syndrome by monthly oral doses of quinestrol. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 58 (2), S. 175–178. DOI: 10.3109/00016347909154577.
- Jesús, S.; Cáceres-Redondo, M. T.; Carrillo, F.; Cordones, I.; Escudero, M.; Macías-Vidal, J.; Coll, M. J.; Bautista, J. et al. (2013): Adult form of Niemann-Pick type C with the variant biochemical phenotype on treatment with Miglustat. *Parkinsonism & related disorders* 19 (10), S. 916–917. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2013.05.016.
- Jürs, A. V.; Völkner, C.; Liedtke, M.; Huth, K.; Lukas, J.; Hermann, A.; Frech, M. J. (2020): Oxidative Stress and Alterations in the Antioxidative Defense System in Neuronal Cells Derived from NPC1 Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *International journal of molecular sciences* 21 (20). DOI: 10.3390/ijms21207667.
- Kandakatla, N.; Ramakrishnan, G.; Chekkara, R.; Balakrishnan, N. (2014): Computational screening of disease associated mutations on NPC1 gene and its structural consequence in Niemann-Pick type-C1. *Frontiers in Biology* 9 (5), S. 410–421. DOI: 10.1007/s11515-014-1314-2.
- Karten, B.; Peake, K. B.; Vance, J. E. (2009): Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791 (7), S. 659–670. DOI: 10.1016/j.bbalip.2009.01.025.
- Karten, B.; Vance, D. E.; Campenot, R. B.; Vance, J. E. (2002): Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons, of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *Journal of Neurochemistry* 83 (5), S. 1154–1163. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2002.01220.x.
- Kirkegaard, T.; Gray, J.; Priestman, D. A.; Wallom, K.-L.; Atkins, J.; Olsen, O. D.; Klein, A.; Drndarski, S. et al. (2016): Heat shock protein-based therapy as a potential candidate for treating the sphingolipidoses. *Science Translational Medicine* 8 (355), 355ra118. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad9823.
- Kopytova, A. E.; Rychkov, G. N.; Nikolaev, M. A.; Baydakova, G. V.; Cheblokov, A. A.; Senkevich, K. A.; Bogdanova, D. A.; Bolshakova, O. I. et al. (2021): Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and Parkinsonism. *Parkinsonism & related disorders* 84, S. 112–121. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2021.02.003.
- Kwon, H. J.; Abi-Mosleh, L.; Wang, M. L.; Deisenhofer, J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Infante, R. E. (2009): Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol. *Cell* 137 (7), S. 1213–1224. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.049.
- Leinekugel, P.; Michel, S.; Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1992): Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Human Genetics* 88 (5), S. 513–523. DOI: 10.1007/BF00219337.
- Li, X.; Lu, F.; Trinh, M. N.; Schmiede, P.; Seemann, J.; Wang, J.; Blobel, G. (2017): 3.3 Å structure of Niemann-Pick C1 protein reveals insights into the function of the C-terminal luminal domain in cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (34), S. 9116–9121. DOI: 10.1073/pnas.1711716114.
- Liguori, L.; Monticelli, M.; Allocca, M.; Hay Mele, B.; Lukas, J.; Cubellis, M. V.; Andreotti, G. (2020): Pharmacological Chaperones: A Therapeutic Approach for Diseases Caused by Destabilizing Missense Mutations. *International journal of molecular sciences* 21 (2). DOI: 10.3390/ijms21020489.

- Liu, R.; Lu, P.; Chu, J. W. K.; Sharom, F. J. (2009): Characterization of fluorescent sterol binding to purified human NPC1. *The Journal of biological chemistry* 284 (3), S. 1840–1852. DOI: 10.1074/jbc.M803741200.
- Lloyd-Evans, E.; Platt, F. M. (2010): Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (4), S. 419–428. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2010.01032.x.
- Lo, S. M.; McNamara, J.; Seashore, M. R.; Mistry, P. K. (2010): Misdiagnosis of Niemann-Pick disease type C as Gaucher disease. *Journal of inherited metabolic disease* 33 Suppl 3, S429-33. DOI: 10.1007/s10545-010-9214-3.
- Long, T.; Qi, X.; Hassan, A.; Liang, Q.; Brabander, J. K. de; Li, X. (2020): Structural basis for itraconazole-mediated NPC1 inhibition. *Nature Communications* 11 (1). DOI: 10.1038/s41467-019-13917-5.
- Lopes-Pacheco, M. (2019): CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in pharmacology* 10, S. 1662. DOI: 10.3389/fphar.2019.01662.
- Lu, F.; Liang, Q.; Abi-Mosleh, L.; Das, A.; Brabander, J. K. de; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2015): Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.12177.
- Lyseng-Williamson, K. A. (2014): Miglustat: A Review of Its Use in Niemann-Pick Disease Type C. *Drugs* 74 (1), S. 61–74. DOI: 10.1007/s40265-013-0164-6.
- Macías-Vidal, J.; Girós, M.; Guerrero, M.; Gascón, P.; Serratos, J.; Bachs, O.; Coll, M. J. (2014): The proteasome inhibitor bortezomib reduced cholesterol accumulation in fibroblasts from Niemann-Pick type C patients carrying missense mutations. *The FEBS journal* 281 (19), S. 4450–4466. DOI: 10.1111/febs.12954.
- Maegawa, G. H. B.; Tropak, M.; Buttner, J.; Stockley, T.; Kok, F.; Clarke, J. T. R.; Mahuran, D. J. (2007): Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *The Journal of biological chemistry* 282 (12), S. 9150–9161. DOI: 10.1074/jbc.M609304200.
- Maegawa, G. H. B.; Tropak, M. B.; Buttner, J. D.; Rigat, B. A.; Fuller, M.; Pandit, D.; Tang, L.; Kornhaber, G. J. et al. (2009): Identification and characterization of amroxolol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *The Journal of biological chemistry* 284 (35), S. 23502–23516. DOI: 10.1074/jbc.M109.012393.
- Maetzel, D.; Sarkar, S.; Wang, H.; Abi-Mosleh, L.; Xu, P.; Cheng, A. W.; Gao, Q.; Mitalipova, M. et al. (2014): Genetic and chemical correction of cholesterol accumulation and impaired autophagy in hepatic and neural cells derived from Niemann-Pick Type C patient-specific iPSCs. *Stem cell reports* 2 (6), S. 866–880. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.03.014.
- Markham, A. (2016): Migalastat: First Global Approval. *Drugs* 76 (11), S. 1147–1152. DOI: 10.1007/s40265-016-0607-y.
- Maue, R. A.; Burgess, R. W.; Wang, B.; Wooley, C. M.; Seburn, K. L.; Vanier, M. T.; Rogers, M. A.; Chang, C. C. et al. (2012): A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Human Molecular Genetics* 21 (4), S. 730–750. DOI: 10.1093/hmg/ddr505.
- McKay Bounford, K.; Gissen, P. (2014): Genetic and laboratory diagnostic approach in Niemann Pick disease type C. *Journal of Neurology* 261 (S2), S. 569–575. DOI: 10.1007/s00415-014-7386-8.
- Meikle, A. Wayne (1999): Hormone Replacement Therapy. Totowa, NJ: Humana Press (Contemporary Endocrinology Ser, v.13). Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=6489892>.
- Mengel, E.; Patterson, M. C.; Da Rioli, R. M.; Del Toro, M.; Deodato, F.; Gautschi, M.; Grunewald, S.; Grønborg, S. et al. (2021): Efficacy and safety of arimocloamol in Niemann-Pick disease type C:

- Results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, multinational phase 2/3 trial of a novel treatment. *Journal of inherited metabolic disease* 44 (6), S. 1463–1480. DOI: 10.1002/jimd.12428.
- Mesmin, B.; Maxfield, F. R. (2009): Intracellular sterol dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1791 (7), S. 636–645. DOI: 10.1016/j.bbali.2009.03.002.
- Millat, G.; Marçais, C.; Rafi, M. A.; Yamamoto, T.; Morris, J. A.; Pentchev, P. G.; Ohno, K.; Wenger, D. A. et al. (1999): Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *American journal of human genetics* 65 (5), S. 1321–1329. DOI: 10.1086/302626.
- Millat, G.; Marçais, C.; Tomasetto, C.; Chikh, K.; Fensom, A. H.; Harzer, K.; Wenger, D. A.; Ohno, K. et al. (2001): Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *American journal of human genetics* 68 (6), S. 1373–1385. DOI: 10.1086/320606.
- Mohamed, F. E.; Al-Gazali, L.; Al-Jasmi, F.; Ali, B. R. (2017): Pharmaceutical Chaperones and Proteostasis Regulators in the Therapy of Lysosomal Storage Disorders: Current Perspective and Future Promises. *Frontiers in pharmacology* 8, S. 448. DOI: 10.3389/fphar.2017.00448.
- Moran, N. (2018): FDA approves Galafold, a triumph for Amicus. *Nature biotechnology* 36 (10), S. 913. DOI: 10.1038/nbt1018-913.
- Morello, J. P.; Salahpour, A.; Laperrière, A.; Bernier, V.; Arthus, M. F.; Lonergan, M.; Petäjä-Repo, U.; Angers, S. et al. (2000): Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *The Journal of clinical investigation* 105 (7), S. 887–895. DOI: 10.1172/JCI8688.
- Muller, C. P.; Stephany, D. A.; Winkler, D. F.; Hoeg, J. M.; Demosky, S. J.; Wunderlich, J. R. (1984): Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. *Cytometry* 5 (1), S. 42–54. DOI: 10.1002/cyto.990050108.
- Muntau, A. C.; Leandro, J.; Staudigl, M.; Mayer, F.; Gersting, S. W. (2014): Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *Journal of inherited metabolic disease* 37 (4), S. 505–523. DOI: 10.1007/s10545-014-9701-z.
- Musalkova, D.; Majer, F.; Kuchar, L.; Luksan, O.; Asfaw, B.; Vlaskova, H.; Storkanova, G.; Reboun, M. et al. (2020): Transcript, protein, metabolite and cellular studies in skin fibroblasts demonstrate variable pathogenic impacts of NPC1 mutations. *Orphanet journal of rare diseases* 15 (1), S. 85. DOI: 10.1186/s13023-020-01360-5.
- Nakasone, N.; Nakamura, Y. S.; Higaki, K.; Oumi, N.; Ohno, K.; Ninomiya, H. (2014): Endoplasmic reticulum-associated degradation of Niemann-Pick C1: evidence for the role of heat shock proteins and identification of lysine residues that accept ubiquitin. *The Journal of biological chemistry* 289 (28), S. 19714–19725. DOI: 10.1074/jbc.M114.549915.
- Naureckiene, S.; Sleat, D. E.; Lackland, H.; Fensom, A.; Vanier, M. T.; Wattiaux, R.; Jadot, M.; Lobel, P. (2000): Identification of HE1 as the Second Gene of Niemann-Pick C Disease. *Science* 290 (5500), S. 2298–2301. DOI: 10.1126/science.290.5500.2298.
- Nikitina, T. V.; Kashevarova, A. A.; Lebedev, I. N. (2019): Chromosomal Instability and Karyotype Correction in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Russian Journal of Genetics* 55 (10), S. 1183–1195. DOI: 10.1134/S1022795419100090.
- Norrman, K.; Strömbeck, A.; Semb, H.; Ståhlberg, A. (2013): Distinct gene expression signatures in human embryonic stem cells differentiated towards definitive endoderm at single-cell level. *Methods* 59 (1), S. 59–70. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.03.030.
- Ohgami, N.; Ko, D. C.; Thomas, M.; Scott, M. P.; Chang, C. C. Y.; Chang, T.-Y. (2004): Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a

- functional sterol-sensing domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (34), S. 12473–12478. DOI: 10.1073/pnas.0405255101.
- Ohgane, K.; Karaki, F.; Dodo, K.; Hashimoto, Y. (2013): Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chemistry & biology* 20 (3), S. 391–402. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.02.009.
- Ohgane, K.; Karaki, F.; Noguchi-Yachide, T.; Dodo, K.; Hashimoto, Y. (2014): Structure-activity relationships of oxysterol-derived pharmacological chaperones for Niemann-Pick type C1 protein. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 24 (15), S. 3480–3485. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.05.064.
- Ohsaki, Y.; Sugimoto, Y.; Suzuki, M.; Hosokawa, H.; Yoshimori, T.; Davies, J. P.; Ioannou, Y. A.; Vanier, M. T. et al. (2006): Cholesterol depletion facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4. *Journal of Cell Science* 119 (13), S. 2643–2653. DOI: 10.1242/jcs.02993.
- Ohtani, Y.; Irie, T.; Uekama, K.; Fukunaga, K.; Pitha, J. (1989): Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *European journal of biochemistry* 186 (1-2), S. 17–22. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15171.x.
- Pampalone, G.; Grottelli, S.; Gatticchi, L.; Lombardi, E. M.; Bellezza, I.; Cellini, B. (2021): Role of misfolding in rare enzymatic deficits and use of pharmacological chaperones as therapeutic approach. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 26 (12), S. 1627–1642. DOI: 10.52586/5056.
- Papp, E.; Csermely, P. (2006): Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use. *Handbook of experimental pharmacology* (172), S. 405–416. DOI: 10.1007/3-540-29717-0_16.
- Parenti, G. (2009): Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO molecular medicine* 1 (5), S. 268–279. DOI: 10.1002/emmm.200900036.
- Parenti, G.; Andria, G.; Valenzano, K. J. (2015): Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (7), S. 1138–1148. DOI: 10.1038/mt.2015.62.
- Park, W. D.; O'Brien, J. F.; Lundquist, P. A.; Kraft, D. L.; Vockley, C. W.; Karnes, P. S.; Patterson, M. C.; Snow, K. (2003): Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Human mutation* 22 (4), S. 313–325. DOI: 10.1002/humu.10255.
- Patterson, M. C.; Vecchio, D.; Jacklin, E.; Abel, L.; Chadha-Boreham, H.; Luzy, C.; Giorgino, R.; Wraith, J. E. (2010): Long-Term Miglustat Therapy in Children With Niemann-Pick Disease Type C. *Journal of Child Neurology* 25 (3), S. 300–305. DOI: 10.1177/0883073809344222.
- Patterson, M. C.; Vecchio, D.; Prady, H.; Abel, L.; Wraith, J. E. (2007): Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *The Lancet Neurology* 6 (9), S. 765–772. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70194-1.
- Pentchev, P. G.; Comly, M. E.; Kruth, H. S.; Vanier, M. T.; Wenger, D. A.; Patel, S.; Brady, R. O. (1985): A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (23), S. 8247–8251. DOI: 10.1073/pnas.82.23.8247.
- Pentchev, P. G.; Gal, A. E.; Booth, A. D.; Omodeo-Sale, F.; Fours, J.; Neumeyer, B. A.; Quirk, J. M.; Dawson, G. et al. (1980): A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 619 (3), S. 669–679. DOI: 10.1016/0005-2760(80)90116-2.
- Pereira, D. M.; Valentão, P.; Andrade, P. B. (2018): Tuning protein folding in lysosomal storage diseases: the chemistry behind pharmacological chaperones. *Chemical Science* 9 (7), S. 1740–1752. DOI: 10.1039/c7sc04712f.

- Peter, F.; Rost, S.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017a): Activation of PKC triggers rescue of NPC1 patient specific iPSC derived glial cells from gliosis. *Orphanet journal of rare diseases* 12 (1), S. 145. DOI: 10.1186/s13023-017-0697-y.
- Peter, F.; Trilek, M.; Rabenstein, M.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017b): Dataset in support of the generation of Niemann-Pick disease Type C1 patient-specific iPSC cell lines carrying the novel NPC1 mutation c.1180T>C or the prevalent c.3182T>C mutation – Analysis of pluripotency and neuronal differentiation. *Data in Brief* 12, S. 123–131. DOI: 10.1016/j.dib.2017.03.042.
- Petrosyan, R.; Patra, S.; Rezajooei, N.; Garen, C. R.; Woodside, M. T. (2021): Unfolded and intermediate states of PrP play a key role in the mechanism of action of an antiprion chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (9). DOI: 10.1073/pnas.2010213118.
- Piña-Aguilar, R. E.; Vera-Loaiza, A.; Chacón-Camacho, O. F.; Zenteno, J. C.; Nuñez-Orozco, L.; Santillán-Hernández, Y. (2014): Clinical and Genetic Characteristics of Mexican Patients with Juvenile Presentation of Niemann-Pick Type C Disease. *Case Reports in Neurological Medicine* 2014. DOI: 10.1155/2014/785890.
- Pineda, M.; Wraith, J. E.; Mengel, E.; Sedel, F.; Hwu, W.-L.; Rohrbach, M.; Bembi, B.; Walterfang, M. et al. (2009): Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): A multicenter observational retrospective cohort study. *Molecular Genetics and Metabolism* 98 (3), S. 243–249. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.07.003.
- Pipalia, N. H.; Cosner, C. C.; Huang, A.; Chatterjee, A.; Bourbon, P.; Farley, N.; Helquist, P.; Wiest, O. et al. (2011): Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (14), S. 5620–5625. DOI: 10.1073/pnas.1014890108.
- Pipalia, N. H.; Huang, A.; Ralph, H.; Rujoi, M.; Maxfield, F. R. (2006): Automated microscopy screening for compounds that partially revert cholesterol accumulation in Niemann-Pick C cells. *Journal of lipid research* 47 (2). DOI: 10.1194/jlr.M500388-JLR200.
- Pipalia, N. H.; Subramanian, K.; Mao, S.; Ralph, H.; Hutt, D. M.; Scott, S. M.; Balch, W. E.; Maxfield, F. R. (2017): Histone deacetylase inhibitors correct the cholesterol storage defect in most Niemann-Pick C1 mutant cells. *Journal of lipid research* 58 (4), S. 695–708. DOI: 10.1194/jlr.M072140.
- Porter, F. D.; Scherrer, D. E.; Lanier, M. H.; Langmade, S. J.; Molugu, V.; Gale, S. E.; Olzeski, D.; Sidhu, R. et al. (2010): Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Science Translational Medicine* 2 (56), 56ra81. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001417.
- Praggastis, M.; Tortelli, B.; Zhang, J.; Fujiwara, H.; Sidhu, R.; Chacko, A.; Chen, Z.; Chung, C. et al. (2015): A Murine Niemann-Pick C1 I1061T Knock-In Model Recapitulates the Pathological Features of the Most Prevalent Human Disease Allele. *Journal of Neuroscience* 35 (21), S. 8091–8106. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4173-14.2015.
- Pugach, E. K.; Feltes, M.; Kaufman, R. J.; Ory, D. S.; Bang, A. G. (2018): High-content screen for modifiers of Niemann-Pick type C disease in patient cells. *Human Molecular Genetics* 27 (12), S. 2101–2112. DOI: 10.1093/hmg/ddy117.
- Pushpakom, S.; Iorio, F.; Eyers, P. A.; Escott, K. J.; Hopper, S.; Wells, A.; Doig, A.; Guilliams, T. et al. (2019): Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews. Drug discovery* 18 (1), S. 41–58. DOI: 10.1038/nrd.2018.168.
- Qian, H.; Wu, X.; Du, X.; Yao, X.; Zhao, X.; Lee, J.; Yang, H.; Yan, N. (2020): Structural Basis of Low-pH-Dependent Lysosomal Cholesterol Egress by NPC1 and NPC2. *Cell* 182 (1), 98-111.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.020.

- Rabenstein, M.; Peter, F.; Joost, S.; Trilck, M.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017): Decreased calcium flux in Niemann-Pick type C1 patient-specific iPSC-derived neurons due to higher amount of calcium-impermeable AMPA receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience* 83, S. 27–36. DOI: 10.1016/j.mcn.2017.06.007.
- Rajan, R. S.; Tsumoto, K.; Tokunaga, M.; Tokunaga, H.; Kita, Y.; Arakawa, T. (2011): Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Current medicinal chemistry* 18 (1), S. 1–15. DOI: 10.2174/092986711793979698.
- Rauniyar, N.; Subramanian, K.; Lavallée-Adam, M.; Martínez-Bartolomé, S.; Balch, W. E.; Yates, J. R. (2015): Quantitative Proteomics of Human Fibroblasts with I1061T Mutation in Niemann-Pick C1 (NPC1) Protein Provides Insights into the Disease Pathogenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 14 (7), S. 1734–1749. DOI: 10.1074/mcp.M114.045609.
- Ribeiro, I.; Marcão, A.; Amaral, O.; Sá Miranda, M.; Vanier, M. T.; Millat, G. (2001): Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Human Genetics* 109 (1), S. 24–32. DOI: 10.1007/s004390100531.
- Ringe, D. (1995): What makes a binding site a binding site? *Current Opinion in Structural Biology* 5 (6), S. 825–829. DOI: 10.1016/0959-440X(95)80017-4.
- Ringe, D.; Petsko, G. A. (2009): What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *Journal of biology* 8 (9), S. 80. DOI: 10.1186/jbiol186.
- Roig-Zamboni, V.; Cobucci-Ponzano, B.; Iacono, R.; Ferrara, M. C.; Germany, S.; Bourne, Y.; Parenti, G.; Moracci, M. et al. (2017): Structure of human lysosomal acid α -glucosidase-a guide for the treatment of Pompe disease. *Nature Communications* 8 (1), S. 1111. DOI: 10.1038/s41467-017-01263-3.
- Romanello, M.; Zampieri, S.; Bortolotti, N.; Deroma, L.; Sechi, A.; Fiumara, A.; Parini, R.; Borroni, B. et al. (2016): Comprehensive Evaluation of Plasma 7-Ketocholesterol and Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol in an Italian Cohort of Patients Affected by Niemann-Pick Disease due to NPC1 and SMPD1 Mutations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 455, S. 39–45. DOI: 10.1016/j.cca.2016.01.003.
- Rosenbaum, A. I.; Maxfield, F. R. (2011): Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *Journal of Neurochemistry* 116 (5), S. 789–795. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06976.x.
- Schultz, M. L.; Krus, K. L.; Kaushik, S.; Dang, D.; Chopra, R.; Qi, L.; Shakkottai, V. G.; Cuervo, A. M. et al. (2018): Coordinate regulation of mutant NPC1 degradation by selective ER autophagy and MARCH6-dependent ERAD. *Nature Communications* 9. DOI: 10.1038/s41467-018-06115-2.
- Scott, C.; Higgins, M. E.; Davies, J. P.; Ioannou, Y. A. (2004): Targeting of NPC1 to Late Endosomes Involves Multiple Signals, Including One Residing within the Putative Sterol-sensing Domain. *Journal of Biological Chemistry* 279 (46), S. 48214–48223. DOI: 10.1074/jbc.M406090200.
- Scott, C.; Ioannou, Y. A. (2004): The NPC1 protein: structure implies function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1685 (1-3), S. 8–13. DOI: 10.1016/j.bbalip.2004.08.006.
- Sévin, M.; Lesca, G.; Baumann, N.; Millat, G.; Lyon-Caen, O.; Vanier, M. T.; Sedel, F. (2007): The adult form of Niemann-Pick disease type C. *Brain : a journal of neurology* 130 (Pt 1), S. 120–133. DOI: 10.1093/brain/awl260.
- Shammas, H.; Kuech, E.-M.; Rizk, S.; Das, A. M.; Naim, H. Y. (2019): Different Niemann-Pick C1 Genotypes Generate Protein Phenotypes that Vary in their Intracellular Processing, Trafficking and Localization. *Scientific reports* 9 (1), S. 5292. DOI: 10.1038/s41598-019-41707-y.
- Shi, Y.; Gerritsma, D.; Bowes, A. J.; Capretta, A.; Werstuck, G. H. (2007): Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17 (16), S. 4491–4494. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.06.006.

- Shin, M. H.; Lim, H.-S. (2017): Screening methods for identifying pharmacological chaperones. *Molecular bioSystems* 13 (4), S. 638–647. DOI: 10.1039/c6mb00866f.
- Shioi, R.; Karaki, F.; Yoshioka, H.; Noguchi-Yachide, T.; Ishikawa, M.; Dodo, K.; Hashimoto, Y.; Sodeoka, M. et al. (2020): Image-based screen capturing misfolding status of Niemann-Pick type C1 identifies potential candidates for chaperone drugs. *PLoS ONE* 15 (12), e0243746. DOI: 10.1371/journal.pone.0243746.
- Shulman, L. M.; David, N. J.; Weiner, W. J. (1995): Psychosis as the initial manifestation of adult-onset Niemann-Pick disease type C. *Neurology* 45 (9). DOI: 10.1212/wnl.45.9.1739.
- Sitarska, D.; Ługowska, A. (2019): Laboratory diagnosis of the Niemann-Pick type C disease: an inherited neurodegenerative disorder of cholesterol metabolism. *Metabolic brain disease* 34 (5), S. 1253–1260. DOI: 10.1007/s11011-019-00445-w.
- Sitarska, D.; Tylki-Szymańska, A.; Ługowska, A. (2021): Treatment trials in Niemann-Pick type C disease. *Metabolic Brain Disease*. DOI: 10.1007/s11011-021-00842-0.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Soga, M.; Ishitsuka, Y.; Hamasaki, M.; Yoneda, K.; Furuya, H.; Matsuo, M.; Ihn, H.; Fusaki, N. et al. (2015): HPGCD outperforms HPBCD as a potential treatment for Niemann-Pick disease type C during disease modeling with iPS cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33 (4), S. 1075–1088. DOI: 10.1002/stem.1917.
- Sullivan, G. J.; Hay, D. C.; Park, I.-H.; Fletcher, J.; Hannoun, Z.; Payne, C. M.; Dalgetty, D.; Black, J. R. et al. (2010): Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51 (1), S. 329–335. DOI: 10.1002/hep.23335.
- Sun, X.; Marks, D. L.; Park, W. D.; Wheatley, C. L.; Puri, V.; O'Brien, J. F.; Kraft, D. L.; Lundquist, P. A. et al. (2001): Niemann-Pick C Variant Detection by Altered Sphingolipid Trafficking and Correlation with Mutations within a Specific Domain of NPC1. *The American Journal of Human Genetics* 68 (6), S. 1361–1372. DOI: 10.1086/320599.
- Sung, E.-A.; Yu, K.-R.; Shin, J.-H.; Seo, Y.; Kim, H.-S.; Koog, M. G.; Kang, I.; Kim, J.-J. et al. (2017): Generation of patient specific human neural stem cells from Niemann-Pick disease type C patient-derived fibroblasts. *Oncotarget* 8 (49), S. 85428–85441. DOI: 10.18632/oncotarget.19976.
- Taapken, S. M.; Nisler, B. S.; Newton, M. A.; Sampsell-Barron, T. L.; Leonhard, K. A.; McIntire, E. M.; Montgomery, K. D. (2011): Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 29 (4), S. 313–314. DOI: 10.1038/nbt.1835.
- Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. (2007): Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131 (5), S. 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takai, T.; Higaki, K.; Aguilar-Moncayo, M.; Mena-Barragán, T.; Hirano, Y.; Yura, K.; Yu, L.; Ninomiya, H. et al. (2013): A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM1 gangliosidosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (3), S. 526–532. DOI: 10.1038/mt.2012.263.
- te Vruchte, D.; Lloyd-Evans, E.; Veldman, R. J.; Neville, D. C. A.; Dwek, R. A.; Platt, F. M.; van Blitterswijk, W. J.; Sillence, D. J. (2004): Accumulation of glycosphingolipids in Niemann-Pick C disease disrupts endosomal transport. *The Journal of biological chemistry* 279 (25), S. 26167–26175. DOI: 10.1074/jbc.M311591200.
- The Drugbank. Online verfügbar unter <https://go.drugbank.com/>, zuletzt geprüft am 23.01.2019.

- The Human Gene Mutation Database. Online verfügbar unter <http://www.hgmd.org>, zuletzt geprüft am 08.11.2021.
- Tiscione, S. A.; Vivas, O.; Ginsburg, K. S.; Bers, D. M.; Ory, D. S.; Santana, L. F.; Dixon, R. E.; Dickson, E. J. (2019): Disease-associated mutations in Niemann-Pick type C1 alter ER calcium signaling and neuronal plasticity. *The Journal of cell biology* 218 (12), S. 4141–4156. DOI: 10.1083/jcb.201903018.
- Toivonen, S.; Lundin, K.; Balboa, D.; Ustinov, J.; Tamminen, K.; Palgi, J.; Trokovic, R.; Tuuri, T. et al. (2013): Activin A and Wnt-dependent specification of human definitive endoderm cells. *Experimental Cell Research* 319 (17), S. 2535–2544. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.007.
- Tran, M. L.; Génisson, Y.; Ballereau, S.; Dehoux, C. (2020): Second-Generation Pharmacological Chaperones: Beyond Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (14). DOI: 10.3390/molecules25143145.
- Trilck, M.; Hübner, R.; Seibler, P.; Klein, C.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2013): Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8, S. 144. DOI: 10.1186/1750-1172-8-144.
- Trilck, M.; Peter, F.; Zheng, C.; Frank, M.; Dobrenis, K.; Mascher, H.; Rolfs, A.; Frech, M. J. (2017): Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons. *Brain research* 1657, S. 52–61. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.11.031.
- Trinh, M. N.; Lu, F.; Li, X.; Das, A.; Liang, Q.; Brabander, J. K. de; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2017): Triazoles inhibit cholesterol export from lysosomes by binding to NPC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (1), S. 89–94. DOI: 10.1073/pnas.1619571114.
- Valenzano, K. J.; Khanna, R.; Powe, A. C.; Boyd, R.; Lee, G.; Flanagan, J. J.; Benjamin, E. R. (2011): Identification and Characterization of Pharmacological Chaperones to Correct Enzyme Deficiencies in Lysosomal Storage Disorders. *ASSAY and Drug Development Technologies* 9 (3), S. 213–235. DOI: 10.1089/adt.2011.0370.
- Vance, J. E. (2012): Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms* 5 (6), S. 746–755. DOI: 10.1242/dmm.010124.
- Vance, J. E.; Peake, K. B. (2011): Function of the Niemann–Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Current Opinion in Lipidology* 22 (3), S. 204–209. DOI: 10.1097/MOL.0b013e3283453e69.
- Vanier, M. T. (2010): Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5 (1). DOI: 10.1186/1750-1172-5-16.
- Vanier, M. T.; Latour, P. (2015): Laboratory diagnosis of Niemann–Pick disease type C: The filipin staining test. In: Frances Platt (Hg.): *Lysosomes and lysosomal diseases*, Bd. 126. 1. ed. Amsterdam, Heidelberg: Elsevier Academic Pr (Methods in Cell Biology, 126), S. 357–375.
- Vanier, M. T.; Millat, G. (2003): Niemann-Pick disease type C. *Clinical genetics* 64 (4), S. 269–281. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x.
- Vanier, M. T.; Millat, G. (2004): Structure and function of the NPC2 protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1685 (1-3), S. 14–21. DOI: 10.1016/j.bbalip.2004.08.007.
- Vanier, M. T.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Rousson, R.; Gazzah, N.; Juge, M.-C.; Pentchev, P. G.; Revol, A.; Louisot, P. (1991): Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1096 (4), S. 328–337. DOI: 10.1016/0925-4439(91)90069-L.
- Varki, Ajit; Cummings, Richard D.; Esko, Jeffrey D.; Stanley, Pamela; Hart, Gerald W.; Aebi, Markus et al. (2017): *Essentials of Glycobiology*. Unter Mitarbeit von Ajit Varki, Richard D. Cummings,

- Jeffrey D. Esko, Pamela Stanley, Gerald W. Hart, Markus Aebi et al.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/>.
- Vauthier, V.; Housset, C.; Falguières, T. (2017): Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochemical pharmacology* 136, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.02.020.
- Völkner, C.; Liedtke, M.; Petters, J.; Huth, K.; Knuebel, G.; Murua Escobar, H.; Bullerdiek, J.; Lukas, J. et al. (2020a): Generation of an iPSC line (AKOSi006-A) from fibroblasts of an NPC1 patient, carrying the homozygous mutation p.I1061T (c.3182 T > C) and a control iPSC line (AKOSi007-A) using a non-integrating Sendai virus system. *Stem cell research* 49, S. 102056. DOI: 10.1016/j.scr.2020.102056.
- Völkner, C.; Liedtke, M.; Petters, J.; Lukas, J.; Escobar, H. M.; Knuebel, G.; Bullerdiek, J.; Holzmann, C. et al. (2020b): Generation of an iPSC line (AKOSi004-A) from fibroblasts of a female adult NPC1 patient, carrying the compound heterozygous mutation p.Val1023Serfs*15/p.Gly992Arg and of an iPSC line (AKOSi005-A) from a female adult control individual. *Stem cell research* 50, S. 102127. DOI: 10.1016/j.scr.2020.102127.
- Völkner, C.; Liedtke, M.; Untucht, R.; Hermann, A.; Frech, M. J. (2021): Patient-Specific iPSC-Derived Neural Differentiated and Hepatocyte-like Cells, Carrying the Compound Heterozygous Mutation p.V1023Sfs*15/p.G992R, Present the "Variant" Biochemical Phenotype of Niemann-Pick Type C1 Disease. *International journal of molecular sciences* 22 (22). DOI: 10.3390/ijms222212184.
- Völkner, C.; Peter, F.; Liedtke, M.; Krohn, S.; Lindner, I.; Murua Escobar, H.; Cimmaruta, C.; Lukas, J. et al. (2019): Generation of the Niemann–Pick type C2 patient-derived iPSC line AKOSi001-A. *Stem cell research* 41, S. 101606. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101606.
- Walkley, S. U.; Vanier, M. T. (2008): Pathomechanisms in Lysosomal Storage Disorders. *Biochimica et biophysica acta* 1793 (4), S. 726–736. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.014.
- Walterfang, M.; Fietz, M.; Fahey, M.; Sullivan, D.; Leane, P.; Lubman, D. I.; Velakoulis, D. (2006): The neuropsychiatry of Niemann-Pick type C disease in adulthood. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 18 (2), S. 158–170. DOI: 10.1176/jnp.2006.18.2.158.
- Wang, C.; Scott, S. M.; Subramanian, K.; Loguercio, S.; Zhao, P.; Hutt, D. M.; Farhat, N. Y.; Porter, F. D. et al. (2019): Quantitating the epigenetic transformation contributing to cholesterol homeostasis using Gaussian process. *Nature Communications* 10 (1), S. 5052. DOI: 10.1038/s41467-019-12969-x.
- Wang, M. L.; Motamed, M.; Infante, R. E.; Abi-Mosleh, L.; Kwon, H. J.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2010): Identification of Surface Residues on Niemann-Pick C2 Essential for Hydrophobic Handoff of Cholesterol to NPC1 in Lysosomes. *Cell Metabolism* 12 (2), S. 166–173. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.05.016.
- Wang, Y.; Alhaque, S.; Cameron, K.; Meseguer-Ripolles, J.; Lucendo-Villarin, B.; Rashidi, H.; Hay, D. C. (2017): Defined and Scalable Generation of Hepatocyte-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Journal of Visualized Experiments* (121). DOI: 10.3791/55355.
- Wassif, C. A.; Cross, J. L.; Iben, J.; Sanchez-Pulido, L.; Cougnoux, A.; Platt, F. M.; Ory, D. S.; Ponting, C. P. et al. (2016): High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 18 (1), S. 41–48. DOI: 10.1038/gim.2015.25.
- Watari, H.; Blanchette-Mackie, E. J.; Dwyer, N. K.; Glick, J. M.; Patel, S.; Neufeld, E. B.; Brady, R. O.; Pentchev, P. G. et al. (1999): Niemann-Pick C1 protein: obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (3), S. 805–810. DOI: 10.1073/pnas.96.3.805.
- Winklhofer, K. F.; Tatzelt, J.; Haass, C. (2008): The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *The EMBO journal* 27 (2), S. 336–349. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601930.

- Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. (2006): DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research* 34 (Database issue), D668-72. DOI: 10.1093/nar/gkj067.
- Woodard, J.; Zheng, W.; Zhang, Y. (2021): Protein structural features predict responsiveness to pharmacological chaperone treatment for three lysosomal storage disorders. *PLoS computational biology* 17 (9), e1009370. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1009370.
- Wraith, E. (2009): New therapies in the management of Niemann-Pick type C disease: clinical utility of miglustat. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, S. 877. DOI: 10.2147/TCRM.S5777.
- Wraith, J. E.; Vecchio, D.; Jacklin, E.; Abel, L.; Chadha-Boreham, H.; Luzy, C.; Giorgino, R.; Patterson, M. C. (2010): Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann–Pick disease type C: Long-term data from a clinical trial. *Molecular Genetics and Metabolism* 99 (4), S. 351–357. DOI: 10.1016/j.ymgme.2009.12.006.
- Xiao, B.; Wang, J.-G.; Han, F.; Shi, Y.-X. (2018): Effects of calcium-dependent molecular chaperones and endoplasmic reticulum in the amygdala in rats under single-prolonged stress. *Molecular medicine reports* 17 (1), S. 1099–1104. DOI: 10.3892/mmr.2017.7976.
- Xie, C.; Burns, D. K.; Turley, S. D.; Dietschy, J. M. (2000): Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 59 (12), S. 1106–1117. DOI: 10.1093/jnen/59.12.1106.
- Xu, S.; Benoff, B.; Liou, H.-L.; Lobel, P.; Stock, A. M. (2007): Structural Basis of Sterol Binding by NPC2, a Lysosomal Protein Deficient in Niemann-Pick Type C2 Disease. *Journal of Biological Chemistry* 282 (32), S. 23525–23531. DOI: 10.1074/jbc.M703848200.
- Yang, C.; Rahimpour, S.; Lu, J.; Pacak, K.; Ikejiri, B.; Brady, R. O.; Zhuang, Z. (2013): Histone deacetylase inhibitors increase glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulation of molecular chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (3), S. 966–971. DOI: 10.1073/pnas.1221046110.
- Yu, D.; Swaroop, M.; Wang, M.; Baxa, U.; Yang, R.; Yan, Y.; Coksaygan, T.; DeTolla, L. et al. (2014a): Niemann-Pick Disease Type C: Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Cells for Modeling Neural Disease and Evaluating Drug Efficacy. *Journal of biomolecular screening* 19 (8), S. 1164–1173. DOI: 10.1177/1087057114537378.
- Yu, T.; Chung, C.; Shen, D.; Xu, H.; Lieberman, A. P. (2012): Ryanodine receptor antagonists adapt NPC1 proteostasis to ameliorate lipid storage in Niemann–Pick type C disease fibroblasts. *Human Molecular Genetics* 21 (14), S. 3205–3214. DOI: 10.1093/hmg/dds145.
- Yu, Y.; Mena-Barragán, T.; Higaki, K.; Johnson, J. L.; Drury, J. E.; Lieberman, R. L.; Nakasone, N.; Ninomiya, H. et al. (2014b): Molecular basis of 1-deoxygalactonojirimycin arylthiourea binding to human α -galactosidase a: pharmacological chaperoning efficacy on Fabry disease mutants. *ACS chemical biology* 9 (7), S. 1460–1469. DOI: 10.1021/cb500143h.
- Zampieri, S.; Bembí, B.; Rosso, N.; Filocamo, M.; Dardis, A. (2012): Treatment of Human Fibroblasts Carrying NPC1 Missense Mutations with MG132 Leads to an Improvement of Intracellular Cholesterol Trafficking. *JIMD Reports* 2, S. 59–69. DOI: 10.1007/8904_2011_49.
- Zhang, J.; Liu, Q. (2015): Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein & Cell* 6 (4), S. 254–264. DOI: 10.1007/s13238-014-0131-3.
- Žurek, J. (2017): Biomarkers in Traumatic Brain Injury. In: Hemanshu Prabhakar (Hg.): Essentials of neuroanesthesia. London: Academic Press, S. 587–591.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Verlaufsformen und der neuroviszeralen Symptome bei NP-C1	2
Abbildung 2: Struktur des transmembranösen NPC1-Proteins	3
Abbildung 3: Mechanismus für den Cholesterolexport aus späten Endosomen/Lysosomen	5
Abbildung 4: Illustration der Variationsbreite des biochemischen NP-C1 Phänotyps	6
Abbildung 5: Faltung und Transport lysosomaler Proteine entlang des sekretorischen Wegs ..	8
Abbildung 6: Wirkmechanismus von pharmakologischen Chaperonen auf lysosomale Proteine	13
Abbildung 7: Retrovirale Reprogrammierung von Fibroblasten zu iPS-Zellen.....	39
Abbildung 8: Nachweis der Pluripotenzmarker in den etablierten iPS-Zelllinien.....	40
Abbildung 9: Nachweis Pluripotenz-assoziiierter Proteine mittels Durchflusszytometrie	41
Abbildung 10: Nachweis Pluripotenz-assoziiierter Gene mittels RT-PCR.....	42
Abbildung 11: Expressionsanalyse der Transgene mittels RT-PCR.....	43
Abbildung 12: Nachweis des <i>in vitro</i> Differenzierungspotenzials der generierten iPS-Zellen	43
Abbildung 13: Karyogramm der etablierten iPS-Zelllinien	44
Abbildung 14: Neurales Zellmodell.....	46
Abbildung 15: Hepatisches Zellmodell	48
Abbildung 16: Funktionelle Charakterisierung der Hepatozyten-ähnlichen Zellen	49
Abbildung 17: Analyse des Cholesterolgehalts in Fibroblasten	51
Abbildung 18: Analyse des Cholesterolgehalts in neural differenzierten Zellen.....	52
Abbildung 19: Analyse des Cholesterolgehalts in Hepatozyten-ähnlichen Zellen	53
Abbildung 20: NPC1-Protein Analyse in Fibroblasten	55
Abbildung 21: NPC1-Protein Analyse in neural differenzierten Zellen	56
Abbildung 22: NPC1-Protein Analyse in Hepatozyten-ähnlichen Zellen	57
Abbildung 23: Kolokalisationsanalyse in Fibroblasten	59
Abbildung 24: Kolokalisationsanalyse in neural differenzierten Zellen.....	60
Abbildung 25: Kolokalisationsanalyse in Hepatozyten-ähnlichen Zellen	61
Abbildung 26: Proteasomaler Abbau des NPC1-Proteins in Fibroblasten	62
Abbildung 27: Analyse des Cholesterolgehalts in NPC1 ^{I1061T/I1061T} -Fibroblasten nach Behandlung mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen	65
Abbildung 28: Analyse des NPC1-Proteins in NPC1 ^{I1061T/I1061T} -Fibroblasten nach Behandlung mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen	66

Abbildung 29: Kolokalisationsanalyse in NPC1 ^{I1061T/I1061T} -Fibroblasten nach Behandlung mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen.....	67
Abbildung 30: Analyse des Cholesterolgehalts in NPC1 ^{I1061T/I1061T} -NDZs nach Behandlung	68
Abbildung 31: Kolokalisationsanalyse in NPC1 ^{I1061T/I1061T} -NDZs nach Behandlung	69
Abbildung 32: Analyse des NPC1-Proteins in NPC1 ^{I1061T/I1061T} -NDZs nach Behandlung.....	69
Abbildung 33: Analyse des Cholesterolgehalts in NPC1 ^{I1061T/I1061T} HLZs nach Behandlung .	70
Abbildung 34: Kolokalisationsanalyse in NPC1 ^{I1061T/I1061T} HLZs nach Behandlung	71
Abbildung 35: Analyse des NPC1-Proteins in NPC1 ^{I1061T/I1061T} HLZs nach Behandlung.....	71
Abbildung 36: Behandlung NPC1-defizienter Zelllinien mit <i>missense</i> -Mutationen mit potentiellen pharmakologischen Chaperonen.....	73
Abbildung 37: Darstellung der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit.....	74
Abbildung 38: Nachweis der Pluripotenzmarker in den etablierten iPS-Zellen	130
Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse Pluripotenz-assoziiierter Proteine	131
Abbildung 40: Charakterisierung des Definitiven Endoderms	132
Abbildung 41: Nachweis neuraler Progenitorzellmarker in NPZs.....	132
Abbildung 42: Charakterisierung der hepatischen Progenitorzellen.....	133
Abbildung 43: Analyse des Filipingehalts in Fibroblasten, NDZ und HLZs.....	134
Abbildung 44: NPC1-Proteinexpression in Fibroblasten, NDZs und HLZs.....	135
Abbildung 45: Kolokalisationsanalyse in Fibroblasten, NDZs und HLZs	136

9 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses.....	35
Formel 2: Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten	38

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verwendete Kontroll- und NP-C1-Zelllinien	18
Tabelle 3.2: Verwendete Zelllinien	18
Tabelle 3.3: Verwendete Zellkulturmedien	19
Tabelle 3.4: Wirkstoffe	20
Tabelle 3.5: Verwendete Zelllinien und entsprechende Kultivierungsbedingungen	21
Tabelle 3.6: Aussaatparameter neural differenzierter Zellen	23
Tabelle 3.7: Kryokonservierung von Zellen	24
Tabelle 3.8: Aussaatparameter für die Differenzierung in HLZs	33
Tabelle 4.1: STR-Analyse der Zelllinie Kon B	44
Tabelle 4.2: STR-Analyse der Zelllinie Mut 4	44
Tabelle 4.3: Ergebnis der Mutationsanalyse	45
Tabelle 4.4: Hit compounds	64
Tabelle A.1: Technische Geräte	114
Tabelle A.2: Verbrauchsmaterialien	115
Tabelle A.3: Zellkulturmedien und Zusätze	117
Tabelle A.4: Verwendeter Mikroorganismenstamm	119
Tabelle A.5: Nährmedien für die Anzucht des verwendeten Mikroorganismenstamms	120
Tabelle A.6: Chemikalien	120
Tabelle A.7: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	122
Tabelle A.8: Standards und Farbstoffe	124
Tabelle A.9: Kommerzielle Komplettsysteme	124
Tabelle A.10: Primärantikörper	125
Tabelle A.11: Sekundärantikörper	126
Tabelle A.12: Konjugierte Primärantikörper für Durchflusszytometrie	127
Tabelle A.13: Primer	128
Tabelle A.14: Plasmide	128
Tabelle A.15: Software	129

11 Abkürzungsverzeichnis

25-HC	25-Hydroxycholesterol
AFP	α -Fetoprotein
ALB	Albumin
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CRS	Cystein-reiche Schleife
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Definitives Endoderm
DGJ	1-Deoxygalactonojirimycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	engl. <i>Embryoid Body</i>
Endo H	Endoglykosidase H
Endo H _R	Endoglykosidase H-resistente NPC1-Glykoform
Endo H _S	Endoglykosidase H-sensitive NPC1-Glykoform
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Degradation
FDA	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FoxA2	engl. <i>Forkhead Box A2</i>
Gag-Pol	Gruppenspezifisches Antigen-Polymerase
GFAP	engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBSS	Hank's gepufferter Salzlösung, engl. <i>Hanks balanced salt solution</i>
HDAC _{is}	Histondeacetylase-Inhibitoren
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen, engl. <i>Human embryonic kidney cells</i>
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor, engl. <i>hepatocyte growth factor</i>
HNF4 α	Hepatozyten-Kernfaktor 4 α , engl. <i>hepatocyte nuclear factor 4α</i>
HP- β -CD	2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
HSP	Hitzeschockprotein
ICG	Indocyaningrün

LDL	Lipoprotein niedriger Dichte, engl. <i>low density lipoprotein</i>
LSD	Lysosomale Speichererkrankung, engl. <i>lysosomal storage disease</i>
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LSO	Lysosomen-ähnliche Speicherorganellen, engl. <i>lysosome-like storage organelles</i>
Lyso-SM	Lyso-Sphingomyelin
Lyso-SM-509	Lyso-Sphingomyelin-509
MEF	Embryonale Mausfibroblasten, engl. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MLD	Mittlere luminale Domäne
NBT	Nitro-Blue-Tetrazolium
NP-C	Morbus Niemann-Pick Typ C
NP-C1	Morbus Niemann-Pick Typ C1
NPC1L1	engl. <i>Niemann-Pick C1-like Protein 1</i>
NP-C2	Morbus Niemann-Pick Typ C2
NPZs	Neurale Progenitorzellen
NTD	N-terminale Domäne
OCT4	engl. <i>octamer binding transcription factor 4</i>
OMIM	engl. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OSM	Oncostatin M
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion, engl. <i>periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PBS ⁺⁺	PBS mit Calcium und Magnesium
PCC	Pearson-Korrelationskoeffizient, engl. <i>Pearson's Correlation Coefficient</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLO	Poly-L-Ornithin
PSA-NCAM	engl. <i>polysialic acid neural cell adhesion molecule</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
Sox17	engl. <i>SRY (sex determining region Y)-box 17</i>
SSD	Sterol-Sensitive Domäne
SSEA4	engl. <i>stage specific embryonic antigen 4</i>
STR	engl. <i>Short Tandem Repeat</i>
TBST	TBS-Tween 20
TE	Tris EDTA
TRA-1-60	engl. <i>tumor rejection antigen-1-60</i>

TRA-1-81	engl. <i>tumor rejection antigen-1-81</i>
VSV-G	Vesicular-Stomatitis-Virus Glykoprotein
ZNS	Zentrales Nervensystem

12 Anhang

12.1 Materialien

Tabelle A.1: Technische Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Laboport	KNF Neuberger, Freiburg im Breisgau, DE
CO ₂ -Inkubator CB150	Binder, Tuttlingen, DE
Dampfsterilisator Varioklav [®] Typ300	HP Medizintechnik, Oberschleißheim, DE
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Eisbereiter, AF80	Scotsman, Ipswich, UK
Elektrophoresekammer Criterion [™] Cell	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, DE
MasterCycler Gradient Thermal Cycler 5331	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Feinwaage AX224	Sartorius, Göttingen, DE
Feinwaage BL610	Sartorius, Göttingen, DE
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE
Gefrierschrank Comfort, -20 °C	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank ProfiLine ECU 7085-5, -80 °C	NationalLab, Mölln, DE
Geschirrspüler G7883	Miele, Gütersloh, DE
Hitzesterilisator T6	Heraeus Instruments, Hanau, DE
IVF Workstation L224	K Systems, Birkerød, DK
Kolpenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Kühlschrank Comfort, 4°C	Siemens, München, DE
Lichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokio, JP
Magnetrührer Stuart Stir CB161	Dunn Labortechnik, Asbach, DE
Mikroskop Biozero 800	Keyence, Osaka, JP
Mikroskop LSM 780 bzw. LSM 900	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Mikroskop-Kamera Digital Sight DS-2MV	Nikon, Tokio, JP
Mikrowelle MW802 G	GGV Handelsges. MBH & Co. KG, Kaarst, DE
Minizentrifuge Sprout [®]	Biozym Scientific GmbH, Hessisch, Oldendorf, DE
Multipette [®] plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Odyssey Infrared Imaging System 9120	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US
pH-Meter S20-SevenEasy [™]	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
Pipettierhilfe Pipetus [®]	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE

Plattenleser Spark	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
PowerPac universal	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, DE
Reinstwassersystem Typ HP5 UF	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niedererlberg, DE
Schüttler Rocky® 3D	Labortechnik Fröbel, Lindau, DE
Schüttler WS5	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Stickstofftank RS Series 1575	Taylor Wharton, Mildstedt, DE
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, DE
Trockenschrank ED115	Binder, Tuttlingen, DE
UV-Transilluminator	Herolab GmbH, Wiesloch, DE
Wasserbad AQUAline AL12	Lauda, Lauda-Königshofen, DE
Zellzähler Casy® Model TT	Roche Innovatis, Reutlingen, DE
Zentrifuge Avanti J-35	Beckman Coulter™, Krefeld, DE
Zentrifuge Microfuge 16	Beckman Coulter™, Krefeld, DE
Zentrifuge Z383 K	Hermle Labortechnik, Wehingen, DE

Tabelle A.2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Katalog-Nr.
Aufreinigungssäule, MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE	130-042-201
Autoklavierband	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	HXE6.1
CASYcups	OMNI Life Science, Bremen, DE	5651794
CELLSTAR® Filter Top Zellkulturflaschen T25 (25 cm ²) T75 (75 cm ²) T175 (175 cm ²)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	690175 658175 661175
CELLSTAR® Suspensionskultur-Mikroplatte, 96 Vertiefungen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	655185
Criterion™ TGX Stain-Free™ Gele (4-15%)	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, DE	5678084
Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim	41001113
Filter-Pipettenspitzen 20 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	70.1114.210

ANHANG

100 µl		70.760.212
1000 µl		70.762.211
Kryovials	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	72.380.007
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE	12372098
Parafilm®	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	H951.1
Pasteurpipetten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE	11566963
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	70.1130
10 µl		70.760.002
200 µl		703.050.020
1000 µl		
Pipettenspitzen 1000 µl mit extra großer Öffnung	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE	12762936
Reagiergefäß „Safeseal“	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	72.706
1,5 ml		72.695.500
2,0 ml		
Rotalibo® Einmal-Wägeschalen	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	2149.2
8 ml		2150.1
100 ml		2159.2
330 ml		
Rundbodenröhrchen Polystyrol	Becton-Dickinson, Heidelberg, DE	352052
Serologische Pipetten	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	606180
5 ml		607180
10 ml		760180
25 ml		768180
50 ml		
Spritzenfilter Filtropur S, 0,2 µm	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	83.1826.001
Trans-Blot Turbo Nitrocellulose Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, DE	1704159
Vakuumfiltrationseinheit	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	83.3941.001
Whatman® gel blotting paper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	WHA10427804

Zellkulturplatte „Advanced“ 6-Well	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	657960
Zellkulturplatte „ultra-low adherent“, 6-Well	Stemcell Technologies, Köln, DE	100-0083
Zellkulturplatte, 4-Well	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	176740
Zellkulturplatten 6-Well 12-Well 24-Well 96-Well	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	83.3920 83.3921 83.3922 83.3924
Zellkulturschale 10 cm	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	83.3901
Zellschaber	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE	11391714
Zentrifugenröhrchen 15 ml 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, DE	62.554.502 62.547.254

Tabelle A.3: Zellkulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
2-Mercaptoethanol	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21985-023
Accutase	Merck KGaA, Darmstadt, DE	A6964
Activin A, human rekombinant, (100 µg/ml, gelöst in 0,2% BSA/PBS)	Peprotech, Hamburg, DE	120-14E
B-27™ Supplement (50x)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE	15360284
B-27™ Supplement (50x) ohne Vitamin A	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	12587010
BSA Lösung; 7,5% in DPBS	Merck KGaA, Darmstadt, DE	A8412-100ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	A994.1
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + GlutaMAX	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	31966-047
DMEM/F-12 (1:1) (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21331-020

EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), human rekombinant (gelöst in 10 mM Essigsäure in A. dest., 0,1% HSA)	Peprotech, Hamburg, DE	AF-100-15
Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	A6283-100ml
FBS (fetal bovine serum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE	P30-1502
FGF2 (Fibroblastenwachstumsfaktor), human rekombinant, (10 µg/ml, gelöst in PBS, 0,1% HSA)	Amsbio, Abingdon, UK	AMS-480-100
Gelatine (Schweinehaut Typ A; 0,1% gelöst in A. dest)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	G1890-100G
Gentle Cell Dissociation Reagenz	Stemcell Technologies, Köln, DE	07174
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	14170-088
HCC (Hydrocortison-Natriumsuccinat)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	H4881
HepatoZYME-SFM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	17705021
HGF (Hepatozytenwachstumsfaktor), human rekombinant, (10 µg/ml, gelöst in 0,2% BSA/PBS)	Peprotech, Hamburg, DE	100-39
HSA (Humanes Serum Albumin)	CSL Behring GmbH, Marburg, DE	E3444411F
Knockout DMEM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	10829-018
Knockout Serum Replacement	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	10828028
Laminin I (Maus) 1 mg/ml (10 µg/ml in DMEM/F-12)	R&D Systems, Abingdon, UK	3400-010-01
Lipoprotein, low density (LDL), human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	L914-5MG
Matrigel	Corning, Wiesbaden, DE	354277
MEM NEAA (100x) (Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	11140-035

MG-132 (10 mM in DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, DE	M7449-200UL
mTeSR1 Kompletmedium	Stemcell Technologies, Köln, DE	85850
OSM (Oncostatin M), human rekombinant, (20 µg/ml, gelöst in 0,2% BSA/PBS)	Peptotech, Hamburg, DE	300-10
PBS Dulbecco (PBS ^{-/-} , ohne Calcium und Magnesium)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE	P04-36500
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	15140-122
PLO (Poly-L-Ornithin-Hydrobromid; 15 mg/ml gelöst in A. dest)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	P3655-50MG
Protaminsulfat (500 µg/ml, gelöst in A. dest)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	P4020-1G
ReleSR™	Stemcell Technologies, Köln, DE	05872
RPMI 1640 Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21875
Trypsin-EDTA 0,05 % (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	25300-054
Trypsin-EDTA 0,25 % (1x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	25200-056
Valproinsäure-Natriumsalz (25 µg/ml, gelöst in A. dest.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE	P4543-10G
Wnt-3a, human rekombinant, (10 µg/ml, gelöst in 0,2% BSA/PBS)	R&D Systems, Abingdon, UK	5036-WN-010
X-tremeGENE™ 9	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE	06365787001
Y-27632, 10 mM in DMSO	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE	130-106-538

Tabelle A.4: Verwendeter Mikroorganismenstamm

Bezeichnung	Organismus	Genotyp	Hersteller
XL10-Gold® Ultracompetent Cells	<i>Escherichia coli</i>	<i>TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US

Tabelle A.5: Nährmedien für die Anzucht des verwendeten Mikroorganismenstamms

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB _{Amp} -Agar	40 g LB-Agar (Roth) auf 1:1 Aqua dest. → 20 min autoklavieren → Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml)
LB _{Amp} -Medium	25 g LB-Medium (Roth) auf 1:1 Aqua dest. → 20 min autoklavieren → Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml)

Tabelle A.6: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	7328.2
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE	840004
Ampicillin-Natriumsalz (100 mg/ml in Aqua dest.)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	K029.2
BD FACS Flow™ Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg, DE	342003
BD™ FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, DE	340345
BD™ FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, DE	340346
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	B6768
Bromphenolblau-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	A512.1
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	8076.4
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.02382
CASYclean	OMNI Life Science, Bremen, DE	5651787
CASYton	OMNI Life Science, Bremen, DE	5651808
Colcemid	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	15210-040
cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Mannheim, DE	04693159001
DAPI (4'6-Diamidin-2-Phenylindol)	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	D1306

ANHANG

EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	E-5134
Ethanol vergällt (96%)	Walter CMP GmbH & Co KG, Kiel, DE	WAL641
Filipin (50 ng/ml, gelöst in DMSO)	Polyscience Europe GmbH, Eppenheim, DE	08707-50
Fluoromount-G [®]	SouthernBiotech, Birmingham, AL, US	0100-01
Glycerol (87 % [v/v])	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	7530.4
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3908.3
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.00317
Indocyaningrün (ICG) (25mg/ml, gelöst in DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	I2633-25MG
Isopropanol	Walter CMP GmbH & Co KG, Kiel, DE	WAL11601
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.04936.100
Ladepuffer (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, DE	B7024
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	X969.2
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	X968.2
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	70166
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	4627.2
MgCl ₂	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	28305
NaCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3957.2
NaOH	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	1.06469
Natrium Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	D6750
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.06688
NBT/BCIP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	11681451001

Normales Ziegenserum	Dako, Hamburg, DE	X0907
Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS pH 7,4	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, DE	11762.02500
SDS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	8029.3
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	S33102
TE-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	A0386
TRIS	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	4855.2
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	9090.3
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3051.3
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	9127.3
Waschlösung für MACS Sortierung	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DE	130-091-221
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE	M3148

Tabelle A.7: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Bezeichnung		Zusammensetzung
1x SDS-Elektrophoresepuffer	1 : 9	10x SDS-Elektrophoresepuffer : Aqua dest.
10x SDS-Elektrophorese-Puffer	250 mM 2 M 0,1 %	TRIS Glycin SDS
10x TBS	200 mM 1,37 M	TRIS NaCl pH 7,5 einstellen
1x TBS	1 : 9	10x TBS : Aqua dest.
1x TBST	0,1 %	1x TBS Tween 20
5x Laemmli Puffer	125 mM 20 % 2 % 5 %	TRIS Glycerol SDS β-Mercaptoethanol

ANHANG

	10 %	Bromphenolblau
5x TBE Puffer	54 g 27,5 g 20 ml	TRIS Borsäure 0.5 M EDTA (pH 8,3)
50x TAE Puffer	242 g 57,1 ml 100 ml	TRIS Eisessig 0.5 mM EDTA (pH 8,0) auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
Antikörperlösung	0,1 %	1 % BSA Triton X-100
Antikörperlösung	3 %	Magermilchpulver in 1x TBST
Blocklösung	5 %	Magermilchpulver in 1x TBST
FACS Block-Puffer	10 %	PBS FBS
FACS Puffer	2%	PBS FBS
Fixativlösung für Karyogramm	3:1	Methanol : Eisessig
Immunfluoreszenz Blockpuffer	1%	PBS BSA
Immunfluoreszenz Block-Puffer	10 % 0,1 %	1 % BSA Normales Ziegenserum Triton X-100
Immunfluoreszenz Waschpuffer	20 mM 0,15 M 0,05 %	PBS Tris-HCl (pH 8,5) NaCl Tween
KCl-Lösung	0,075 M	Aqua dest. KCl
MACS Puffer	0,5 % 2 mM	PBS BSA EDTA
Paraformaldehyd	4 %	PBS PFA
PBS++	0,5 mM 0,9 mM	PBS CaCl ₂ MgCl ₂

RIPA-Puffer	20 mM 137 mM 12 mM 2 mM 0,1 % 1 % 10 %	TRIS NaCl Natrium-Deoxycholat EDTA SDS Triton X-100 Glycerol 1 cOmplete mini Protease Inhibitor-Tablette in 10 ml RIPA Puffer lösen
Triton-Puffer	1 % 0,1 %	SDS Triton X-100

Tabelle A.8: Standards und Farbstoffe

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US	SM0323
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen, DE	1610377

Tabelle A.9: Kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller	Katalog-Nr.	Verwendung
Anti-PSA-NCAM MicroBead Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, DE	130-092-966	Aufreinigung PSA- NCAM ⁺ neuraler Progenitorzellen
DiI-Ac-LDL Kit	Cell Applications, San Diego, CA, US	022K	Zur Identifizierung von endothelialen Zellen
Endo H	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, DE	P0702	Entfernen von N- Glykosylierungen von Glykoproteinen
FTA Sample Collection Kit for Human Cell Authentication Service	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, US	135-XV-10™	Zelllinien Authentifizierung mittels STR-Analyse
One-Step RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, DE	210210	Reverse Transkriptase- PCR

PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoCell GmbH, Heidelberg, DE	PK-CA91-1024	Test auf Mycoplasmenfreiheit
Periodsäure-Schiff(PAS)-Kit	Merck KGaA, Darmstadt, DE	395B	Glykogennachweis in HLZs
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US	23225	Bestimmung der Proteinkonzentration
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, DE	12162	Aufreinigung rekombinant hergestellter Vektoren
Quick-DNA™ Miniprep Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE	D3024	DNA-Extraktion aus Zellen
Quick-RNA™ Miniprep Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE	R1054	RNA-Extraktion aus Zellen
True-Nuclear™ Transcriptin Factor Buffer Set	Biolegend, San Diego, CA, US	424401	Intrazelluläre Färbung zur Durchflusszytometrie

Tabelle A.10: Primärantikörper

Antigen	Wirtsspezies	Isotyp	Hersteller	Katalog-Nr.
Albumin	Ziege	IgG polyklonal	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A80229A
Alpha-Fetoprotein	Maus	IgG monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, DE	A8452
Alpha-Fetoprotein	Maus	IgG monoklonal	R&D Systems, Abingdon, UK	MAB1368
Beta-Aktin	Maus	IgG monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, DE	A5441
Beta-III Tubulin	Maus	IgG monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	Sc51670
FoxA2	Kaninchen	IgG monoklonal	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, DE	D56D6
GAPDH	Maus	IgG monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab8245

GFAP	Kaninchen	IgG polyklonal	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US	Z0334
HNF4-alpha	Maus	IgG monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	sc-374229
LAMP2	Maus	IgG monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab25631
Muskelaktin	Maus	IgG monoklonal	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US	M0635
Nanog	Kaninchen	IgG polyclonal	Stemgent, Cambridge, MA, US	09-0020
Nestin	Kaninchen	IgG polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab92391
NPC1	Kaninchen	IgG monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab134113
Oct4	Kaninchen	IgG polyklonal	Stemgent, Cambridge, MA, US	09-0023
Pax6	Kaninchen	IgG polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab5790
Sox17	Ziege	IgG polyklonal	R&D Systems, Abingdon, UK	AF1924
Sox2	Kaninchen	IgG monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	ab92494
SSEA4	Maus	IgG polyklonal	Stemgent, Cambridge, MA, US	09-0006
TRA-1-60	Maus	IgM monoklonal	Stemgent, Cambridge, MA, US	09-0010
TRA-1-81	Maus	IgM monoklonal	Stemgent, Cambridge, MA, US	09-0011

Tabelle A.11: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Wirtsspezies	Reaktivität	Hersteller	Katalog-Nr.
AlexaFluor 488	Ziege polyklonal	Maus IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11029

AlexaFluor 488	Ziege Polyklonal	Kaninchen IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11034
AlexaFluor 568	Ziege polyklonal	Maus IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11031
AlexaFluor 568	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A11036
AlexaFluor 568	Ziege polyklonal	Maus IgM	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	A21043
Cy™ 3 AffiniPure	Affe polyklonal	Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK	705-165-147
DyLight™ 680	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, US	611-144-002
DyLight™ 800	Ziege polyklonal	Maus IgG	Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, PA, US	610-145-121

Tabelle A.12: Konjugierte Primärantikörper für Durchflusszytometrie

Antigen	Wirtsspezies	Isotyp	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
Alexa Fluor® 647 anti-NANOG	Maus	IgG monoklonal	Biolegend, San Diego, CA, US	674210	1:50
Alexa Fluor® 647 anti-SSEA4	Maus	IgG monoklonal	Biolegend, San Diego, CA, US	330407	1:500
PE anti-human TRA-1-60-R	Maus	IgM monoklonal	Biolegend, San Diego, CA, US	330609	1:20
Alexa Fluor® 488 anti-TRA-1-81	Maus	IgM monoklonal	Biolegend, San Diego, CA, US	330709	1:20
Alexa Fluor® 488 anti-OCT4	Maus	IgG monoklonal	Biolegend, San Diego, CA, US	653705	1:20

Tabelle A.13: Primer

Primer	Forward/Reverse Primer (5'-3')	Produktgröße [bp]	Ta [°C]	Zykluszahl
C-MYC	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC/ TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG	325	66	30
ESG1	ATATCCCGCCGTGGGTGAAAGTTC/ ACTCAGCCATGGACTGGAGCATCC	176	57	35
FGF4	CAAGCTCTATGGCTCGCCCT/ TCTTCCCATTCTTGCTCAGGG	131	57	40
GAPDH	CATGTTCCAATATGATTCCACCC/ GGGATCTCGCTCCTGGAAGAT	112	57	40
hTERT	GAGCTGACGTGGAAGATGAGC/ CATCAGCCAGTGCAGGAAGTT	129	57	35
KLF4	ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC/ TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC	397	65	35
NANOG	TGTGTTCTCTTCCACCCAGC/ ACCAGGTCTTACCTGTTTGT	128	55	30
OCT4	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG/ CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC	144	66	30
SOX2	AGGGAGAGAAGTTTGAGCCC/ GCGAGGAAAATCAGGCGAAG	170	55	30
ZFP296	CTGGACCGACAAACACCCAG/ CTTCAGCTCCTCTCGTTCTGAG	157	57	35
SOX2_ pMIG/IRES	CATGTCCCAGCACTACCAGA/ GCATTCCTTTGGCGAGAG	257	60	30
KLF4_ pMIG/IRES	CCCACACAGGTGAGAAACCT/ GCATTCCTTTGGCGAGAG	366	60	30
C-MYC_ MSCV/IRES	AAGAGGACTTGTTGCGGAAA/ GCATTCCTTTGGCGAGAG	337	60	30
OCT4- pMIG/IRES	GTA CTCTCGGTCCCTTTCC/ GCATTCCTTTGGCGAGAG	260	60	30

Tabelle A.14: Plasmide

Plasmid	Insert	Backbone	Bestellnummer	Firma
OCT4	1083	pMIG	Plasmid 17225	Addgene, Cambridge, MA, US
KLF4	1413	pMIG	Plasmid 17227	Addgene, Cambridge, MA, US
SOX2	954	pMIG	Plasmid 17226	Addgene, Cambridge, MA, US

c-MYC	1858	MSCV IRES GFP	Plasmid 18119	Addgene, Cambridge, MA, US
Gag/pol	Unbekannt	MSCV	Plasmid 14887	Addgene, Cambridge, MA, US
VSV-G	6363	pCMV	Plasmid 8454	Addgene, Cambridge, MA, US

Tabelle A.15: Software

Programm	Hersteller
Argus X1	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, DE
BZ image analysis application	Keyence, Osaka, JP
BZ observation application	Keyence, Osaka, JP
CellQuest Pro	BD, Heidelberg, DE
Citavi 6	Swiss Academic Software, Wädenswil, CH
CorelDRAW 2020	Corel Corporation, Ottawa, CA
GraphPad Prism 8.0.1	GraphPad Software, San Diego, CA, US
Image Studio Lite 5.2	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, US
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US
NIS-Elements F2.20	Nikon Instruments inc., New York, NY, US
Odyssey® Infrared Imaging System- Application Software Version 1.2.15	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, US
SparkControl™	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
ZEN imaging software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE

12.2 Charakterisierung der Zellsysteme

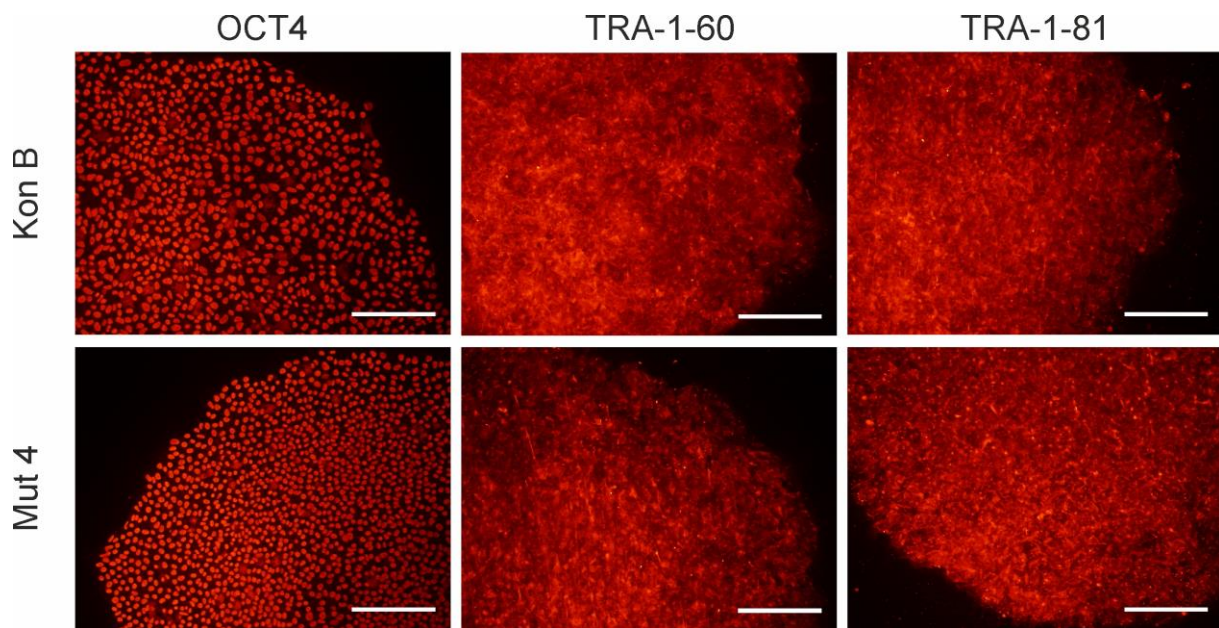


Abbildung 38: Nachweis der Pluripotenzmarker in den etablierten iPS-Zellen. Die immunzytochemischen Färbungen zeigen, dass die iPS-Zelllinien Kon B und Mut 4 positiv für die Pluripotenzmarker OCT4, TRA-1-60 und TRA-1-81 sind. Maßstab 200 μm .

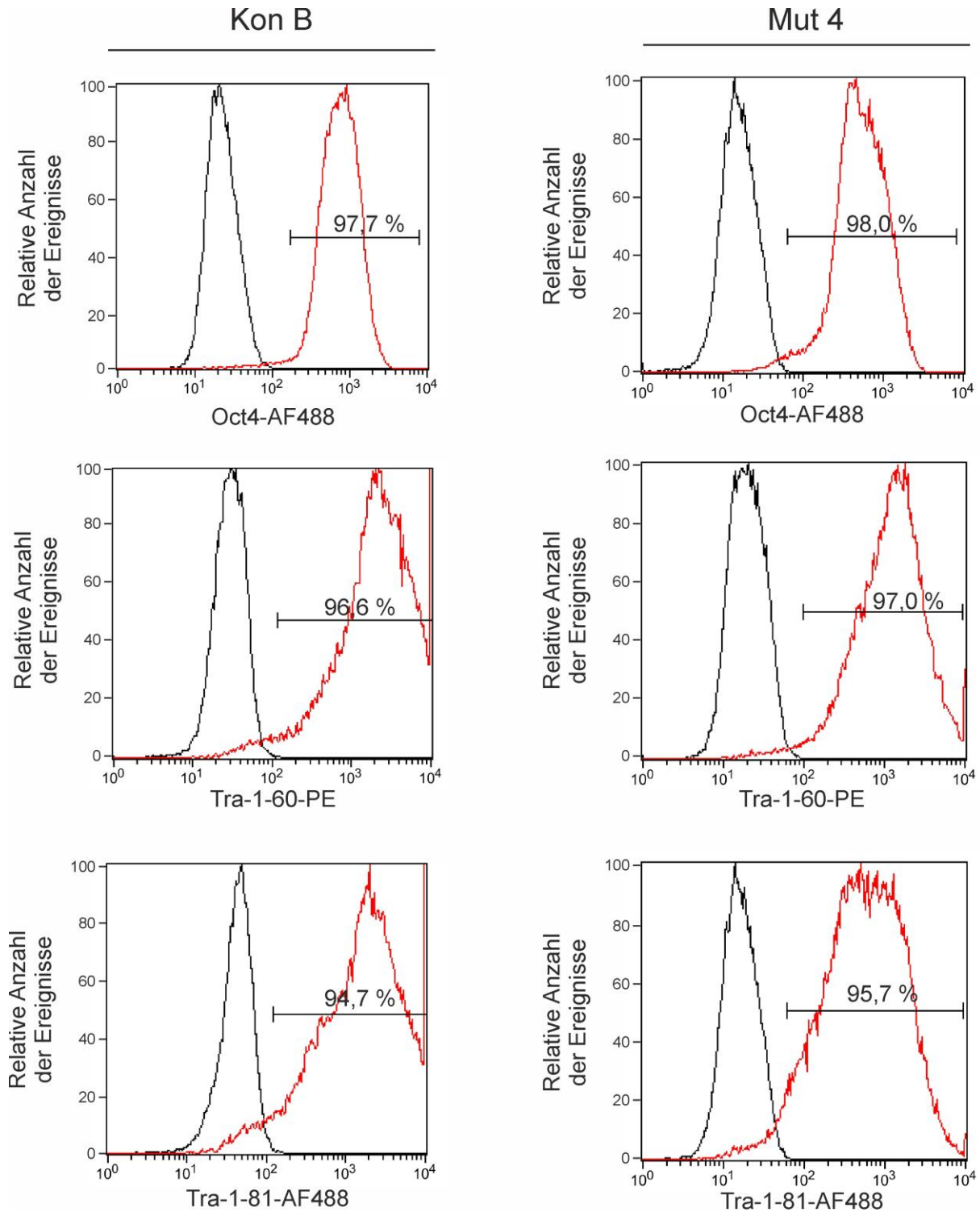


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse Pluripotenz-assoziiierter Proteine. Die repräsentativen Histogramme zeigen die relativen Fluoreszenzintensitäten der Pluripotenz-assoziierten Proteine OCT4, TRA-1-60 und TRA-1-81 in den iPS-Zelllinien Kon B und Mut 4 gegenüber der relativen Anzahl der Ereignisse. Die ungefärbte Negativkontrolle ist in schwarz dargestellt; in rot die Rechtsverschiebung des Signals nach Färbung mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Primärantikörpern. Die Zahlen in den Histogrammen bezeichnen den prozentualen Anteil positiver Zellen. Die Analyse zeigt, dass die Pluripotenz-assoziierten Proteine in nahezu allen Zellen der beiden Zelllinien Kon B und Mut 4 exprimiert werden.

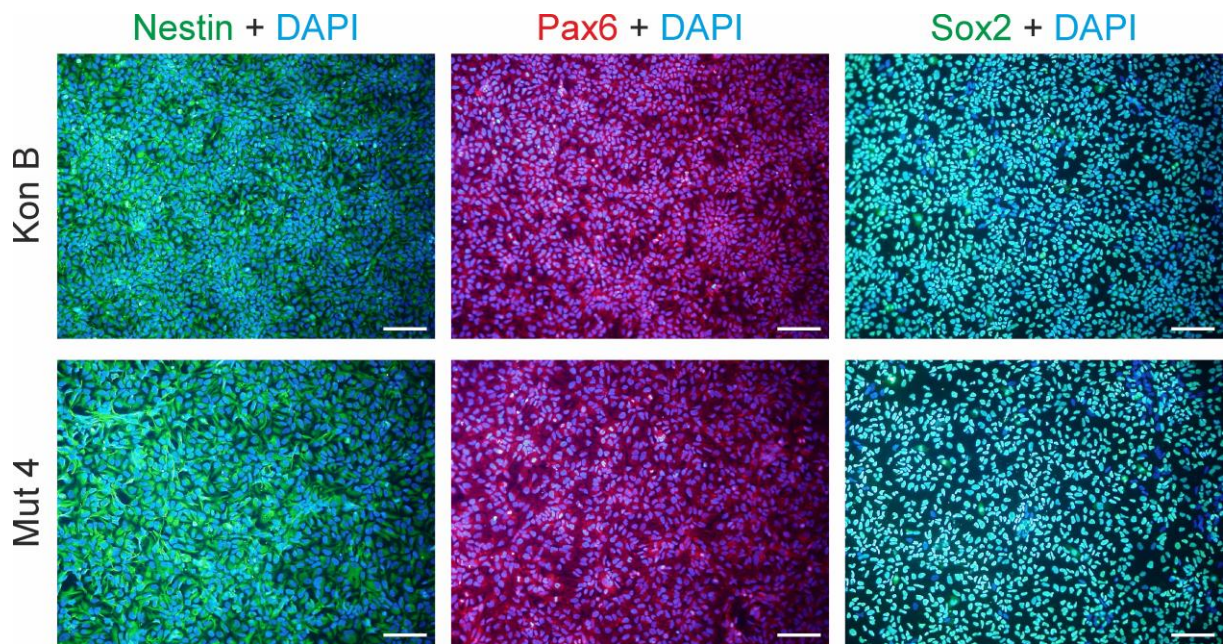


Abbildung 41: Nachweis neuraler Progenitorzellmarker in NPZs. Die immunzytochemischen Färbungen zeigen, dass die NPZs positiv für die neuralen Progenitorzellmarker Nestin, Pax6 und Sox2 sind. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab 100 μ m.

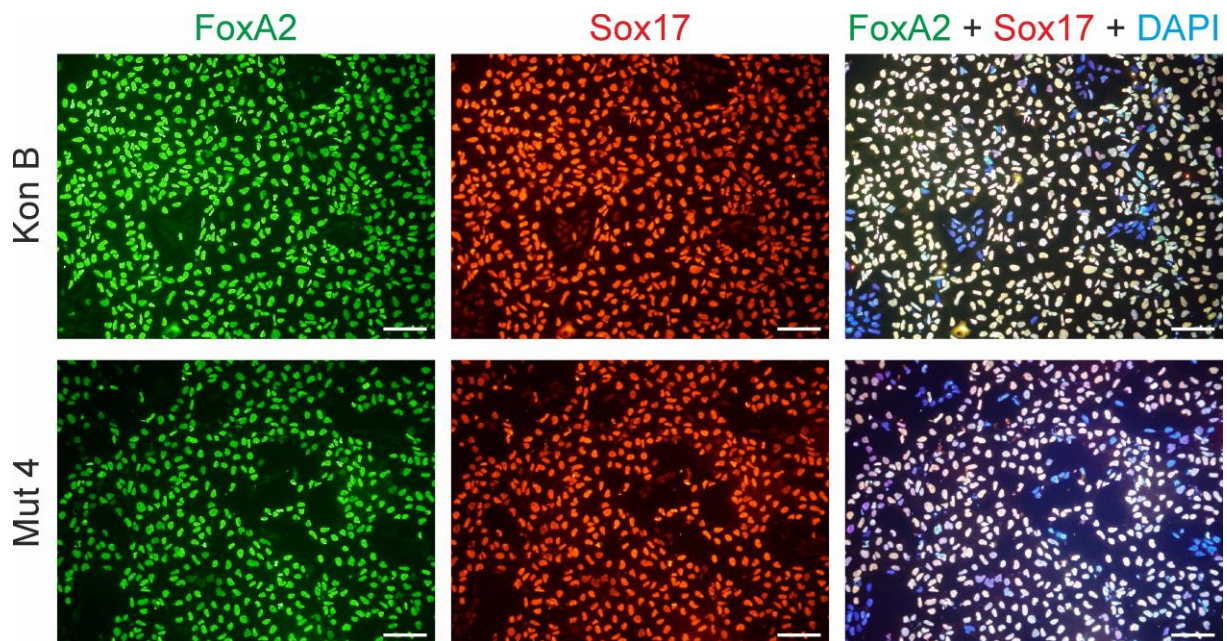


Abbildung 40: Charakterisierung des Definitiven Endoderms. Die immunzytochemischen Färbungen zeigen die Zellen an Tag 4 der hepatischen Differenzierung, welche positiv für die DE-Marker FoxA2 (grün) und Sox17 (rot) sind. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Bei den FoxA2- und Sox17-negativen „Inseln“ in Kon B und Mut 4 handelt es sich um die initial ausgesäten, undifferenzierten iPS-Zellen. Maßstab 100 μ m.

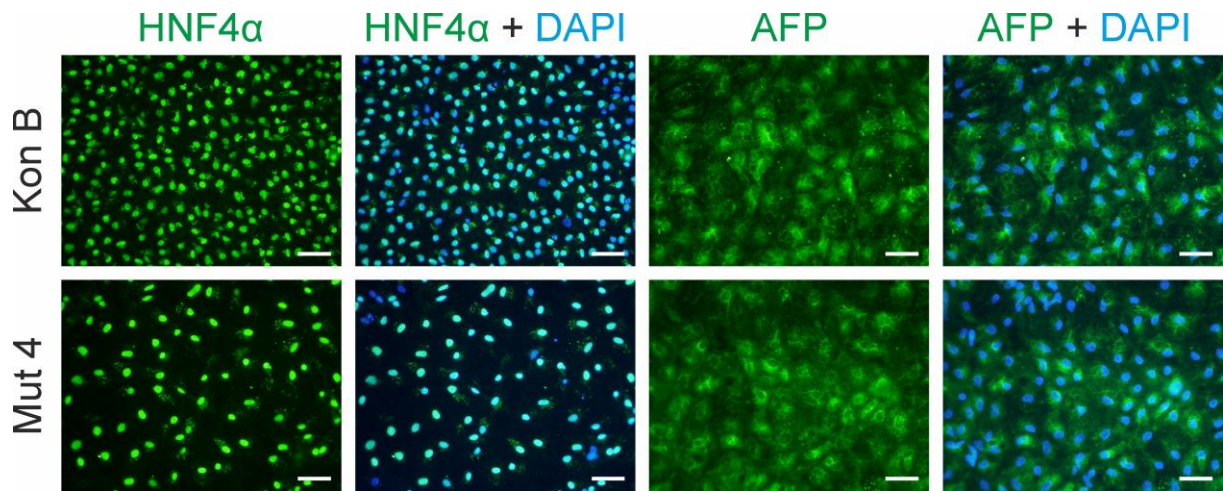


Abbildung 42: Charakterisierung der hepatischen Progenitorzellen. Die hepatischen Progenitorzellen an Tag 10 der hepatischen Differenzierung waren positiv für die frühen hepatischen Marker AFP und HNF4 α . Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab 50 μ m.

12.3 Phänotypische Veränderungen bei Morbus Niemann-Pick Typ C1

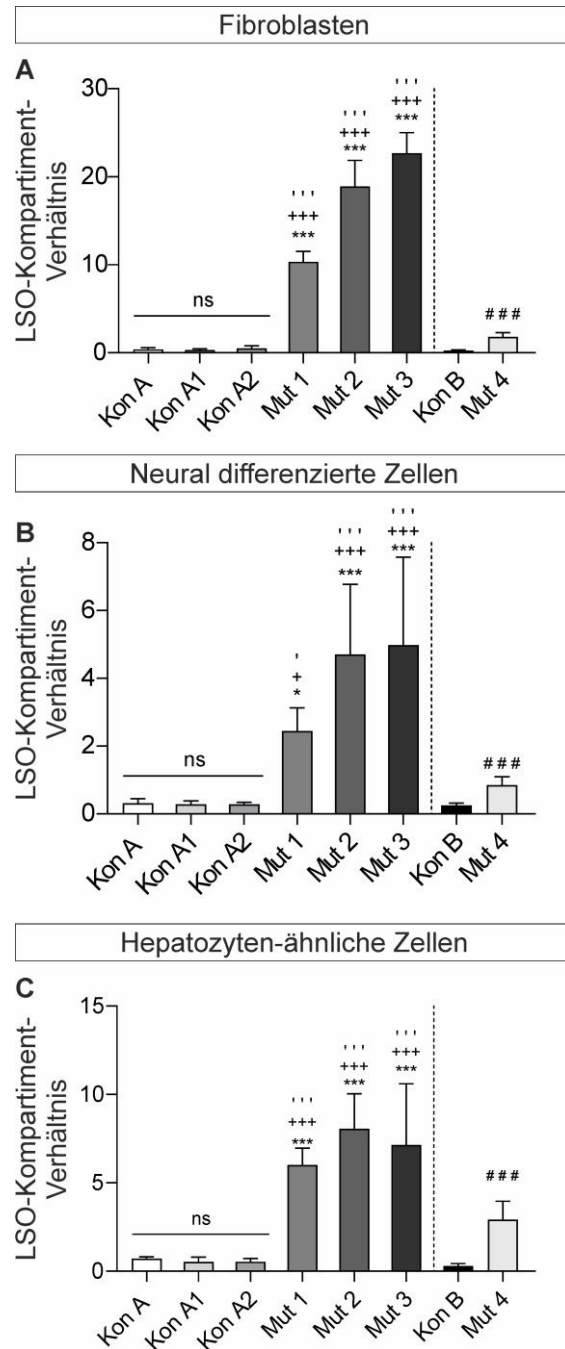


Abbildung 43: Analyse des Filipingehalts in Fibroblasten, NDZ und HLZs. Die Analyse des Cholesterolgehalts in (A) Fibroblasten, (B) neural differenzierten Zellen und (C) Hepatozyten-ähnlichen Zellen erfolgte im Anschluss an die Filipinfärbung durch Quantifizierung des LSO-Kompartiment-Verhältnisses. Diese ergab in allen drei Zelltypen eine starke Cholesterolakкумуляtion in Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im Vergleich zur Kontrollzelllinie Kon A. Das LSO-Kompartiment-Verhältnis in der Mut 4 war gegenüber Kontrollzelllinie Kon B geringfügig erhöht und wurde somit als varianter biochemischer Phänotyp identifiziert. (Mittelwert ± SD; N=8; * / + / '# = p < 0,05; ***/ + + + / ' ' /# # # = p < 0,001 zu Kon A/Kon A1/ Kon A2 bzw. Kon B).

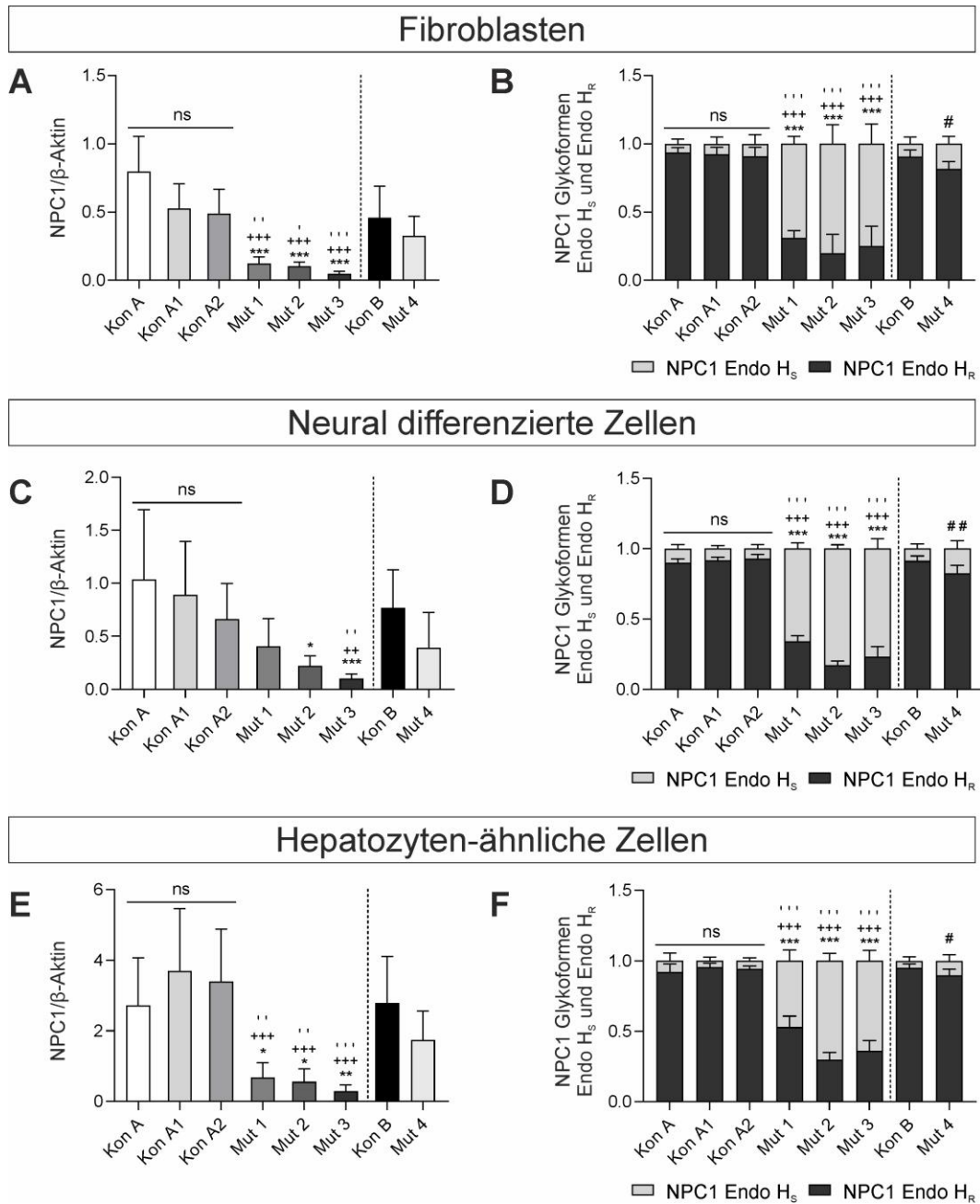


Abbildung 44: NPC1-Proteinexpression in Fibroblasten, NDZs und HLZs. Die Zelllysate der (A,B) Fibroblasten, (C,D) neural differenzierten Zellen und (E,F) Hepatozyten-ähnlichen Zellen wurden mittels Western Blot auf die Expression des NPC1-Proteins untersucht. (A,C,E) Die Analyse ergab eine signifikante Reduktion der Gesamtmenge des NPC1-Proteins in den NPC1-defizienten Zelllinien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 im Vergleich zu Kontrollzelllinie Kon A. Das NPC1-Protein der Mut 4 war nicht signifikant niedriger als in Kontrollzelllinie Kon B. (N=6). (B,D,F) Das NPC1-Protein der Kontrollzelllinien Kon A und Kon B, sowie auch der NPC1-Zelllinie Mut 4 mit variantem biochemischem Phänotyp, ist gegenüber dem Verdau mit Endo H größtenteils resistent. Mutiertes NPC1-Protein der Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 ist dagegen hauptsächlich Endo H-sensitiv, was darauf hindeutet, dass es im ER zurückgehalten wird. (Mittelwert \pm SD; N=6; */ + / '# = $p < 0,05$; **/ + + / '## = $p < 0,01$; ***/ + + + / '### = $p < 0,001$ zu Kon A/Kon A1/ Kon A2 bzw. Kon B).

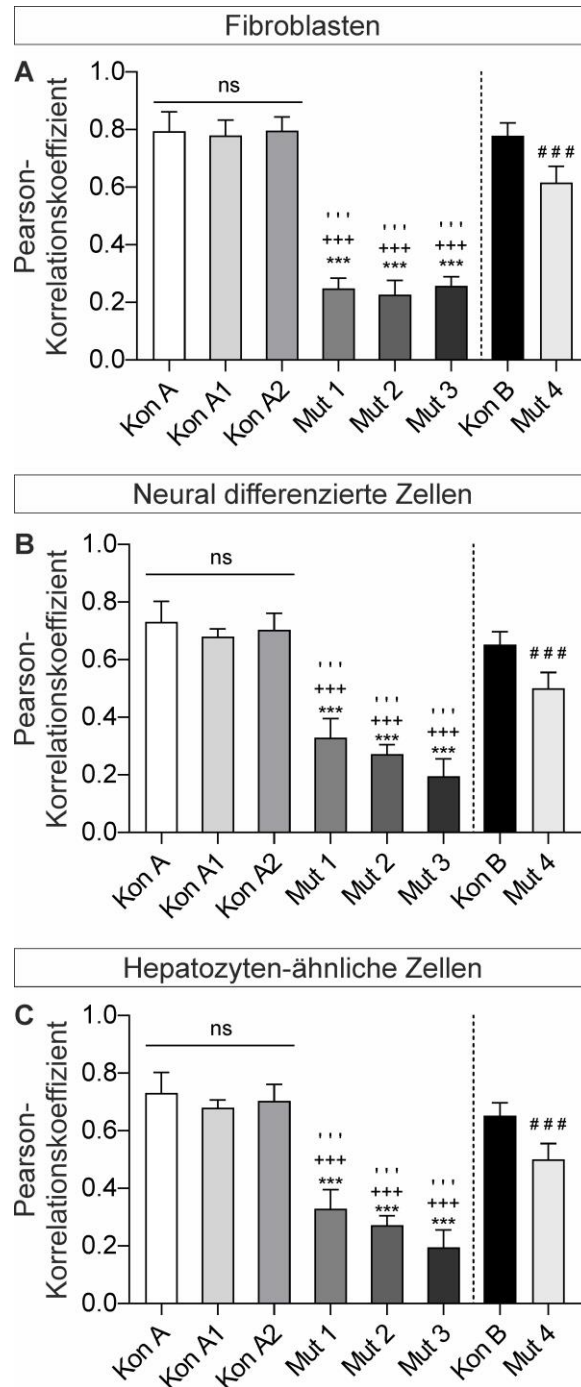


Abbildung 45: Kolokalisationsanalyse in Fibroblasten, NDZs und HLZs. Für die Kolokalisationsanalyse des NPC1-Proteins und des lysosomalen Markers LAMP2 in den (A) Fibroblasten, (B) neural differenzierten Zellen und (C) Hepatozyten-ähnlichen Zellen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt. Die quantitative Analyse der Kolokalisation ergab signifikant reduzierte Werte in den NPC1-defizienten Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Dabei zeigten die Linien Mut 1, Mut 2 und Mut 3 die geringsten Pearson-Korrelationskoeffizientenwerte, was bedeutet, dass kaum NPC1-Protein in den Lysosomen lokalisiert ist. Für die Zelllinie Mut 4 mit dem varianten biochemischen Phänotyp wurden dagegen deutlich höhere Werte gemessen, was zeigt, dass ein signifikanter Anteil der NPC1-Proteinmenge dieser Zelllinie die Lysosomen erreicht. (Mittelwert \pm SD; N=8; ***/+ + +/'''/### = $p < 0,001$ zu Kon A/Kon A1/ Kon A2 bzw. Kon B).

13 Danksagung

14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Christin Völkner, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Identifizierung und Charakterisierung von pharmakologischen Chaperonen zur Behandlung von Morbus Niemann-Pick Typ C1 unter Verwendung von neuronalen und Hepatozyten-ähnlichen Zellen abgeleitet aus patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen“

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, 04.04.2022

Christin Völkner

15 Wissenschaftlicher Lebenslauf
