

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

**Analysen über oxidativen Stress in neural differenzierten Morbus  
Niemann Pick Typ C Patienten-spezifischen  
induzierten pluripotenten Stammzellen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Alexandra Veronika Jürs, geb. am 16.09.1995 in Cuxhaven  
aus Rostock

Öffentliche Verteidigung am 21.03.2023

Rostock, 11.05.2022



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0  
International Lizenz.

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

Öffentliche Verteidigung am 21.03.2023

1. Gutachter: PD Dr. phil. nat. habil. Moritz Frech, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Robert David, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachterin: Prof. Dr. med. Anja Bräuer, Anatomie der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Morbus Niemann-Pick Typ C.....	1
1.1.1	Struktur und Funktion der NPC1- und NPC2-Proteine.....	1
1.1.2	Modelle zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C .....	4
1.1.3	Klinischer Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C .....	6
1.1.4	Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ C .....	8
1.1.5	Management und Therapieansätze des Morbus Niemann-Pick Typ C .....	9
1.2	Zellulärer oxidativer Stress als pathophysiologischer Mechanismus.....	10
1.2.1	Entstehung von reaktiven Molekülen.....	10
1.2.2	Das antioxidative Abwehrsystem.....	11
1.2.3	Konsequenzen des Überschusses an ROS und RNS auf zellulärer Ebene.....	15
1.3	Oxidativer Stress in neurodegenerativen Erkrankungen .....	16
1.3.1	Oxidativer Stress in Morbus Niemann-Pick Typ C .....	17
1.4	Zielstellung .....	21
2	Material und Methoden .....	22
2.1	Zellkultur .....	22
2.1.1	Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien .....	22
2.1.2	Kultivierung und Differenzierung der neuralen Progenitorzellen.....	23
2.1.3	Behandlung der NDZs mit Testsubstanzen .....	27
2.2	Western Blot .....	27
2.3	Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase .....	31
2.4	Durchflusszytometrie.....	32
2.5	Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) .....	34
2.6	Statistische Analysen.....	37
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Nachweis von oxidativem Stress in NDZs im NP-C.....	39
3.1.1	Erhöhte ROS-Werte in NP-C1 bei unverändertem ROS-Niveau in NP-C2 .....	39

---

3.1.2	Verminderte SOD-Aktivität in NPC1-defizienten Zellen.....	45
3.1.3	Nachweis von Proteinen mit nitrierten Tyrosylresten.....	46
3.1.4	Veränderungen der SOD1-, SOD2- und Katalase-Expression auf Proteinebene in NPC-defizienten Zellen.....	49
3.1.5	Veränderungen des antioxidativen Abwehrsystems auf Genexpressionsebene in NPC-defizienten Zellen.....	56
3.2	Untersuchung des Einflusses der Flavonoide Quercetin und Kaempferol auf oxidativen Stress in NPC-defizienten Zellen .....	58
3.2.1	Quercetin und Kaempferol ergaben keine Senkung des ROS Niveaus in NPC-defizienten Zellen.....	58
3.2.2	NPC-defiziente Zellen zeigten keine Veränderung der SOD-Aktivität nach Behandlung mit Quercetin und Kaempferol .....	59
3.2.3	Beeinflussung der Proteinexpression der SOD1, SOD2 und Katalase durch hoch dosierte Flavonoide .....	60
3.2.4	Betrachtung des enzymatischen Abwehrsystems nach hoch dosierter Flavonoid-Behandlung auf Genexpressionsebene.....	64
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	69
4	Diskussion.....	71
4.1	Oxidativer Stress als pathophysiologisches Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen .....	71
4.1.1	Oxidativer Stress in neuronalen NPC1-defizienten Zellen .....	75
4.1.2	Veränderung des antioxidativen Abwehrsystems in NP-C1 .....	79
4.1.3	Verminderte Katalase als Auslöser oder Resultat von oxidativem Stress in NP-C1? .....	82
4.1.4	Oxidativer Stress und dessen Regulation in NP-C2 mit vergleichender Betrachtung zu NP-C1 .....	86
4.1.5	Antioxidative Wirkung der Flavonoide als möglicher therapeutischer Ansatz in der NP-C Behandlung .....	89
5	Zusammenfassung.....	94
6	Thesen .....	97

---

7	Literaturverzeichnis.....	99
8	Anhang .....	VIII
8.1	Ergänzende Materialien zu NP-C und OS.....	VIII
8.1.1	Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ C .....	VIII
8.1.2	Die Entstehung von 3-Nitrotyrosin über Peroxynitrit.....	VIII
8.1.3	Strukturformeln der Flavonoide Quercetin und Kaempferol.....	IX
8.1.4	Nachweis von nitrierter SOD2 und nitrierter SOD1 mittels Western Blot.....	IX
8.1.5	Western Blot Analysen der SOD1, SOD2 und Katalase unter Flavonoid- Behandlung.....	X
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	XI
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	XIV
8.4	Tabellenverzeichnis .....	XV
8.5	Formelverzeichnis .....	XV
8.6	Zellkulturmedien und Zusätze .....	XV
8.7	Chemikalien.....	XVII
8.8	Antikörper.....	XVIII
8.9	Kits.....	XIX
8.10	Puffer und Lösungen.....	XIX
8.11	Verbrauchsmaterialien .....	XXI
8.12	Geräte.....	XXII
8.13	Software .....	XXV
9	Danksagung.....	XXVII
10	Eidesstattliche Erklärung.....	XXVIII
11	Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	XXIX





# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C

Morbus Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine seltene neuroviszerale lysosomale Speichererkrankung, die autosomal rezessiv vererbt wird. Mutationen in dem *NPC1*- oder *NPC2*-Gen führen zu einem dysfunktionalen oder gar fehlenden Transportprotein NPC1 oder NPC2. NPC1 und NPC2 transportieren Lipide wie Cholesterin auf zellulärer Ebene. Bei einem Defekt dieser Proteine resultiert somit eine Akkumulation von Lipiden, insbesondere unverestertes Cholesterin und Sphingolipide (Cologna & Rosenhouse-Dantsker, 2019; Vanier, 2013). Nach aktueller Datenlage liegt die Inzidenz von NP-C bei  $\sim 1/89.000$ , wobei höhere Inzidenzen aufgrund eines späten Krankheitsbeginns möglich sind (Wassif et al., 2016).

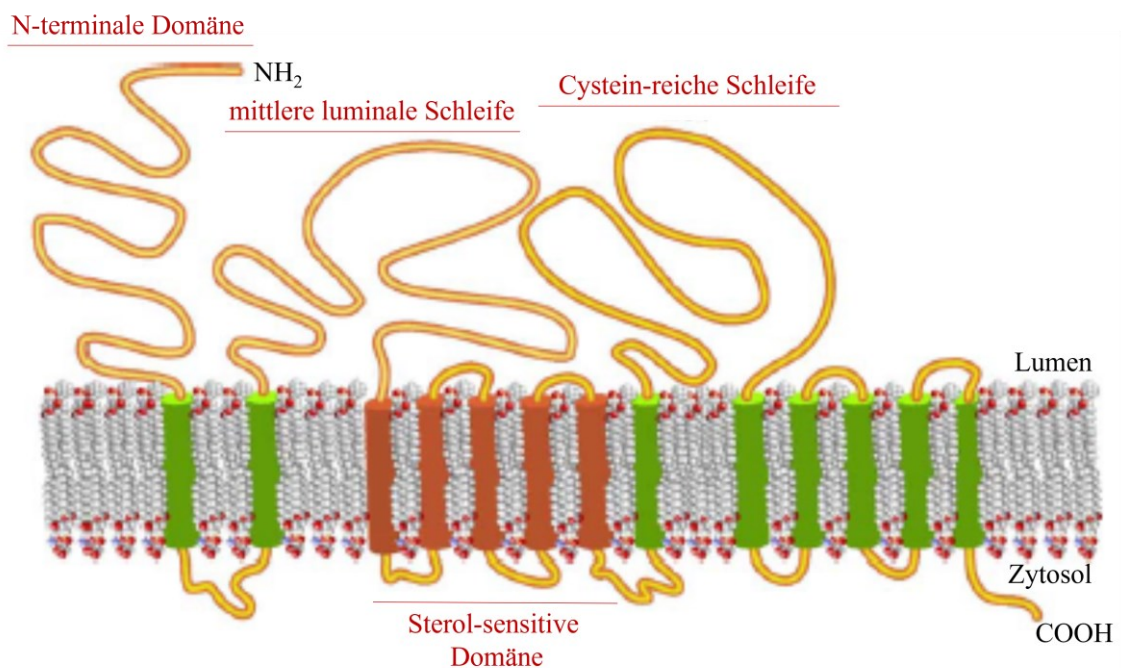
Erstmals untersucht wurde Morbus Niemann-Pick durch den Chemiker Albert Niemann und den Pathologen Ludwig Pick in den 1920ern, die darunter eine heterogene Gruppe von autosomal rezessiv vererbten Lipidspeichererkrankungen zusammenfassten (Vanier, 2010). Aufgrund der Variabilität der Symptome unter Einbeziehung von viszeralen und neuronalen Charakteristika, sowie des Schweregrads der Lipidanreicherung erfolgte in den 1950er Jahren eine Klassifikation in die vier Subtypen A-D (Crocker, 1961; Crocker & Farber, 1958). Bei Typ A und B ist ein Defekt in der Sphingomyelinase vorhanden, die in einer Anreicherung von Sphingomyelin resultiert (Brady et al., 1966; Harzer et al., 2003). Dahingegen zeigte in den 1980er Jahren die Arbeitsgruppe von Peter Pentchev, dass NP-C durch eine Akkumulation von unverestertem Cholesterin in Lysosomen/ späten Endosomen gekennzeichnet ist (Pentchev et al., 1984, 1994). Dies ist auf Mutationen in den Genen *NPC1* oder *NPC2* zurückzuführen (Vanier et al., 1996). Niemann-Pick Typ D wird inzwischen NP-C1 zugeordnet, da es sich um eine allelische NP-C1-Variante einer Familie in Nova Scotia/ Kanada handelt (Greer et al., 1997; Vanier & Suzuki, 1998).

### 1.1.1 Struktur und Funktion der NPC1- und NPC2-Proteine

Die Erkrankung Niemann-Pick Typ C ist durch Mutationen in den Genen *NPC1* (95 %) oder *NPC2* (5 %) bedingt, wobei sie einen vergleichbaren zellulären und klinischen Phänotypen aufweisen (Ory, 2000; Steinberg, 1996).

Das *NPC1* Gen befindet sich auf dem Chromosom 18q11-12 und umfasst 25 Exons, die für das NPC1-Protein kodieren, das aus 1278 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 142 kDa besteht (Carstea et al., 1997). Das NPC1-Protein ist in Membranen von späten Endosomen und Lysosomen vorzufinden und besteht aus 13 Transmembrandomänen. Es umfasst drei große und vier kleine luminalen Schleifen, die neben der Cystein-reichen Schleife die mittlere luminalen

Schleife und die N-terminale Domäne für die Cholester-Bindung über dessen 3 $\beta$ -Hydroxy-Gruppe beinhalten (Abb. 1) (Davies & Ioannou, 2000; Infante et al., 2008; Kwon et al., 2009). Die im Rahmen der post-translationalen Modifizierung stattfindenden N-Glykosylierungen, die v. a. dem Schutz des Proteins vor dessen proteolytischen Abbau dienen, sind innerhalb der luminalen Schleifen vorzufinden (Watari et al., 1999). Neben dem im Zytosol gelegenen C-Terminus ist unter den sechs zytoplasmatischen Schleifen des Transmembranproteins die Sterol-sensitive Domäne (SSD) lokalisiert (Scott & Ioannou, 2004). Neben der Bindung von einem photoaktivierbaren Cholesterolanalogon (Ohgami et al., 2004) ist die SSD in der Regulation der Stabilität des NPC1-Proteins involviert (Ohsaki et al., 2006) und u. a. für dessen Transport zum späten Endosomen verantwortlich ist (Scott et al., 2004).

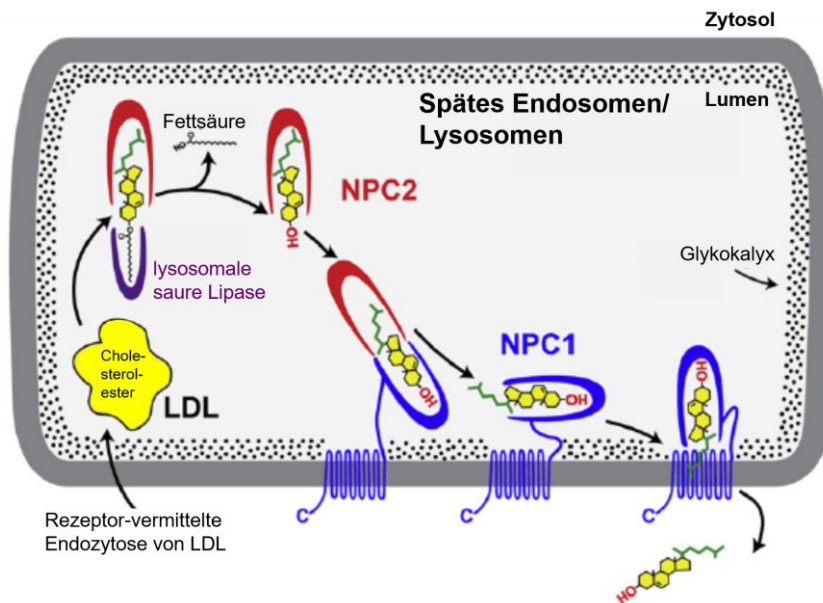


### Abb. 1: Struktur des NPC1-Proteins

Das NPC1-Protein liegt mit 13 Transmembrandomänen in der begrenzenden Membran von späten Endosomen und Lysosomen, wobei der N-Terminus luminal und das C-terminale Ende im Zytosol liegt. Unter den 7 luminalen Schleifen befinden sich die Cystein-reiche Schleife und die mittlere luminalen Schleife, wohingegen unter den 6 zytoplasmatischen Schleifen die Sterol sensitive Domäne markiert ist. Modifiziert nach Scott & Ioannou (2004) und X. Li et al. (2017).

Für den Transport von Cholester interagieren das NPC1- mit dem NPC2-Protein (Abb. 2). Zunächst nimmt die Zelle über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose das Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) auf, wobei die Endozytosevesikel mit Endosomen verschmelzen. In den Lysosomen wird LDL abgebaut und Cholesterolester werden durch die lysosomale saure Lipase hydrolysiert, wodurch freies Cholesterol entsteht (Löffler et al. , 2007). In späten Endosomen bzw. Lysosomen bindet NPC2 mit der hydrophoben Tasche an der Isooctyl-Seitenkette des Cholesterols. Darauf folgend bindet das NPC2-Protein an der mittleren luminalen Schleife des

NPC1-Proteins (Abb. 1) und Cholesterol wird auf die N-terminale Domäne übertragen. Im Anschluss wird Cholesterol durch die lysosomale Membran transportiert (Abb. 2) und auf die SSD übertragen. Der exakte Mechanismus ist noch ungeklärt und erfolgt ggf. über eine Konformationsänderung der N-terminalen Domäne (Kwon et al., 2009; X. Li et al., 2017). Der auch als hydrophobic handoff Mechanismus bezeichnete Transport von Cholesterol wird durch die Tatsache unterstützt, dass Cholesterol durch die Bindung an den Proteinen einer Kristallisation in dem hydrophilen Milieu entgeht (M. Wang et al., 2010).



**Abb. 2: Mechanismus des Cholesterol-Transportes mittels NPC-Proteine**

Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose von LDL wird der Cholesterolester über eine lysosomale saure Lipase in eine Fettsäure und freies Cholesterol zerlegt. Das unveresterte Cholesterol bindet an das NPC2-Protein im Lumen von späten Endosomen bzw. Lysosomen. Nach dem Transfer auf das NPC1-Protein wird Cholesterol auf noch ungeklärte Weise durch die lysosomale Membran ins Lumen transportiert. Modifiziert nach Kwon et al., 2009.

Bei derzeit 549 bekannten Mutationen im *NPC1*-Gen (Bountouvi et al., 2017; Wraith et al., 2009) stellt die Mutation c.3182 T>C (p.I1061T, Mut A) mit 20-30 % die am häufigsten vorkommende NPC1-Variante in Westeuropa dar (Bolton et al., 2022). Diese Punktmutation befindet sich in der Cystein-reichen Domäne des NPC1-Proteins, wobei ein Austausch der Aminosäure Isoleucin durch Threonin aufgrund einer falschen Base an der Stelle 3182 des DNS-Strangs stattfindet. Durch diese Missense-Mutation entsteht ein fehlgefaltetes Protein mit erhöhter Instabilität, was über die endoplasmatisch-Retikulum-assoziierte Degradation abgebaut wird. Als Folge ist nur wenig funktionales Protein in der Zelle vorzufinden (Gelsthorpe et al., 2008; Praggastis et al., 2015). Bis zu 50 % der Mutationen sind in der Cystein-reichen Domäne lokalisiert (Millat, Marçais, et al., 2001). Des Weiteren treten gehäuft *NPC1*-Mutationen in der SSD oder in direkter Nähe davon auf, was meistens zu einem Verlust des Proteins führt (Vanier & Millat, 2003). Bisher konnte für NP-C1 keine eindeutige Genotyp-Phänotyp Korrelation

hergestellt werden. Neuste Studien von Baxter et al. (2022) zeigen eine Veränderung des NP-C1 Phänotypen durch weitere Gene, was eine Erklärung für die heterogenen Phänotypen und Krankheitsverläufe bei ein- und derselben *NPC1*-Mutation erklären könnte (Baxter et al., 2022). Dennoch wurde beobachtet, dass Mutationen in der SSD mit einem eher schweren Phänotyp und Mutationen in der Cystein-reichen Domäne mit einem eher milden Phänotyp einhergehen (Millat, Marçais, et al., 2001; Sun et al., 2001).

Das *NPC2*-Gen befindet sich auf dem Chromosom 14q24.3 und enthält 5 Exons, die für das 132 Aminosäuren große, lösliche NPC2-Protein kodieren (Naureckiene et al., 2000). Das Glykoprotein bindet Cholesterol und ist in späten Endosomen bzw. Lysosomen sowie einigen sekretorischen Flüssigkeiten vorzufinden (Klein et al., 2006; Ko et al., 2003; Naureckiene et al., 2000; Okamura et al., 1999). Unter den rund 30 bekannten Mutationen (Hebbar et al., 2016; Wraith et al., 2009) ist eine gute Genotyp-Phänotyp Korrelation beschrieben, wobei die Erkrankung häufig neonatal beginnt und früh letal endet (Millat, Chikh, et al., 2001; Yilmaz et al., 2020). Mit ungefähr 50 % der publizierten *NPC2*-Allele stellt die Mutation c.58 G>T die am häufigsten dokumentierte *NPC2*-Mutation dar und führt mit einem vorzeitigen Stoppcodon zu einem stark verkürzten Peptid. Sowohl bei Homozygotie als auch bei kombinierter Heterozygotie für diese Mutation ist ein schwerer Verlauf mit frühem Manifestationsalter beschrieben, wobei selten das Alter von 4 Jahren erreicht wird (Yilmaz et al., 2020).

### 1.1.2 Modelle zur Untersuchung des Morbus Niemann-Pick Typ C

Für die Untersuchung von oxidativem Stress (OS) und dessen Gegenregulation über das antioxidative Abwehrsystem als pathophysiologischer Mechanismus in NP-C ist die Auswahl eines geeigneten Zellmodells essentiell, wobei eine große Anzahl an verschiedenen Tier- und Zellmodellen für NP-C beschrieben ist.

Insbesondere für die Untersuchung der NPC-Proteine sind einfache Modelle etabliert, zu denen der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Sym et al., 2000), die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (X. Huang et al., 2007) und der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* (Berger et al., 2005) gehören. Durch ihre einfache Haltung und kurze Replikationszeit stellen sie eine kostengünstige Variante dar, wobei keine komplexen Veränderungen durch *NPC*-Mutationen betrachtet werden können. Im Gegensatz dazu stellen Säugetiermodelle eine kostenintensive Alternative dar, mit denen allerdings eine systemische Darstellung des Phänotyps möglich ist. Neben ethischen Aspekten können entdeckte potentielle NP-C-Unterschiede nicht eindeutig von der Unterscheidung der Spezies (Maus vs. Mensch) distanziert werden. Bei dem häufigsten Mausmodell *Npc1<sup>nih</sup>* (BALB/cNctr-NPC1<sup>m1N</sup>/J) ist eine Leserasterverschiebung im *NPC1*-Gen vorhanden, wodurch kein NPC1-Protein mehr gebildet wird, was einen schweren Phänotypen zur

Folge hat (Pentchev et al., 1980). Weitere Mausmodelle mit Punktmutationen sind  $Npc1^{nmf164}$  (C57BL/6J- $Npc1^{nmf164}$ /J) mit der Mutation c.3163A>G (p.D1005G) (Maue et al., 2012) und  $Npc1^{tm(I1061T)Dso}$  mit der Mutation c.3182 T>C (p.I1061T) (Praggastis et al., 2015). Neben den murinen Modellen wird ein felines Modell für die Forschung verwendet (Lowenthal et al., 1990).

Darüber hinaus sind in vitro Zellkulturmodelle vorhanden. Zum einen werden Zellen von chinesischen Hamsterovarien (CHO) verwendet (Watari et al., 1999), zum anderen werden Patienten-spezifische Fibroblasten kultiviert, was die am weitesten verbreitete Methode darstellt (Rauniyar et al., 2015; Zampieri et al., 2009). Trotz leichter Anwendung haben Fibroblasten lange Replikationszeiten. Zusätzlich sind die gewebespezifischen Unterschiede zu bedenken, was Untersuchungen von Regulationsmechanismen und zellulären Funktionen in krankheitsrelevanten Aspekten erschwert. So zeigen neurale Zellen beispielsweise eine andere Elektrophysiologie im Vergleich zu Fibroblasten. Hier erscheint gerade das Fehlen von Haut- und Bindegewebsschäden in NPC diese Diskrepanz zu dem stark ausgeprägten neuronalen Schädigungsmuster zu unterstreichen. Verstärkt wird dieser Unterschied durch die Regenerations- und Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten, die die postmitotischen Zellen des Gehirns nicht aufweisen. Wegen dieser Gründe werden verschiedene neurale Zellsysteme verwendet. Dazu gehören differenzierte Neurone aus humanen NPC1-defizienten embryonalen Stammzellen (Ordonez et al., 2012) sowie neural differenzierte Zellen aus NPC-defizienten multipotenten adulten Stammzellen (Bergamin et al., 2013). Des Weiteren werden Neuroblastom-Zellen genutzt (Rodríguez-Pascau et al., 2012). Das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell beinhaltet NPC-defizienten neural differenzierten Zellen (NDZs), die aus Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) hervorgehen (Peter, Trilck, et al., 2017; Trilck et al., 2013; Völkner et al., 2019; Völkner, Liedtke, Untucht, et al., 2021).

### **Neurales Zellmodell aus NP-C-Patienten-spezifischen iPS**

Das neurale Zellmodell ist gekennzeichnet durch eine retrovirale Reprogrammierung von Patienten-spezifischen Fibroblasten zu iPS mit anschließender Differenzierung zu einer neuronalen Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen (Liedtke, Völkner & Jürs et al., 2021; Peter, Trilck, et al., 2017; Trilck et al., 2017). Dabei beeinflussen die Zellen sich gegenseitig im Metabolismus und ergänzen ihre Funktionen. Darüber hinaus sind Neurone auf den Stoffwechsel der Gliazellen angewiesen, weshalb Mischkulturen vorteilhaft für das Überleben und die Differenzierung der Neurone sind (Sofroniew & Vinters, 2010). Zusätzlich sind Astrozyten für die Reifung der Neurone unerlässlich (Kuijlaars et al., 2016). Nach aktuellem Stand existieren für NP-C 23 Publikationen, die die Erkrankung mithilfe eines Stammzell-basierten Zellmodells

erforschen (Liedtke et al., 2022; Liedtke, Völkner & Jürs et al., 2021; Völkner et al., 2022; Völkner, Liedtke, Hermann, et al., 2021). Vorteilhaft ist hierbei der unlimitierte Zugang zu affektierten Zellen, die Patienten-spezifische Mutationen tragen mit variierender Ausprägung krankheitsrelevanter Aspekte, verglichen mit Knockout-Modellen, die die Maximalvariante darstellen. Insbesondere bei seltenen neurologischen Erkrankungen wie NP-C ist ein ebensolches neurales Modell essentiell, da der Zugang zu neuronalen Patientenproben limitiert ist.

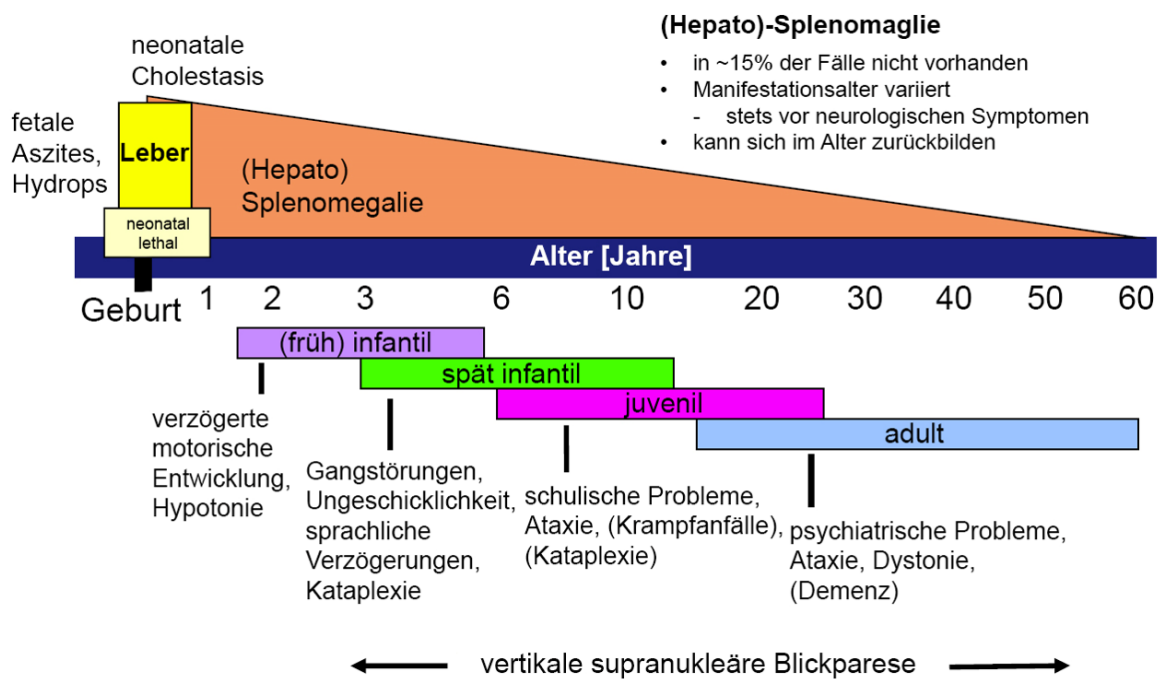
In den für diese Arbeit verwendeten NPC-defizienten Zellen wurde im Rahmen von elektro-physiologischen Untersuchungen auf reife neuronale Netzwerke geschlossen (Peter, Rost, et al., 2017). Ebenso konnte die für NP-C charakteristische Akkumulation von Cholesterol und Gangliosiden in den neuronalen Zellen nachgewiesen werden (Liedtke, Völkner & Jürs et al., 2021; Trilck et al., 2017; Völkner et al., 2022). Zudem sind vesikuläre Transportdefekte durch Hypophosphorylierung der Intermediärfilamente Vimentin und GFAP beschrieben, die zu Exportstörungen von Lipiden führen können. In den NPC1-defizienten neuronalen Zellen wurden neben einer reaktiven Gliose (Peter, Rost, et al., 2017) reduzierte AMPA-induzierte Calcium-Einströme beobachtet (Rabenstein et al., 2017, 2018). Sowohl bei den verwendeten NPC1- als auch bei den NPC2-defizienten NDZs sind Störungen der Autophagie zu sehen (Liedtke et al., 2022; Liedtke, Völkner & Jürs et al., 2021). Autophagie als kataboler Metabolismus ist zuständig für die Degradierung und Wiederverwertung von zellulärem Material und trägt ebenfalls zur Aktivierung von zellulären Signalwegen bei, die auf Stress reagieren (Jiménez-Moreno et al., 2017). Darüber hinaus ist die Morphologie, aber nicht die Funktion der Mitochondrien in den NPC-defizienten NDZs verändert. Durch eine gestörte Beseitigung von Mitochondrien, die auch als Mitophagie bezeichnet wird und u. a. begründet ist in einem reduzierten Transport von Mitochondrien, kann die Zelle nicht adäquat auf mitochondrialen Schaden reagieren (Liedtke et al., 2022). Mitochondrien sind einer der Hauptentstehungsorte für reaktive Sauerstoffspezies/ reactive oxygen species (ROS) u. a. wegen der dort lokalisierten Atmungskette (Murphy, 2009). Neurone sind durch einen hohen energetischen Umsatz mit einhergehend erhöhter Produktion von oxidativen Metaboliten besonders anfällig für OS und aufgrund ihres postmitotischen Zustandes hoch sensibel (Gilgun-Sherki et al., 2001). Deswegen erscheint die Nutzung eines neuronalen Zellmodells wie dem hier verwendeten iPS-basierten Systems in neurodegenerativen Erkrankungen wie NP-C essentiell, im Speziellen bei der Untersuchung von hochsensiblen Prozessen wie OS.

### **1.1.3 Klinischer Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C**

Der klinische Phänotyp des Morbus Niemann-Pick Typ C bietet ein heterogenes Bild an Symptomen und Verläufen der Erkrankung. Anhand des Alters der Erstmanifestation wurde eine

Einteilung in verschiedene Formen vorgenommen. Hierbei lassen sich die perinatale, früh infantile, spät infantile, juvenile und adulte Form differenzieren (Abb. 3) (Vanier, 2010). Die Verteilung innerhalb der Formen erscheint relativ gleichmäßig mit Ausnahme der perinatalen Form, die deutlich seltener auftritt (Bolton et al., 2022). In 15 % der Fälle sind keine Anzeichen für systemische Ausprägungen vorhanden, wohingegen fast alle Patienten eine progressive Neurodegeneration entwickeln, außer derer mit einer neonatalen Form. Der Verlauf und der jeweilige Beginn der viszeralen und neurologischen Manifestationen ist dabei unabhängig voneinander, wobei neurologische meistens nach systemischen Störungen auftreten (Iturriaga et al., 2006; Vanier & Millat, 2003; Vanier & Suzuki, 1998). Die viszeralen Störungen sind häufig nicht schwerwiegend und umfassen eine Hepatosplenomegalie, die mit steigendem Alter abnimmt, sowie einen Ikterus, Aszites und selten Lungenbeteiligungen. Eine Ausnahme bildet der schwere Verlauf der perinatalen Form (Bolton et al., 2022; Griese et al., 2010; Spiegel et al., 2009). Die neurologische Symptomatik ist divers (Abb. 3). Die am häufigsten berichteten Manifestationen sind kognitive Beeinträchtigungen, zerebelläre Ataxie, vertikale supranukleäre Blickparese, Dysarthrie und Dysphagie sowie eine progressive Demenz. Seltener treten neben Bewegungsstörungen, Krampfanfällen und der Kataplexie viele weitere Symptome auf (Bolton et al., 2022; Iturriaga et al., 2006; Solomon et al., 2005). Psychiatrische Veränderungen treten v. a. bei einem späten Beginn der Erkrankung auf (Bolton et al., 2022; Trendelenburg et al., 2006). Die Arbeitsgruppe von Bolton fand heraus, dass mit steigendem Manifestationsalter der neurologischen Symptome zum einen die Diagnose später gestellt wird und zum anderen das Todesalter höher ist (Bolton et al., 2022). Die Lebenserwartung variiert zwischen einigen Tagen und mehr als 60 Jahren, wobei die meisten Patienten zwischen dem 10.-25. Lebensjahr versterben (Spiegel et al., 2009; Trendelenburg et al., 2006; Wraith et al., 2009).

## Systemische (viszerale) Beteiligung



## Neurologische Beteiligung

### Abb. 3: Darstellung des klinischen Phänotyps des Niemann–Pick Typ C

Schematische Darstellung der NP-C1-Formen im Hinblick auf die charakteristischen viszeralen und neurologischen Symptome und das Alter der Erstmanifestation. Modifiziert nach Vanier (2010).

#### 1.1.4 Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ C

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt ungefähr 11 Jahre (Bolton et al., 2022). Allerdings führen die mangelnde Verbreitung des Fachwissens und die Rarität der Krankheit häufig zu einer Verzögerung der Diagnose, wobei ein früher Befund zur Verbesserung der Lebensqualität beiträgt (Vanier et al., 2016). 2018 wurden neue Leitlinien für die NP-C-Diagnostik veröffentlicht (Geberhiwot et al., 2018), die im Anhang in Abb. 34 zusammengefasst werden. Hiernach sollen bei NP-C-Verdacht Plasmabiomarker getestet werden, zu denen Oxysterole wie C-triole und 7-Ketocholesterol sowie Lyso-Sphingolipide und Gallensäurederivate gehören. Da die Oxysterole auch bei anderen metabolischen Erkrankungen erhöht sein können (X. Jiang et al., 2011; Porter et al., 2010), wird ein Screening der Lyso-Sphingolipide Lyso-SM und Lyso-SM-509 empfohlen. Eine Erhöhung des Verhältnisses von Lyso-SM-509/ Lyso-SM weist sehr spezifisch auf NP-C hin (Pettazzoni et al., 2017; Voorink-Moret et al., 2018). Trotzdem ist die Genanalyse mit Sequenzierung des *NPC1*- oder *NPC2*-Gens obligatorisch, wenngleich auch heute noch einige *NPC*-Allele unidentifiziert sind (Vanier et al., 2016). Die Bestimmung von unverestertem Cholesterin von aus einer Hautbiopsie gewonnenen Fibroblasten mittels Filipin-Test stellt bei unklaren Patientenfällen auch heute noch ein wichtiges Diagnostikum dar (Geberhiwot et al., 2018; Vanier et al., 2016). Des Weiteren stellt der Nachweis von



einer vermehrten Färbung von Fibroblasten mit dem LysoTracker ein potentielles zukünftiges Diagnostikum dar, das korreliert mit der Schwere der neurologischen Symptome und korreliert invers mit dem Manifestationsalter dieser (Baxter et al., 2022; Rodriguez-Gil et al., 2013).

Als Verlaufskontrollen werden Bildgebungen des Gehirns verwendet, die unspezifische Veränderungen wie Volumenminderungen im Bereich des Kleinhirns, Hypocampus', Basalganglien und des Thalamus' zeigen (Walterfang, Abel, et al., 2013; Walterfang, Patenaude, et al., 2013).

### **1.1.5 Management und Therapieansätze des Morbus Niemann-Pick Typ C**

Derzeit ist keine kurative Therapie von NP-C vorhanden, weshalb primär eine multidisziplinäre, symptomatische Behandlung erfolgt (Geberhiwot et al., 2018). Neben Patientenschulungen spielen Antikonvulsiva, Anticholinergika, Antidepressiva und Neuroleptika eine bedeutende Rolle. Des Weiteren werden Psycho- und Physiotherapie sowie Logopädie empfohlen (Geberhiwot et al., 2018; Wraith et al., 2009). Sowohl Knochenmark-, als auch Leber- und Lungentransplantationen verbessern die systemischen Manifestationen ohne Einfluss auf die Progression der neurologischen Symptome (Gartner et al., 1986; Hsu et al., 1999). Als Substratreduktionstherapie ist seit 2009 der Iminozucker Miglustat (n-Butyldeoxynorjirimycin; Zavesca®) zugelassen, der als reversibler Inhibitor der Glykosylceramidsynthase, mit folgender Reduktion von Glykosphingolipiden, bei lysosomalen Speichererkrankung wie dem Morbus Gaucher Typ 1 zum Einsatz kommt. Langzeitstudien zeigen unter Miglustat-Therapie eine stabile bis verbesserte neurologische Symptomatik (Cuisset et al., 2016; Patterson et al., 2020; Wraith et al., 2010). Des Weiteren befindet sich das zyklische Oligosaccharid 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (VTS-270 oder Trappsol® Cyclo™) in Phase 2b/3 einer klinische Studie (Matencio et al., 2020; Matsuo et al., 2013). Dabei vermittelt Cyclodextrin NPC1-unabhängig die intrazelluläre Umverteilung und den Austritt von freiem Cholesterol aus den Endosomen bzw. Lysosomen in Neuronen. Es mindert so die Progression der Erkrankung und erzielt eine leichte Verbesserung der Symptomatik (Demais et al., 2016; Maarup et al., 2015; Rosenbaum et al., 2010). Weitere potentielle Therapeutika befinden sich derzeit in der experimentellen Forschung. Neben Histondeacetylase-Inhibitoren wie SAHA (Suberoylanilid-Hydroxamsäure, Vorinostat), bei denen die Transkription von Genen erhöht wird, die an der Cholesterolhomöostase beteiligt sind (Pipalia et al., 2011), werden pharmakologische Chaperone getestet. Diese unterstützen das fehlgefaltete Protein bei der korrekten Faltung und erhöhen somit den Gehalt von reifem NPC-Protein. Kürzlich zeigten Völkner et al. (2022) u. a. in dem hier verwendeten Zellmodell, dass neben dem prominentesten Vertreter 25-Hydroxycholesterol ebenfalls Quinestrol und Abirateron-Acetat in *NPC1*-Missense-Mutationen eine Erhöhung des reifen Proteins und eine Verminderung des zellulären Cholesterols bewirken (Völkner et al., 2022).

## 1.2 Zellulärer oxidativer Stress als pathophysiologischer Mechanismus

Molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) ist für die ATP-Produktion innerhalb der Atmungskette essentiell und somit in jeder aeroben Zelle vorzufinden. Jedoch können als Nebenprodukte während des Metabolismus‘ reaktive Sauerstoffspezies/ reactive oxygen species (ROS) und reaktive Stickstoffspezies/ reactive nitrogen species (RNS) entstehen, die freie Radikale und reaktive Moleküle beinhalten. Charakterisiert sind die kurzlebigen ( $\sim 1\mu s$ ) freien Radikale durch das Vorhandensein von einem ungepaarten Valenzelektron, wodurch sie hochgradig reaktiv sind (McCord, 2000; Uttara et al., 2009). Aus physiologischer Sicht sind reaktive Moleküle als Signalmolekül wichtig für die Regulation von intrazellulären Prozessen. Beispielsweise aktiviert ROS den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, dessen Funktion von der Regulation des Zellwachstums und Zellüberlebens bis zu Entzündungsreaktionen und synaptischer Plastizität reicht (Finkel, 2011; Mémet, 2006; Schreck et al., 1991). Hohe ROS-Niveaus führen hingegen zur metabolischen Stressadaptation, Autophagie-Initiierung sowie zur Apoptose-Induktion (Y. Chen et al., 2009; Schieber & Chandel, 2014; Zamzami et al., 1995). Gerät das Verhältnis der Produktion reaktiver Moleküle und deren Abbau durch das antioxidative Abwehrsystem aus dem Gleichgewicht, wodurch ein Überschuss an ROS und RNS entsteht, spricht man von oxidativem Stress (OS). Dieser induziert über die Oxidation verschiedenster Biomoleküle Zellschäden, die zum Stress-induzierten Zelltod führen können (Schieber & Chandel, 2014).

### 1.2.1 Entstehung von reaktiven Molekülen

Neben exogenen Quellen wie Strahlung stellen endogene Prozesse den Hauptentstehungsort von reaktiven Molekülen dar. Die größte Bedeutung hat dabei der aerobe Metabolismus, der durch Abfolgen mehrerer Reaktionsschritte während der ATP-Synthese ROS in hohem Maße als Nebenprodukt entstehen lässt (Löffler et al., 2007). Bei Zellen mit einem hohen Energieumsatz wie Neurone kann dabei das Gleichgewicht durch kleinste Veränderungen gestört werden und so eine Anhäufung reaktiver Spezies entstehen (Uttara et al., 2009). Dies geschieht insbesondere bei mitochondrialen Veränderungen als Hauptlokalisation des aeroben Stoffwechsels (Kroemer & Reed, 2000), die bei NPC-defizienten neuronalen Zellen nachgewiesen wurden (Liedtke et al., 2022; Torres et al., 2017). Ein natürlicher Entstehungsort von ROS sind Peroxisomen, in denen während des oxidativen Abbaus von Fettsäuren Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) entsteht (Boveris et al., 1972; Löffler et al., 2007). Beeinträchtigungen der Funktionen der Peroxisomen, wie es in Gehirnen von NPC-defizienten Mäusen nachgewiesen wurde (Schedin et al., 1997), könnte zu einer Dysbalance zwischen der Produktion und dem Abbau von ROS führen. Weitere endogene ROS-Quellen sind Autoxidationen von reduzierten Zwischenprodukten des Stoffwechsels wie z. B. Semichionon (Löffler et al., 2007), katalysierte Reaktionen

durch verschiedene Metalloenzyme (Finkel, 2011) und pathologische zelluläre Zustände wie Hypoxie (Bell et al., 2007) oder Proteinaggregationen (M. S. Parihar et al., 2009).

ROS ist ein Überbegriff für reaktive Moleküle, die  $O_2$  beinhalten. Dazu gehören u. a. Superoxidanionenradikale ( $O_2^{\bullet-}$ ),  $H_2O_2$ , Hydroxylradikale ( $HO^{\bullet}$ ) und Peroxylradikale. RNS besteht im Wesentlichen aus Stickstoffmonoxid (NO) und dessen Folgeprodukt Peroxynitrit ( $ONOO^{\bullet}$ ). Im Überschuss führen all diese Moleküle zu OS (J. Lee et al., 2012; Schipper, 2004).

$O_2^{\bullet-}$  können Membranen passieren und über Folgereaktionen in verschiedene reaktive Moleküle umgewandelt werden. Sie entstehen v. a. als Nebenprodukt innerhalb der Atmungskette durch eine Ein-Elektronreduktion von  $O_2$ , meist bei einer hohen Stoffwechselrate wie bei Neuronen oder bei geschädigter Atmungskette (Murphy, 2009).  $H_2O_2$  wird hauptsächlich aus  $O_2^{\bullet-}$  über die Superoxid-Dismutase (SOD) gebildet und kann ebenfalls Membranen passieren (Antunes & Cadenas, 2000). Es ist relativ inert, jedoch entsteht in Anwesenheit von dreiwertigen Metallionen über die Fenton-Reaktion  $HO^{\bullet}$  (Brand, 2010; Murphy, 2009).  $HO^{\bullet}$  sind sehr reaktive Moleküle, die willkürlich Biomoleküle oxidieren mit folgender Funktionseinschränkung (Löffler et al., 2007). NO als Teil der RNS wird meistens über die NO-Synthase gebildet (Alderton et al., 2001) und ist als wichtiges Signalmolekül an der Neurotransmission und Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt (Bredt & Snyder, 1992). NO ist nicht direkt toxisch, sondern bildet durch Reaktionen mit verschiedenen Strukturen reaktive Moleküle. So führt eine dieser Reaktionen zur Bildung von Peroxynitrit (Blough & Zafiriou, 1985; Ohshima et al., 1990; Saran et al., 1990). Neben DNS-Schädigungen und Lipidperoxidationen stellt das entstehende Anion bei OS eine der Ursachen für Proteinveränderungen dar. Ein häufiger Angriffspunkt ist die Aminosäure Tyrosin. Das daraus entstandene, stabile Addukt 3-Nitrotyrosin (Anhang, Abb. 35) (Hogg et al., 2015) erweist sich somit als verlässlicher Marker für zellulären OS. Dieser wird ebenfalls in NP-C zur Detektion von nitrierten Proteinen genutzt, um das Maß an OS zu bestimmen (Klein et al., 2011; Marín et al., 2014; Torres et al., 2017).

### **1.2.2 Das antioxidative Abwehrsystem**

Für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Produktion und Abbau von reaktiven Molekülen ist ein ausgebautes antioxidative Abwehrsystem essentiell. Die Funktionen reichen von der Entfernung von  $O_2$  bis zur Verhinderung der Formation von ROS und RNS sowie die Beseitigung von den bereits gebildeten reaktiven Molekülen. Zur Verhinderung der Produktion von ROS werden Nebenreaktion bei  $O_2$ -abhängigen Metalloenzymen umgangen wie bei dem Komplex IV der Atmungskette. Sind trotz der Abwehr Schäden innerhalb der Zelle entstanden, werden Reparaturmechanismen aktiviert, wobei DNS repariert und Lipide sowie Proteine

degradiert werden. Die Einteilung dieses komplexen Systems erfolgt in enzymatischer und nicht-enzymatischer Abwehr (Gilgun-Sherki et al., 2001; Löffler et al., 2007).

### **Das enzymatische antioxidative Abwehrsystem der Zelle**

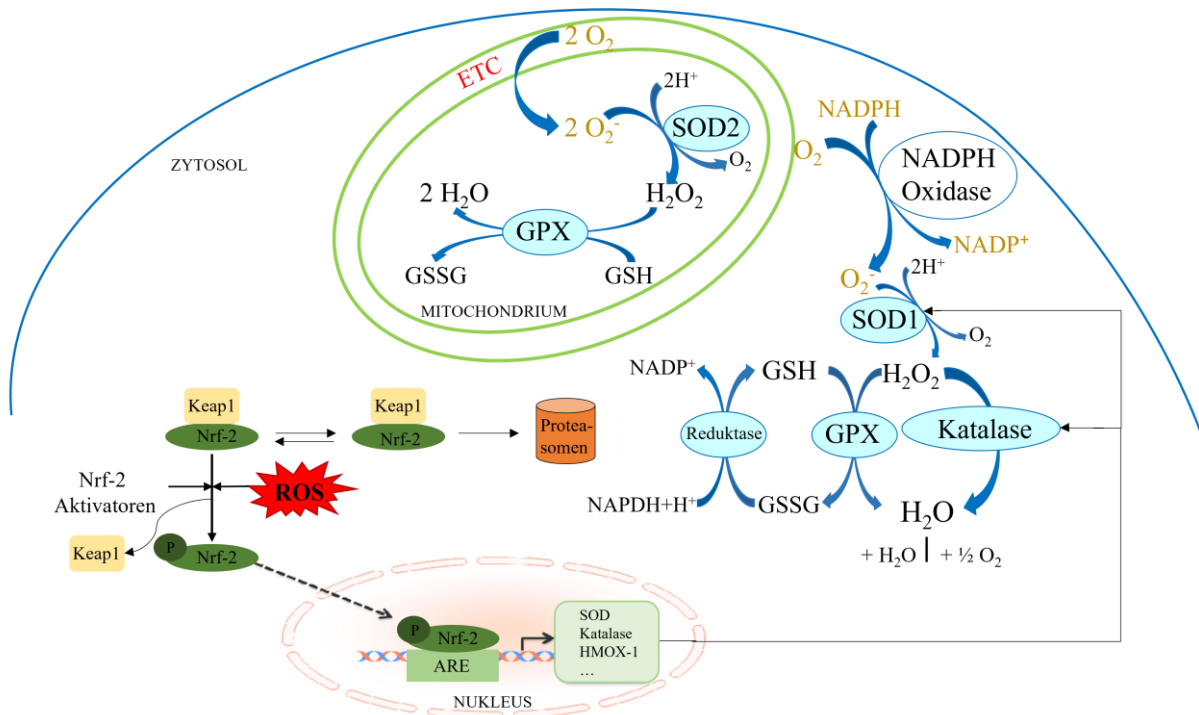
Das zelluläre, enzymatische Abwehrsystem setzt sich aus mehreren Enzymen zusammen, wobei die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und die Glutathionperoxidase (GPX) am wichtigsten im Regulationsnetzwerk sind (Abb. 4).

Die GPX ist ein Selenoprotein und nutzt Glutathion, um  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu degradieren und kommt ubiquitär in der Zelle vor. (Rupérez et al., 2014).

Die SOD führt bei der Elimination von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  zur Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  (Löffler et al., 2007). Es sind drei Isoformen der SOD bekannt, die trotz derselben Funktion Unterschiede bezüglich ihrer Lokalisation, Proteinstruktur und ihres metallischen Cofaktors im aktiven Zentrum aufweisen (Miao & St. Clair, 2010). Die SOD1 ist hauptsächlich im Zytosol, Nukleus und in dem mitochondrialen Intermembranraum zu finden und wird konstant exprimiert. Das Homodimer besitzt Kupferionen im aktiven Zentrum, was durch Zinkionen stabilisiert wird (Kayatekin et al., 2008; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001). Bevorzugt in der mitochondrialen Matrix ist die SOD2 vorzufinden, die Manganionen als katalytisch aktive Einheit besitzt. Mit zwei humanen Transkripten ist das Homotetramer essenziell für das zelluläre Überleben eines aeroben Organismus' (Carlioz & Touati, 1986; Lebovitz et al., 1996; Wan et al., 1994). Die SOD2 verfügt neben antioxidativen ebenfalls über tumorsuppressive Eigenschaften und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Apoptose (Y. Zhao et al., 2002; Zhong et al., 1997). Die in der Plasmamembran und in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommende SOD3 ist ein homotetramerisches Glykoprotein mit Ähnlichkeiten zu der SOD1 und enthält ebenfalls Kupfer- und Zinkionen im aktiven Zentrum (Marklund, 1982; Miao & St. Clair, 2010). Durch ihre Lokalisation spielt sie allerdings eine untergeordnete Rolle bei der Beseitigung von zellulärem OS. Die Expression der SODs und die Konzentration von ROS werden reziprok reguliert, wobei Transkriptionsfaktoren wie der mit dem Kernfaktor Erythroid 2 verwandte Faktor 2 (Nrf-2) eine wichtige Rolle spielt. Dieser induziert die Transkription von antioxidativen Enzymen wie die SOD. Unter physiologischen Bedingungen ist Nrf-2 im Zytosol an Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) gebunden und somit für die proteasomale Degradierung gekennzeichnet. Bei einem erhöhtem ROS Niveau dissoziiert der Nrf-2-Keap1-Komplex, Nrf-2 wird phosphoryliert und es erfolgt eine nukleare Translokation. Dort bindet Nrf-2 an ARE (antioxidant response element) in Promotorregionen und induziert die transkriptionelle Expression von antioxidativen Enzymen wie der Hämoxigenase-1 (HMOX-1), Katalase und SOD (Abb. 4) (J. Chen et al., 2014; Loboda et al., 2016; Shih et al., 2005). Zusätzlich treten neben epigenetischen

Beeinflussungen der SOD-Expression (Hitchler et al., 2006; Y. Huang et al., 1999) posttranslationale Modifizierungen auf, die die Enzymaktivität verändern (Furukawa & O'Halloran, 2006). Insbesondere führen bei erhöhten RNS-Niveaus im Rahmen von OS Nitrierung im aktiven Zentrum der SOD2 zur Inaktivierung des Enzyms (Yamakura et al., 1998).

Ein weiterer, elementarer Bestandteil des Abwehrsystems gegen OS stellt die Katalase dar, die Millionen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  Molekülen ( $\sim 10^7$  M/s) in einer Sekunde zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  entgiftet (Young & Woodside, 2001). Die Katalase kann ebenfalls Peroxynitrit abbauen (Heinzelmann & Bauer, 2010). Das Häm-enthaltene Protein gehört zu der Gruppe der Peroxidasen (Löffler et al., 2007) und besteht aus vier gleichgroßen Untereinheiten, die meistens ein Tetramer bilden (Kirkman & Gaetani, 1984). Die Katalase ist sehr stabil und resistent gegenüber Proteolysen (Goyal & Basak, 2010). Bei ubiquitärer Expression ist es auf zellulärer Ebene v. a. in Peroxisomen zu finden, wobei geringere Mengen auch im Zytosol, in Lysosomen und in Mitochondrien lokalisiert sind (Cadet & Brannock, 1997; Walton et al., 2017). Trotz einer verhältnismäßig geringen Konzentration im Gehirn, hat die Katalase in in vitro Experimenten effektiv eine Neurodegeneration inhibiert (Busciglio & Yankner, 1995; Mann et al., 1997). Die Expression wird vornehmlich auf Transkriptionsebene reguliert. Die Katalase unterliegt jedoch ebenfalls posttranslationalen und posttranskriptionellen Modifizierungen, wobei durch Phosphorylierung die katalytische Aktivität um das 4-5fache gesteigert werden kann (Rhee et al., 2005). Weitere Faktoren sind genetische Veränderungen sowie epigenetische Modifizierungen wie Histon-Deacetylierung und DNS-Methylierung (Goyal & Basak, 2010). Im Spezifischen wurden durch ROS-Exposition Methylierungen an spezifischen CpG-Inseln in Promotorregionen der Katalase festgestellt, die zu einer verminderten Expression führen (Min et al., 2010; Quan et al., 2011).



**Abb. 4: Zelluläres antioxidatives Abwehrsystem und der Nrf-2-ARE-Signalweg**

Darstellung der wichtigsten zellulären Reaktionen zur Entstehung und Beseitigung von ROS, die u. a. die enzymatischen Reaktionen der Katalase, SOD1, SOD2 sowie der GPX beinhalten. Des Weiteren wird der Nrf-2-ARE-Signalweg abgebildet, der zur Induktion der Transkription von antioxidativen Enzymen führt. ETC: Elektronentransportkette, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion. Erstellt und modifiziert nach Chen et al. (2014); Löffler et al. (2007); Rupérez et al. (2014).

### Antioxidantien als Abwehr gegen reaktive Moleküle

Neben dem enzymatischen, antioxidativen System existieren viele antioxidative Substanzen wie Vitamin A, C, E, Glutathion, Zink und Polyphenole, die als direkte Abwehr ROS eliminieren. Das fettlösliche Vitamin E, auch  $\alpha$ -Tocopherol genannt, entschärft Peroxylradikale im Rahmen von Lipidperoxidationen, was zum Sistieren dieser Reaktionskette führt. Das dabei entstandene Tocopherolradikal wird durch Vitamin C, auch Ascorbat genannt, regeneriert. Die Zelle nutzt Ascorbat ebenfalls zur Regeneration von Glutathion (Löffler et al., 2007; Uttara et al., 2009). Glutathion wird intrazellulär synthetisiert, kommt im Zytosol vor und ist das häufigste zelluläre Antioxidans. Da es durch die Membran transportiert werden kann, ist es ebenso in Organellen vorzufinden wie in Mitochondrien oder im endoplasmatischen Retikulum (Lash, 2006; Meister & Anderson, 1983). Das reduzierte Glutathion (GSH) deaktiviert reaktive Moleküle wie Peroxidverbindungen, indem es von diesen oxidiert wird. Diese Reaktion wird durch die GPX katalysiert. Das entstandene oxidierte Glutathion (GSSH) wird durch die Glutathion-Reduktase regeneriert (Löffler et al., 2007). Erhöhungen des Cholesterolgehalts in der mitochondrialen Membran, wie es in NP-C zu sehen ist, führen durch Transportstörungen von Glutathion zu Schädigung mitochondrialer Funktionen (Hunter et al., 1964; Marí et al., 2008).

Des Weiteren sind Phenole wirksame exogene Antioxidantien, wozu Flavonoide zählen (Bors & Saran, 1987; Cotelle et al., 1996). Zu den antioxidativ wirksamsten Flavonoiden gehören Quercetin und Kaempferol, die in Pflanzen, Gemüse und Obst vorkommen (Liu, 2013).

Quercetin fängt durch eine hohe Anzahl an Hydroxylresten (Anhang Abb. 36) ROS und RNS, im Speziellen auch Peroxynitrit, direkt ab (Heim et al., 2002). Zusätzlich aktiviert Quercetin den Nrf-2-ARE-Signalweg, wodurch die Expression von antioxidativen Enzymen wie die Katalase und die SOD2 steigt. Ebenfalls wird das intrazelluläre Glutathion erhöht (Arredondo et al., 2010; Kumar et al., 2016; Myhrstad et al., 2002). Studien zeigen eine neuroprotektive Wirkung von Quercetin. Insbesondere im murinen Modell der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer verbessert es die typische Pathologie. Daneben wird eine tumorsuppressive und antiinflammatorische Wirkung beschrieben sowie eine Senkung des Serum LDL-Spiegels in Ratten (Costa et al., 2016; Russo et al., 2012; Sabogal-Guáqueta et al., 2015). Wenngleich es als etwas schwächer antioxidativ wirksam im Vergleich zu Quercetin gilt, fängt Kaempferol (Anhang, Abb. 36) ebenfalls direkt freie Radikale ab. Daneben aktiviert auch Kaempferol den Nrf-2-ARE-Signalweg. Zusätzlich zeigen Studien, dass Kaempferol die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Apoptose inhibiert (Heim et al., 2002; Kumar et al., 2016). Die Arbeitsgruppe von Li et al. (2013) beschreibt den inhibierenden Effekt von Kaempferol auf Lipidakkumulationen mit konsekutiver Senkung der Serum LDL Konzentration (Ochiai et al., 2016).

### **1.2.3 Konsequenzen des Überschusses an ROS und RNS auf zellulärer Ebene**

Wenn mehr reaktive Moleküle vorhanden sind, als vom antioxidativen Abwehrsystem abgebaut werden können, wird von OS gesprochen. Unabhängig von der zellulären Lokalisation, der Art oder der Konzentration des jeweiligen reaktiven Moleküls kann dies zur Aktivierung von Signalwegen oder zu Veränderungen von Makromolekülen führen. Die Signalwege beinhalten eine Adaptation an erhöhte ROS- oder RNS-Niveaus, die Verstärkung von proliferativen und proinflammatorischen Signalwegen, Veränderungen im axonalen Transport sowie eine Induktion von Apoptose (Bulua et al., 2011; Schieber & Chandel, 2014; Uttara et al., 2009). Einige dieser Aspekte sind ebenfalls in NP-C zu beobachten. So zeigen Gehirne von NPC-defizienten Mäusen deutliche Entzündungszeichen (Shin et al., 2019) und apoptotische Vorgänge (Klein et al., 2011). Zudem ergaben sich sowohl im murinen als auch im human neuronalen Modell von NP-C-Veränderungen im zellulären Transport (Liedtke et al., 2022; Roney et al., 2021).

Neben der Aktivierung von Signalwegen oxidieren reaktive Moleküle zelluläre Makromoleküle wie Kohlenhydrate, Proteine, Lipide und die DNS. Die dabei entstehenden Nebenprodukte sind häufig toxisch für die Zelle (Bland, 1978; Löffler et al., 2007). Der als Lipidperoxidation bezeichnete Prozess bedeutet das Attackieren von Lipiden durch reaktive Moleküle, wovon

insbesondere ungesättigte Fettsäuren betroffen sind, aus denen größtenteils die Phospholipide der Membranen im Gehirn bestehen. Die durch die ausgelöste Kettenreaktion entstehenden Lipide sind stark in ihren funktionellen Eigenschaften verändert (Löffler et al., 2007). In der lysosomalen Speichererkrankung NP-C sind ebenfalls als potentielle Folge von zellulärem OS Lipidperoxidationen zu finden (Ribas et al., 2012). Diese treten ubiquitär in der Zelle auf und führen durch die Zerstörung der Membranen zur Schwellung mit anschließender Lyse von Mitochondrien, Mikrosomen und Lysosomen. Des Weiteren reagieren Lipidperoxide direkt mit Proteinen und inaktivieren bzw. degradieren diese (Bland, 1978). Proteine sind besonders sensibel für ROS und RNS v. a. an Tyrosyl- und Cysteinresten. Es kann zu direkten Modifikationen im aktiven Zentrum führen oder durch Veränderungen der Raumstruktur der Proteine deren Aktivität ändern (Löffler et al., 2007). Durch Inaktivierung von Schlüsselenzymen beeinflusst dies maßgeblich den Energiestatus der Zelle (Buchczyk et al., 2003; Sultana, Boyd-Kimball, et al., 2006). Zusätzlich kommt es zur Verstärkung des OS durch Nitrierungen an Enzymen des antioxidativen Abwehrsystems, wie die SOD2, sowie an mitochondrialen Enzymen. Die hervorgerufenen, mitochondrialen Dysfunktionen führen wiederum zur vermehrten ROS-Produktion (Sultana, Perluigi, et al., 2006; Turko et al., 2003; Yamakura et al., 1998). Darüber hinaus greifen die reaktiven Moleküle direkt die DNS und RNA an, wodurch Strangbrüche, Fehlpaarungen und Mutationen induziert werden (Löffler et al., 2007). Zur Verhinderung der Ausbreitung von Mutationen werden DNS-Reparaturmechanismen aktiviert. Bei zu großem Schaden der DNS werden pro-apoptotische Signalwege induziert (Hepel & Andreescu, 2015; Marnett et al., 2003). In humanen, NPC-defizienten neuronalen Zellen konnten ebenfalls erhöhte Apoptosemarker gesehen werden (S. E. Lee et al., 2020), was mit dem beobachteten progressiven Verlust von insbesondere im Kleinhirn lokalisierten Purkinjezellen einhergehen könnte (Rabenstein et al., 2018).

### **1.3 Oxidativer Stress in neurodegenerativen Erkrankungen**

Das Nervensystem spielt eine besondere Rolle bei der Betrachtung von OS, da insbesondere Neurone besonders anfällig für OS induzierte Schäden durch anatomische und metabolische Faktoren sind. Im Gehirn befindet sich im Vergleich zu anderen Organen viel O<sub>2</sub> wegen des enorm hohen Energieumsatzes, was durch eine hohe Aktivität der Atmungskette mit einer gesteigerten Produktion von reaktiven Molekülen einhergeht. Hinzu kommt die hohe Anzahl an Neurotransmittern, deren Metabolismus ebenfalls zur Produktion von ROS führt (Uttara et al., 2009). Dabei stellen die in einer hohen Anzahl vorkommenden, ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Myelinscheide (Rapoport et al., 2007) einen Angriffspunkt für die als Lipidperoxidation bezeichnete oxidative Modifikation dar. Diese Tatsachen zusammen mit dem relativ



gesehen geringen Maß an antioxidativen Abwehrmechanismen intrazerebral erklärt, warum insbesondere in neurodegenerativen Erkrankungen OS einen elementaren Bestandteil der Pathogenese darstellt (Cadet & Brannock, 1997; Uttara et al., 2009). Da differenzierte Neurone und Gliazellen postmitotische Zellen sind, verlassen sie den Zellzyklus und befinden sich somit in der G<sub>0</sub>-Phase, weshalb durch OS induzierte DNS-Schäden über die Zeit akkumulieren. Zu große zelluläre Schäden führen zum Zelltod und somit zum progressiven Verlust von Neuronen, kurz zur Neurodegeneration (Cadet & Brannock, 1997; Lin & Beal, 2006), sowie zur reaktiven Gliose (Groeger et al., 2012). Jedoch ist es schwer zu differenzieren, ob OS die Ursache oder die Folge der Neurodegeneration ist (Gan & Johnson, 2014).

Neurodegenerative Erkrankungen umfassen eine heterogene Gruppe, die OS als gemeinsamen Pathogenitätsmechanismus aufweisen. So sind im Morbus Parkinson mitochondriale Dysfunktionen neben Akkumulationen von Proteinaggregaten als Quelle von ROS zu sehen (Banerjee et al., 2010; Devi et al., 2008), wobei der entstandene OS in einer Degeneration von dopaminergen Neuronen mündet (Deas et al., 2016). Einen weiteren Ursprung von OS stellen Defekte im antioxidativen Abwehrsystem dar. Dessen Funktion ist, durch die Elimination von reaktiven Metaboliten, die Aufrechterhaltung der Balance des Auf- und Abbaus von ROS und RNS. Dabei spielt beispielsweise die Störung der SOD1 im Morbus Parkinson eine wichtige Rolle in der gestörten Beseitigung von ROS (Trist et al., 2017) äquivalent zur genetisch determinierten Form der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), die Mutationen im *SOD1*-Gen besitzen kann. In ALS sind neben einer gestörten Autophagie (An et al., 2014), wie es auch in NP-C gezeigt wurde (Liedtke et al., 2022), ebenfalls mitochondriale Dysfunktionen zu beobachten (Lopez-Gonzalez et al., 2016). Beides geht mit einem erhöhten Maß an OS einher. Darüber hinaus zeigen Studien an neuronalem Gewebe von ALS-Patienten erhöhte oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNS, was zu einem Verlust von Motoneuronen führt (Cunha-Oliveira et al., 2020; Ferrante et al., 1997). Die Neurotoxizität von OS ist ebenfalls in der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer zu beobachten. Neben dem direkten Marker von OS, der Bestimmung der ROS-Formation (Yatin et al., 1999), sind wie bei ALS oxidative Schäden an Makromolekülen zu beobachten (Sultana, Boyd-Kimball, et al., 2006). Zusätzliche Veränderungen verschiedener antioxidativer Enzyme geben einen weiteren Hinweis auf OS (Lovell et al., 1995), der wie in den anderen, beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen in dem progressiven Verlust von Neuronen endet (Butterfield et al., 2002).

### **1.3.1 Oxidativer Stress in Morbus Niemann-Pick Typ C**

NP-C als neurodegenerative Erkrankung beschreibt eine progressive Degeneration v. a. von Purkinjezellen des Kleinhirns (Kavetsky et al., 2019; Rabenstein et al., 2018) sowie eine

reaktive Gliose (Cologna et al., 2014; Peter, Rost, et al., 2017). OS als wichtiger Einflussfaktor in dem pathophysiologischen Mechanismus der für NP-C typischen neuronalen Veränderungen ist naheliegend. Eine Zusammenführung potentieller Einflussfaktoren und Folgen von OS in NP-C sind der Abb. 5 (siehe S. 20) zu entnehmen. Sowohl direkte Marker als auch indirekte Hinweise wie oxidierte Makromoleküle innerhalb von NPC-defizienten Zellen wurden in verschiedenen in vivo und in vitro Modellen nachgewiesen und lassen auf eine essentielle Rolle von OS in der Krankheitsentstehung und -progression schließen (Kennedy et al., 2014; Klein et al., 2011; Vilaça et al., 2018; Zampieri et al., 2009).

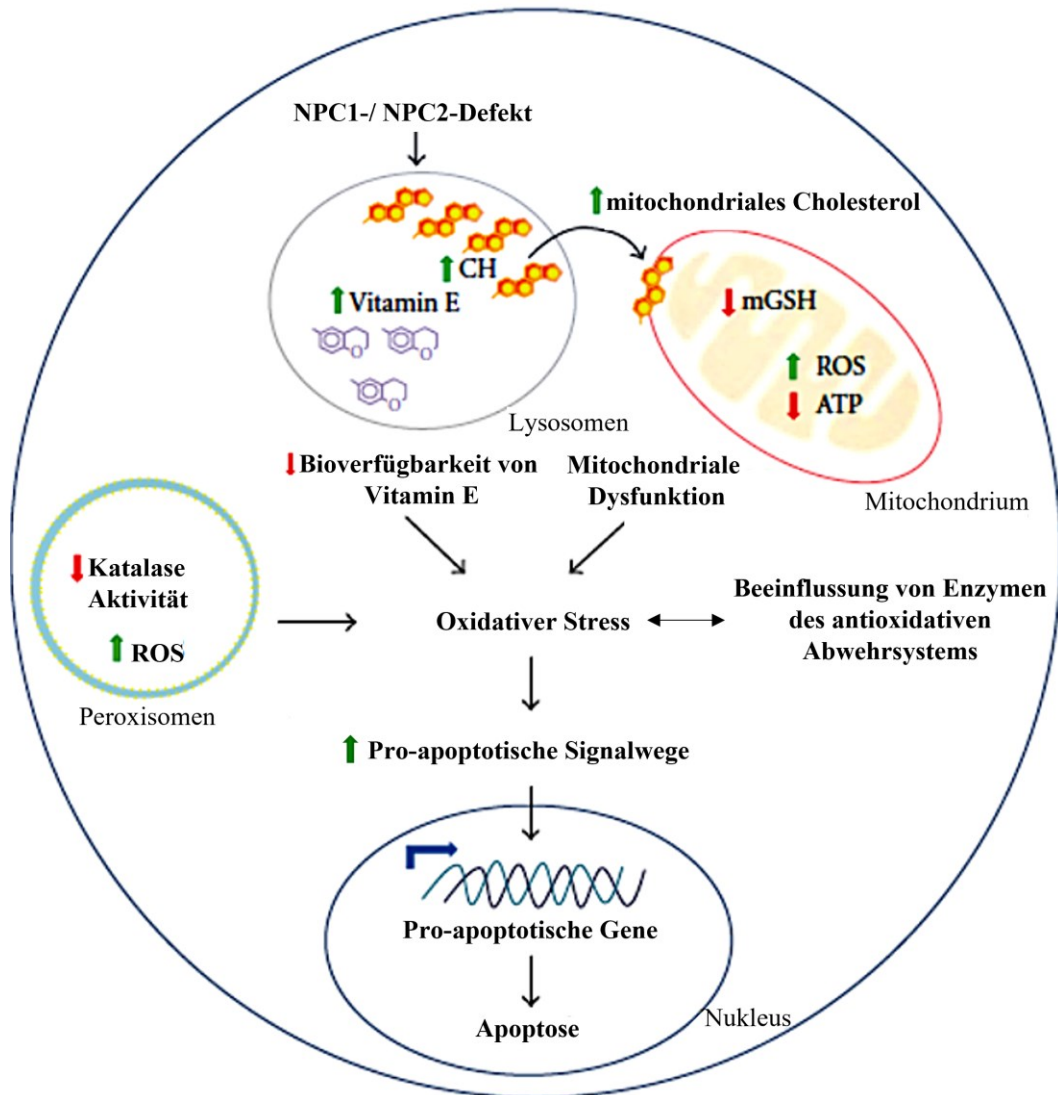
In neuronalen, murinen Zellen sind erhöhte ROS-Werte und eine gesteigerte Fraktion an Nitrotyrosin als direkte OS-Parameter zu sehen, die zur Oxidierung von Biomolekülen wie Proteinen führen. Ähnliche Ergebnisse zeigen Studien mit Hippocampi von Ratten, die mit U18666A behandelt wurden. U18666A induziert dabei als NPC1-Inhibitor den NP-C1-Phänotypen (Klein et al., 2011; Marín et al., 2014). Eine Ursache für die erhöhten Werte an reaktiven Spezies und somit für die neuronalen Beeinträchtigungen von NP-C sind Mitochondriendefekte. So konnten in neuronalen NPC-1-defizienten Mauszellen neben morphologischen Veränderungen auch ein reduziertes mitochondriales Membranpotential und eine verminderte ATP-Synthese als Folge von einer gestörten Atmungskette festgestellt werden (Yu et al., 2005). Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtungen ist auf die veränderte zelluläre Cholesterolumöostase zurückzuführen, die durch die Funktionsstörung des NPC1- oder NPC2-Proteins verursacht wird und zu einem erhöhten Cholesterolspiegel in der mitochondrialen Membran führt (Marí et al., 2006; Yu et al., 2005). Das geht zum einen mit einer direkten Erhöhung von ROS durch eine gestörte Atmungskette einher und zum anderen mit Transportstörungen von Glutathion als starkem zellulärem Antioxidans. So ist im murinen NPC-Modell ein reduziertes Niveau an mitochondrialem Glutathion (mGSH) zu detektieren (Torres et al., 2017). Eine verminderte Katalase-Aktivität und weitere Störungen der Funktionen von Peroxisomen verstärken diese Dysbalance zwischen Auf- und Abbau von reaktiven Spezies noch mehr (Schedin et al., 1997).

Als weitere Veränderung im antioxidativen Abwehrsystem weisen Erhöhungen der SOD1- und SOD2-Expression in Kleinhirnlisaten von NPC1<sup>-/-</sup>-Mäusen auf eine Kompensation von OS hin (Kennedy et al., 2013). Dieser kompensatorische Mechanismus könnte über den Nrf-2-ARE-Signalweg ablaufen, der im murinen NPC1-defizienten Modell ebenfalls gesteigert ist (Klein et al., 2011). Neben GSH stellt Vitamin E ein weiteres wichtiges Antioxidans der Zelle dar. In NP-C zeigt sich jedoch eine verminderte zytosolische Bioverfügbarkeit des lipophilen Vitamins durch eine Akkumulation in Lysosomen (Vázquez et al., 2012). Eine der beschriebenen Konsequenzen von OS ist die Apoptose, die mehrfach in in vivo Modellen von NP-C nachgewiesen

wurde (Alvarez et al., 2008; Klein et al., 2011; Wu et al., 2005). Des Weiteren erfolgte in verschiedenen in vitro Studien mehrfach der Nachweis von OS in NP-C. Neben erhöhten ROS-Werten in NPC1-defizienten Hefe- und Neuroblastomzellen sind auch bei NPC1-defizienten CHO-Zellen (chinesische Hamsterovazellen) Unterschiede im antioxidativen Abwehrsystem zu finden. Zum einen ist die SOD-Aktivität erhöht, zum anderen sind sowohl der GSH-Gehalt, als auch die Katalase-Aktivität vermindert (Dominko et al., 2020; Vilaça et al., 2014; Zampieri et al., 2009). Wie im NP-C-Mausmodell bereits herausgestellt wurde, ist der mitochondriale Cholesterolgehalt aufgrund einer Störung der Cholesterolhomöostase erhöht, was auch in NPC1-defizienten CHO-Zellen zu sehen ist. Dies könnte durch eine verminderte NPC1-Funktion in Lysosomen auf eine kompensatorische Erhöhung des Proteins *metastatic lymph node 64* (MLN64) zurückzuführen sein. Außerdem wird ein NPC1 unabhängiger Cholesteroltransport durch MLN64 und NPC2 von Lysosomen bzw. späten Endosomen zu Mitochondrien angenommen. Die dadurch entstehenden mitochondrialen Dysfunktionen führen zu OS (Balboa et al., 2017; Charman et al., 2010; Kennedy et al., 2014). Bei der Betrachtung von NP-C1-Patientenproben sind ähnliche Veränderungen des antioxidativen Abwehrsystems zu sehen. Liquorbestimmungen ergeben einen verminderten Gehalt an Glutathion-S-Transferase sowie eine erhöhte SOD1-Konzentration (Cologna et al., 2012).

Im Plasma einer Kohorte von 37 NP-C1-Patienten war eine reduzierte antioxidative Kapazität messbar mit einem Mangel an reduziertem Koenzym Q10 (Ubichinol), welches innerhalb der Atmungskette als Elektronen- und Protonenüberträger dient (Fu et al., 2010). Des Weiteren sind im Plasma von NPC1-Patienten vermehrt Lipidperoxidationen und Proteinoxidationen als Folge von OS beschrieben (Ribas et al., 2012). Das am häufigsten genutzte in vitro Modell umfasst von Patienten stammende Fibroblasten mit unterschiedlichen *NPC*-Mutationen. Hierin zeigen die NPC1-defizienten Fibroblasten erhöhte ROS-Niveaus sowie eine resultierende Oxidation von Lipiden (C. Chung et al., 2016; Zampieri et al., 2009). Wie auch in den anderen NP-C Modellen beobachtet, sind in Fibroblasten Veränderungen im antioxidativen Abwehrsystem zu sehen. Hierbei wird neben einer beeinträchtigten Expression von Genen, die mit einer erhöhten Produktion von ROS assoziiert sind, insbesondere eine verminderte Katalase-Aktivität beschrieben (Rauniyar et al., 2015; Reddy et al., 2006; Zampieri et al., 2009). Bezüglich NP-C2 sind bislang nur wenige Daten über OS vorhanden. Analog zu NP-C1 ist als Ausdruck von Störungen der Cholesterolhomöostase ein erhöhter Gehalt an mitochondrialem Cholesterol in NPC2-defizienten CHO-Zellen zu beobachten sowie eine Aktivierung des Nrf-2-ARE-Signalwegs (Kennedy et al., 2014), was eine kompensatorische Erhöhung von antioxidativen Enzymen zur Folge hätte. In NPC2<sup>-/-</sup>-human embryonic kidney- (HEK) Zellen sowie in den hier

verwendeten, NPC2-defizienten NDZs aus Patienten-spezifischen iPSC sind mitochondriale Veränderungen zu sehen (Liedtke et al., 2022; Y. H. Wang et al., 2018), ohne dass OS als dessen Folge direkt untersucht wurde.



**Abb. 5: Oxidativer Stress in NP-C**

Abgebildet sind potentielle Einflüsse auf die Entstehung von OS und dessen Folgen in einer NPC-defizienten Zelle. Dabei wird angenommen, dass das in Lysosomen akkumulierte Cholesterin zu Mitochondrien transportiert wird mit resultierenden, mitochondrialen Dysfunktionen. Weitere Einflüsse stellen die verminderte zytosolische Bioverfügbarkeit von Vitamin E und eine verminderte Katalase-Aktivität in Peroxisomen dar. Die erhöhten ROS-Werte führen konsekutiv zur Aktivierung von pro-apoptischen Signalwegen. Symbole: grüner ↑ zeigt = Erhöhung/ Aktivierung an; roter ↓ = Verminderung/ Inhibition. Modifiziert nach Vázquez et al., 2012.

## 1.4 Zielstellung

Im Morbus Niemann-Pick Typ C stellt oxidativer Stress einen essentiellen Faktor im Rahmen des pathophysiologischen Mechanismus dar. Trotz der Vielzahl der vorhandenen Studien zu dieser Thematik mit diversen Modellen liegen bisher nur wenige Studien vor, in denen NP-C-Patienten-spezifische Zellen verwendet wurden, ausgenommen der Fibroblasten. Insbesondere in humanen, neuronalen Zellmodellen wurden zum derzeitigen Kenntnisstand keine Untersuchungen des OS in NP-C unternommen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, verschiedene Merkmale von OS in neural differenzierten Zellen des NP-C sowie den Einfluss des zellulären antioxidativen Abwehrsystems zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk galt hierbei den Schlüsselenzymen: der Superoxid-Dismutase und der Katalase.

Diese Untersuchungen wurden aufgrund der pathophysiologischen Ähnlichkeiten sowohl für NPC1- als auch für NPC2-defiziente neurale Zellen durchgeführt.

Zudem wurden antioxidative Substanzen auf ihre Wirksamkeit, den OS zu senken und den zellulären Phänotyp des NP-C zu mildern, getestet. Flavonoide zählen zu potenten, exogenen Antioxidantien, die in vielfältigen Studien zu diversen Erkrankungen durch die Linderung von OS Vorteile lieferten. Somit wurden als potentielle therapeutische Strategie des NP-C im Hinblick auf OS die Flavonoide Quercetin und Kaempferol untersucht.

Für die Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden Veränderungen der ROS-Werte sowie die SOD-Aktivität bestimmt. Mithilfe des Western Blots erfolgte die Ermittlung der Proteinexpression von nitrierten Proteinen sowie der Enzyme SOD1, SOD2 und der Katalase, deren Expression ebenfalls mittels RT-qPCR auf Transkriptionsebene bestimmt wurde.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Nunc™ Safeflow 1.2 Sicherheitswerkbank, Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, DE) unter laminarem Luftstrom durchgeführt. Sämtliche Verbrauchsmaterialien wurden steril geliefert und wie auch alle anderen verwendeten Materialien vor Einbringen unter die Sicherheitswerkbank mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Mehrgebrauchsmaterialien aus hitzebeständigem Glas oder Plastik sowie Flüssigkeiten wurden vor dem Gebrauch durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung der Zellen stets unter Zugabe von 0,5 % Penicillin/ Streptomycin (Tab. 7, siehe Anhang S. XV). Jegliche Medien wurden vor dem Gebrauch in der Zellkultur im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte stets in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 20 % O<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit. Soweit nicht anders angegeben, sind sämtliche Materialien in den Tab. 7, Tab. 8 und Tab. 13 (Anhang, S. XV, XVII, XXI) aufgelistet.

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit genutzten, neural differenzierten Zellen (NDZs) entwickeln sich aus neuronalen Progenitorzellen (NPZs), die aus Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) abstammen. Der Prozess der viralen Reprogrammierung Patientenspezifischer Fibroblasten zu iPS sowie die Aufreinigung nach dem neuronalen Oberflächenmarker PSA-NCAM<sup>+</sup> (Polysialylated-neural cell adhesion molecule) erfolgte im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe „Zelluläre Neurophysiologie“ der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“. Die Charakterisierung der verwendeten Zelllinien ist in Peter, Trilck, et al. (2017), Trilck et al. (2013, 2016) und in Völkner et al. (2019) zu finden. Durch eine Kultivierung im Proliferationsmedium (Tab. 2), das die Wachstumsfaktoren EGF und FGF2 enthält, wurden die NPZs als Dauerkultur im Stadium mit hoher Proliferationsrate gehalten. Durch Entzug der Wachstumsfaktoren für mindestens 40 Tage erfolgte eine Differenzierung zu NDZs, wobei alle drei Tage ein Wechsel des Differenzierungsmediums (Tab. 2) erfolgte. In Tab. 1 sind die verwendeten Zelllinien der NDZs zu finden, wobei eine Kontrolle und 3 *NPCI*-Mutanten sowie eine *NPC2*-Mutante verwendet wurde. Die unterschiedlichen *NPCI*-Mutationen wurden als Mutation A (Mut A) für c.3182 T>C, Mutation B (Mut B) für c.1836 A>C/ c.1628 delC und Mutation C (Mut C) für c.1180 T>C benannt. Des Weiteren wurde die verwendete *NPC2*-Mutation mit NPC2 abgekürzt.

**Tab. 1: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Erkrankung	Mutation	Protein	Spenderalter/ Geschlecht
<b>Kontrolle</b>	-	-	-	8 Jahre/ männlich
<b>Mutation A (Mut A)</b>	NP-C1	c.3182 T>C	p. I1061T	unbekannt/ männlich
<b>Mutation B (Mut B)</b>	NP-C1	c.1836 A>C/ c.1628 delC	p. E612D/ p. P543Rfs*20	1 Jahr/ männlich
<b>Mutation C (Mut C)</b>	NP-C1	c.1180 T>C	p. Y395H	unbekannt/ männlich
<b>NPC2</b>	NP-C2	c.58 G>T/ c.140 G>T	p. E20X/ p. C47F	unbekannt/ männlich

**Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Sheridan -GF (Differenzierungsmedium)</b>	60 % DMEM 40 % DMEM/F-12 0,5 % Penicillin/Streptomycin 1x B27
<b>Sheridan+GF (Proliferationsmedium)</b>	Sheridan -GF 20 ng/ml FGF2 20 ng/ml EGF
<b>Phenolrotfreies Medium</b>	Phenolrotfreies DMEM (1X) 1 mM Pyruvat 1 % Penicillin/ Streptomycin

### 2.1.2 Kultivierung und Differenzierung der neuralen Progenitorzellen

Alle verwendeten Zellkulturplatten wurden zuvor mit Poly-L-Ornithin (PLO) und Laminin beschichtet. Diese extrazellulären Matrixbestandteile erleichtern die Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturplatten. Für die Beschichtung wurden 1 ml/ 6-Well und 0,5 ml/ 24-Well PLO (15 µg/ml in PBS<sup>-/-</sup>) zugefügt mit einer folgenden Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur (RT). Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe der Zellkulturplatten mit PBS<sup>-/-</sup>,

woraufhin die Platten mit 1 ml/ 6-Well und 0,5 ml/ 24-Well Laminin (10 µg/ml kaltem DMEM/F-12) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Bis zur anschließenden Verwendung in der Zellkultur wurden die Zellkulturplatten bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im CO<sub>2</sub>-Inkubator auf 37 °C aufgewärmt.

### **Auftauen und Kultivierung der neuralen Progenitorzellen**

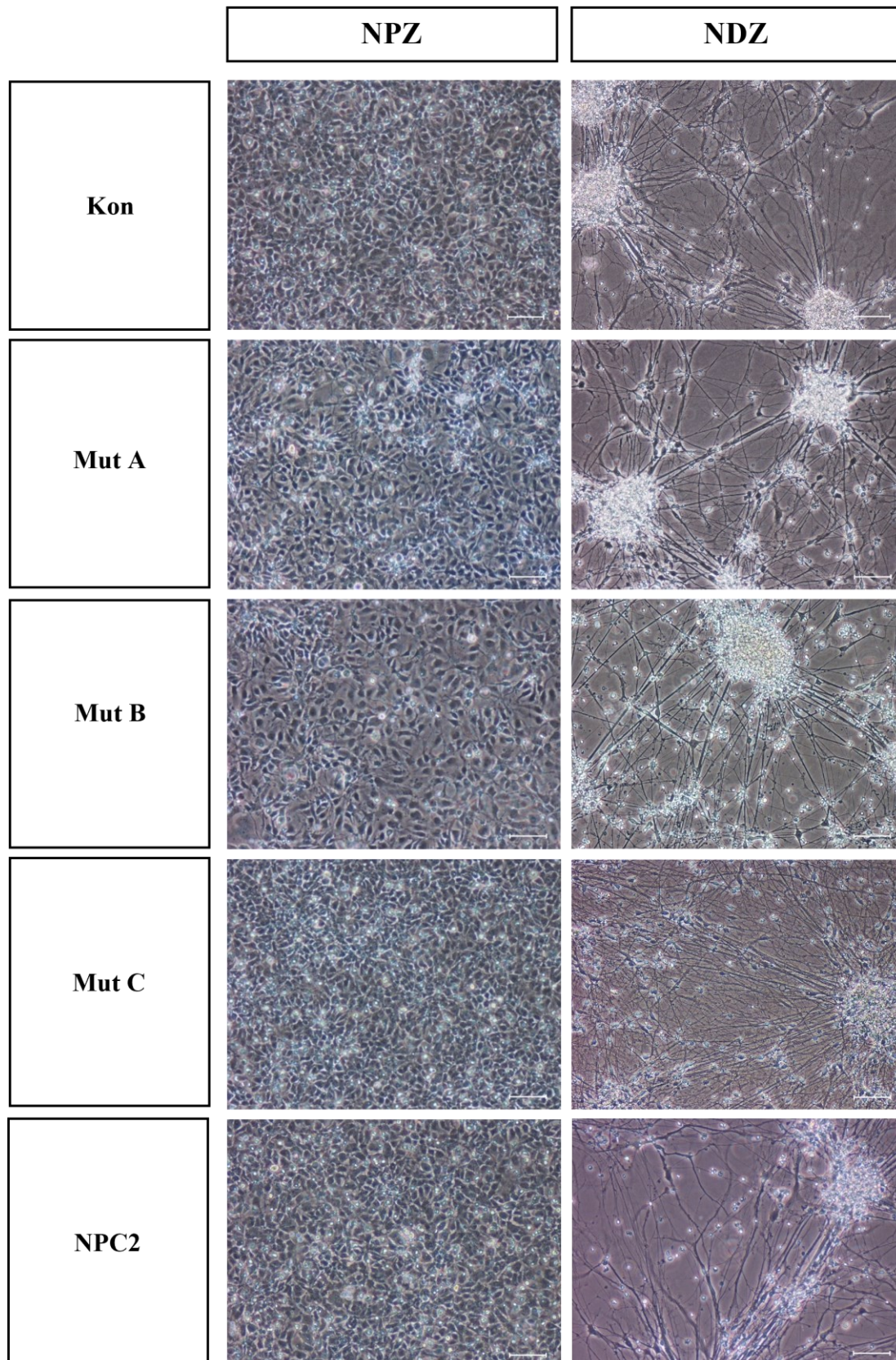
Jeweils zwei Millionen der NPZs wurden bis zur weiteren Verwendung in 1,7 ml Proliferationsmedium mit 10 % DMSO gelöst und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, was als Kryokonservierung bezeichnet wird. Nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen für drei Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und anschließend tröpfchenweise zu den bereits vorgelegten 9 ml Proliferationsmedium in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt der Zellsuspension mit 300 x g für fünf Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet erneut in 1 ml Proliferationsmedium gelöst. Die Zellzählung erfolgte durch Zugabe von 50 µl der Zellsuspension in 10 ml CASY<sup>®</sup>ton (Roche, Mannheim, DE) mit anschließender Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter mithilfe des Zellzählers CASY<sup>®</sup> (Roche, Mannheim, DE). Für die Dauerkultur wurden pro 6-Well-Zellkulturplatte eine Million Zellen ausgesät und bis zur weiteren Verwendung im CO<sub>2</sub>-Inkubator gelagert. Beim Erreichen einer Konfluenz von 95-99 % wurden die NPZs zum einen weiter als Dauerkultur passagiert und zum anderen zur Differenzierung ausgesät (Abb. 6). Nach einem initialen Waschschrift mit 1 ml HBSS wurden die Zellen mit 0,5 ml Accutase bei 37 °C für drei bis fünf Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgten ein Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit 1 ml Proliferationsmedium sowie der zuvor beschriebene Zentrifugationsschritt mit anschließender Zellzählung. Anhand der ermittelten Zellzahl wurden erneut NPZs in Proliferationsmedium als Dauerkultur ausgesät. Die NPZs wachsen als adhärenente, kleine Zellen flächig am Boden der Zellkulturplatten. Als Zeichen der hohen Proliferationsrate fällt bei Betrachtung der NPZs ein großer Zellkern mit mehreren Nukleoli auf. Für die neurale Differenzierung erfolgte die Aussaat der Progenitorzellen in Differenzierungsmedium. Die jeweils verwendeten Zellzahlen für die Aussaaten sind der Tab. 3 zu entnehmen. Nach mindestens 40 Differenzierungstagen liegt eine Mischkultur aus Neuronen und Gliazellen vor (Liedtke, Völkner & Jürs et al., 2021; Trilck et al., 2017). Auffällig ist, dass die Zellkörper der Neurone klein sind und sich zu Sphären zusammenlagern. Durch die vielen dünnen Ausläufer weisen diese eine hohe Interkonnektivität auf. Die Gliazellen sind durch Abgabe von trophischen Faktoren wichtig für die Neurone, insbesondere für die Differenzierung dieser. (Giulian et al., 1993) Diese lassen sich durch einen größeren, flächigen Zellkörper mit dickeren Ausläufern im Vergleich zu Neuronen erkennen und liegen unter diesen. Zum Teil sind weiße, kleine Punkte



auf der Zellkultur zu sehen, die tote Zellen darstellen, ohne dass Unterschiede der Viabilität zwischen Zelllinien gemacht werden können. In Abb. 6 ist die typische Morphologie der NPZs und NDZs aller verwendeten Zelllinien anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen. Hierbei sind keine morphologischen Unterschiede zwischen der Kontrolle und den *NPC*-Mutanten auszumachen. Die nach 40 Differenzierungstagen entstandenen NDZs wurden im Anschluss für die jeweiligen Experimente geerntet, wobei Passagen zwischen acht und einundzwanzig gewählt wurden.

**Tab. 3: Aussaat-Schema**

<b>Kulturgefäß</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Zellzahl/ Well</b>	<b>Medium</b>
6-Well Platte	Dauerkultur	$1,0 \times 10^6$	Proliferationsmedium
6-Well Platte	Differenzierung	$0,4 \times 10^6$	Differenzierungsmedium
24-Well Platte	Differenzierung	80.000	Differenzierungsmedium



**Abb. 6: Morphologie der NPZs und NDZs der verwendeten Zelllinien**

In der Abbildung sind repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien dargestellt, wobei auf der linken Seite die NPZs und auf der rechten Seite die NDZs zu erkennen sind. Oben ist die Kontrolle zu sehen, gefolgt von den *NPC1*-Mutanten sowie einer *NPC2*-Mutante im untersten Bereich. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

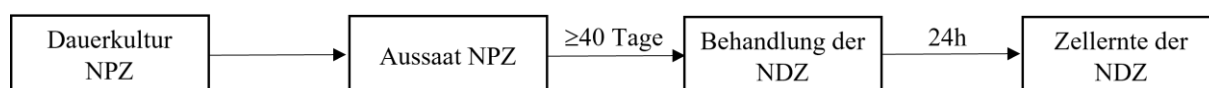
### 2.1.3 Behandlung der NDZs mit Testsubstanzen

Nach einer Differenzierungszeit von mindestens 40 Tagen erfolgte eine Behandlung der NDZs mit den Testsubstanzen Kaempferol und Quercetin, die entsprechend ihrer Molekularmassen in DMSO gelöst wurden (Tab. 4).

**Tab. 4: Verwendete Testsubstanzen**

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
<b>Kaempferol</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, US	60010
<b>Quercetin</b>	Sigma Aldrich, St. Louis, US	Q4951

Durch Literaturrecherche erfolgte eine Auswahl von Konzentrationen der Flavonoide, wobei 75  $\mu\text{M}$  und 150  $\mu\text{M}$  bei Quercetin und 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  bei Kaempferol verwendet wurde (Chatterjee & Mustak, 2018; Costa et al., 2016; X. Li et al., 2013). Hierbei wurden die Stammlösungen der Testsubstanzen auf die entsprechenden Konzentrationen im Differenzierungsmedium verdünnt, sodass mindestens eine 1:1000 Verdünnung vorhanden war. Die Behandlungsdauer wurde entsprechend der Literatur für beide Substanzen auf 24 Stunden festgelegt (Bao et al., 2017; Guo et al., 2017; Jembrek et al., 2018; Kumar et al., 2016). Als Kontrolle wurde stets eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Nach 24 Stunden wurde die jeweilige Testsubstanz durch einen Waschschrift entfernt und für die entsprechenden Experimente geerntet. Der schematische Ablauf der Zellkultivierung bis zur Zellernte wird anhand der Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7: Kultivierung und Behandlungsschema der Zelllinien**

Aus der NPZ Dauerkultur erfolgte eine Aussaat von NPZs. Nach mindestens 40 Tagen Differenzierung wurden die entstandenen NDZs für 24 Stunden mit den Testsubstanzen oder DMSO behandelt. Im Anschluss erfolgte die Ernte für die jeweiligen Experimente

## 2.2 Western Blot

Zur Detektion von Proteinen wurde die Western Blot Methode verwendet. Mithilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte eine Auftrennung des in dem Gesamtzelllysat vorhandenen Proteingemisches nach Molekülmasse mit anschließender Transferierung auf eine Nitrocellulose-Membran. Die Densitometrie diente als Mittel zur semiquantitativen Erfassung des Zielproteingehalts. Die verwendeten Materialien und Lösungen sind in den Tab. 7, Tab. 8, Tab. 11, Tab. 12 und Tab. 13 (Anhang, siehe S. XV, XVII, XIX, XXI) zu finden, sofern nicht anders angegeben.

### **Zellernte**

Um aus den in 6-Well-Zellkulturplatten kultivierten NDZs ein Gesamtzelllysate herzustellen, wurden diese zunächst mit 0,5 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Zum Ablösen der Zellen erfolgte eine Behandlung mit 0,5 ml Accutase (5 min; 37 °C), die mit 1 ml Differenzierungsmedium abgestoppt wurde. Nach anschließender Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden die Zellen abzentrifugiert (15000 x g; 5 min; RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 0,5 ml PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert mit einem folgenden Zentrifugationsschritt (15000 x g; 5 min; RT). Nach Absaugen des Überstandes und einer Resuspendierung in 70 µl RIPA-Puffer zum Lysieren der Zellen wurden diese auf Eis schüttelnd für 30 Minuten inkubiert. Das Zelllysate wurde nochmals zentrifugiert (15000 x g; 25 min; 4 °C), wobei der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert wurde.

### **Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Gesamtzelllysats erfolgte nach Smith et al. (P. K. Smith et al., 1985) mithilfe von Bichininon-4-Carbonsäure (BCA), wofür das Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc. Waltham, US) verwendet wurde. Das Prinzip dieser Proteinbestimmung beruht auf zwei chemischen Reaktionen, die durch Komplexbildung zwischen dem Protein und Kupferionen mit einem deterministischen Farbverlauf enden. Dieser wird im Anschluss photometrisch nachgewiesen.

Zur Proteinbestimmung wurde das Zelllysate auf Eis aufgetaut und in einer 1:3 Verdünnung mit destilliertem, autoklaviertem H<sub>2</sub>O in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Es wurden 10 µl der Probenverdünnung in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Zur Quantifizierung des Proteingehalts wurde durch Verdünnung der im Kit enthaltenen BSA-Stammlösung (2 mg/ml) mit H<sub>2</sub>O eine BSA-Standardreihe angefertigt. Hierfür wurden die Abstufungen 0,0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml vorgenommen. Im Anschluss erfolgte eine Anfertigung einer Verdünnung des BCA-Reagenzes von Komponente A und B im Verhältnis 50:1, wobei jeweils 200 µl/ 96-Well dieser Lösung zugefügt wurden. Nach einer Inkubation auf einem Schüttler im Dunkeln (30 min; 37 °C) erfolgte eine Messung der 96-Well Platte anhand der Absorption bei 562 nm mit dem Plattenlesegerät Spark<sup>®</sup> unter Verwendung der Software SparkControl magellan (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) für die Proteingehaltsbestimmung.

### **SDS-PAGE und Western Blot**

Anhand des zuvor bestimmten Proteingehalts wurden die Zelllysate auf die gleiche Proteinmassenkonzentration mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O verdünnt. Zusätzlich erfolgte zu den verdünnten Zelllysaten ein Zusatz von 5x Laemmli-Puffer im Verhältnis 1:5. Das Probengemisch wurde im Anschluss bei 95 °C schüttelnd für 5 Minuten erhitzt. Im weiteren Verlauf wurde das Probengemisch zentrifugiert (22.000 x g; 1 min; 4 °C) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Mithilfe der SDS-PAGE wurden die Proteine des Proteingemischs anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt, wobei die Beweglichkeit der Proteine in dem Gel proportional zu dem Logarithmus der Molekülmasse ist. Für die Auftrennung wurden Criterion<sup>TM</sup> Precast Gele (4-15 % TRIS-HCl, 18 Wells, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) verwendet, die in die passenden Elektrophoresekammern Criterion<sup>TM</sup> Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) eingesetzt wurden und mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer als Laufpuffer gefüllt wurden. Die Taschen des Gels wurden mit 25 µl des zuvor zubereiteten Proteingemischs gefüllt, wobei als Laufkontrolle 2 µl des Proteinmarkers (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Xtra Standard, 2-250 kDa) mitgeführt wurde. An dem PowerPac-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) erfolgte ein Anschluss einer Spannung von 100 mV über fünf Minuten mit folgenden 300 mV über 30 Minuten. Für den anschließenden Proteintransfer wurden die aufgetrennten Proteinbanden von dem SDS-Gel über das semidry-Blotverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, München, DE) und die Trans-Blot Turbo Midi Nitrocellulose Transfer Packs (Bio-Rad, München, DE) genutzt. Nach Herausnahme des Gels aus der Kammer wurde das sogenannte Western Blot-Sandwich erstellt und die einzelnen Bestandteile in folgender Reihenfolge auf die Anode der Blot-Kassette gelegt: Gel-Blotting-Papier, Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel und erneut Gel-Blotting-Papier. Durch Auflegen der Kathode wurde die Kammer verschlossen und ein elektrisches Feld angelegt (7 min; 2,5 A; 25 V).

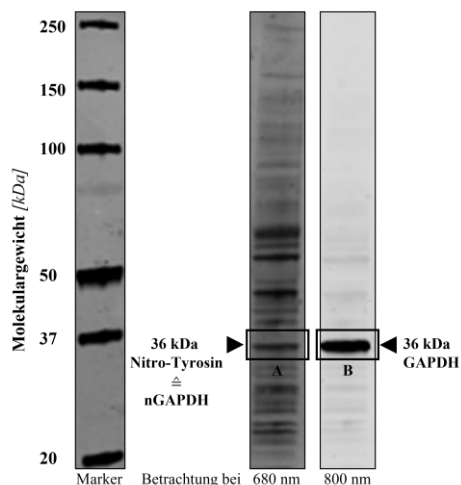
### **Immundetektion der Proteinbanden**

Mithilfe der Immundetektion wurden die Nitrotyrosinreste der verschiedenen Proteine nachgewiesen sowie die Proteine SOD1, SOD2, Katalase, als auch β-Aktin und GAPDH. Die verwendeten Antikörper inklusive der verwendeten Verdünnungen sind in den Tab. 9 und Tab. 10 (Anhang, siehe S. XVIII, XIX) aufgelistet und wurden alle in 3 % BSA verdünnt.

Initial erfolgte ein Waschschrift der Nitrocellulosemembran mit 1x TBS für 5 Minuten. Um freie unspezifische Proteinbindungsstellen zu blocken, wurde die Membran in 5 % BSA (gelöst in TBST) leicht schüttelnd inkubiert (1 h; RT). Über Nacht erfolgte bei 4 °C leicht schüttelnd

eine Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern. Nach den darauffolgenden, dreimaligen Waschschritten in TSBT für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Membran mit dem Primärantikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder  $\beta$ -Aktin auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBST bei RT leicht schüttelnd für jeweils fünf Minuten gewaschen, um folgend eine Beladung mit den Sekundärantikörper (Tab. 10) vorzunehmen (1 h; RT; im Dunkeln). Abschließend erfolgten drei Waschschrritte mit TBST (5 min; RT) und ein Waschschrtritt mit TBS (5 min; RT). Im Anschluss wurde die Membran bis zur Detektion mittels Fluorimeter zum Trocknen im Dunkeln auf Whatman Paper gelegt.

Die durch Antikörper markierten Proteinbanden wurden mit Hilfe des Fluorimeters Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System (LI-COR<sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, US) detektiert. Dabei betrug die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der Sekundärantikörper gegen die jeweils genannten Proteine wie folgt: Kanal 800 gegen  $\beta$ -Aktin 2,0 und gegen Nitrotyrosin 4,0; Kanal 700 gegen SOD1 2,5, gegen SOD2 3,0, gegen Katalase 4,0 und gegen GAPDH 1,0. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Programm Odyssey<sup>®</sup> Infrared Imaging System-Application Software (Version 1.2.15, Li-COR<sup>®</sup> Biosciences, Lincoln, US). Für die Analyse der Proteine SOD1, SOD2 und Katalase wurde die Expression von  $\beta$ -Aktin als Normierung verwendet. Für die Western Blots mit Nitrotyrosin wurde das Verhältnis von nitrierten Proteinen berechnet, die sich auf der 18 oder 22 kDa (nSOD) Bande bzw. auf der 36 kDa (GAPDH) Bande befanden, unter Betrachtung bei einer Wellenlänge von 680 nm, und der SOD1 bei 18 kDa, SOD2 bei 22 kDa oder GAPDH bei 36 kDa, unter Betrachtung bei einer Wellenlänge von 800 nm (Abb. 8).



**Abb. 8: Beispiel eines Western Blots gegen nitrierte Proteine**

Zur Bestimmung des nitrierten Anteils eines Proteins wurde das Verhältnis gebildet aus der Intensität des nitrierten Anteils bei einer Wellenlänge von 680 nm des untersuchten Proteins (A), hier bei 36 kDa für nGAPDH, und der Intensität des Proteins bei einer Wellenlänge von 800 nm (B). Somit ist  $A/B = x$ , wobei  $x$  das aufgetragene Ergebnis in den Balkendiagrammen widerspiegelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel einer Färbung mit Nitro-Tyrosin und GAPDH der Zelllinie Mut B.

### 2.3 Aktivitätsbestimmung der Superoxid-Dismutase

Die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert als Teil des enzymatischen, oxidativen Abwehrsystems einer Zelle die Dismutation von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) (Löffler et al., 2007). Der Nachweis der Superoxid-Dismutase dient der indirekten Aktivitätsbestimmung der SOD.

Das Prinzip der Messung beruht auf einer WST-1-(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) Formation mit einer anschließenden kolorimetrischen Messung.

Durch das Zufügen von Xanthinoxidase (XO), die die Reaktion zwischen zwei Sauerstoffmolekülen ( $O_2$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) katalysiert, kommt es zu einer Anreicherung von Superoxidanionen. Diese reagieren über eine Reduktion des WST-1 zu einem wasserlöslichen WST-1-Formazanfarbstoff und zwei molekularen Sauerstoffmolekülen. Die WST-1-Formazanproduktion ist proportional zu der XO-Aktivität. Dabei erfolgt eine kompetitive Inhibierung der WST-1-Reduktion durch die SOD über die zuvor beschriebene Reaktion der Superoxidanionen. Dadurch können über eine folgende Absorptionsmessung Rückschlüsse auf die SOD-Aktivität gezogen werden. Die verwendeten Materialien, Kits und Puffer sind sofern nicht anders angegeben in den Tab. 8, Tab. 11, Tab. 12 und Tab. 13 (Anhang, siehe S. XVII, XIX-XXI) verzeichnet.

#### Zellernte zur Herstellung des Zelllysats

Zur Herstellung eines Zelllysats aus den in 6-Well-Zellkulturplatten differenzierten NDZs wurden diese zunächst dreimal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200  $\mu$ l des SOD-Lysepuffers in die 6-Well-Zellkulturplatten und eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis schüttelnd. Nach dem Ablösen der Zelltrümmer mit einem Zellschaber wurden diese in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte dreimalig die sogenannte freeze-and thaw-Methode, wobei die Zelltrümmer zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden, um darauffolgend in einem Wasserbad bei Raumtemperatur erneut aufzutauen. Durch zehn Ultraschallimpulse (560 W, 1 x pro Sekunde) wurde das Zelllysats abschließend aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt (14.000 x g; 25 min; 4 °C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben konnten an dieser Stelle bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C eingefroren werden.

### Durchführung und Auswertung der SOD-Aktivitätsbestimmung

Für den SOD-Assay wurde das SOD-Determination Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, US) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurden 20 µl der jeweiligen Proben in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte vorgelegt und am Ende 20 µl der XO-Enzymlösung hinzugefügt. Diese zuvor hergestellte Arbeitslösung setzte sich zusammen aus 6 µl Stammlösung der enzyme solution und 1 ml des Dilution Buffers. Zur späteren Berechnung erfolgte die Messung des Basiswertes der Superoxidanionen in der Probe in Doppelbestimmung, im Folgenden als blank 2 bezeichnet. Dafür wurden 20 µl der Probe mit 20 µl Dilution Buffer aus dem verwendeten Kit verdünnt. Des Weiteren erfolgte eine Bestimmung des maximalen (blank 1) und minimalen (blank 3) Umschlags der WST-1-Formation in Doppelbestimmung. Hierfür wurden jeweils 20 µl destilliertes, autoklaviertes H<sub>2</sub>O in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Zusätzlich wurden 20 µl der XO-Enzymlösung zu dem blank 1 und 20 µl des Dilution Buffers zu dem blank 3 hinzugegeben. Sowohl zu den Proben als auch zu den Basiswerten blank 1, 2 und 3 wurden 200 µl der WST-1-Arbeitslösung hinzugefügt, die zuvor durch eine 1:20 Verdünnung der WST-1-Stammlösung mit der Buffer Solution aus dem Kit hergestellt wurde. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Dunkeln bei 37°C auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 450 nm mit einer initialen Schüttelzeit von drei Sekunden mit dem Plattenlesegerät Spark<sup>®</sup> gemessen unter Verwendung der Software SparkControl magellan (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH). Zur Normierung der SOD-Aktivität wurde eine Proteinbestimmung entsprechend der Angaben unter Western Blot (Kapitel 2.2) durchgeführt.

Da wie oben beschrieben durch die SOD die WST-1-Formation inhibiert wird, kann die Inhibitionsrate berechnet und mit der SOD-Aktivität gleichgesetzt werden. Für die Berechnung der SOD-Aktivität wurde die Formel laut Herstellerangaben verwendet, die wie folgt lautet:

$$\text{SOD-Aktivität (Inhibitionsrate \%)} = [(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{Probe}} - A_{\text{blank2}})] / (A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) \times 100$$

Anschließend wurde die SOD-Aktivität auf die Proteinmenge der Probe normiert.

### 2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt eine Analyse von Zellen nach Größe, Komplexität und Färbung einer Zelle. Die hierfür verwendeten Materialien und Kits sind in den Tab. 7, Tab. 8, Tab. 11 und Tab. 13 (Anhang, siehe S. XV-XIX, XXI) zu finden.

Für die Durchflusszytometrie erfolgte die Zellernte der NDZs, nachdem diese mit 1 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen wurden, mithilfe von 0,5 ml Accutase, die eine enzymatische Ablösung der Zellen bewirkt (3-5 min; 37 °C; im Dunkeln). Die Reaktion wurde mit 1 ml des phenolrotfreien Mediums abgestoppt und die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einem



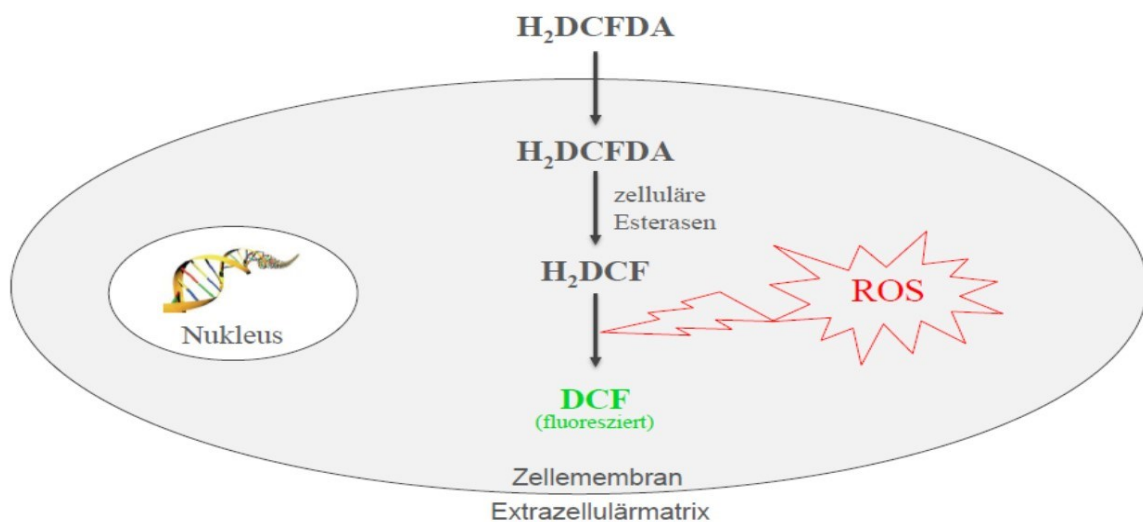
Zentrifugationsschritt (300 x g; 5 min) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500  $\mu$ l warmen PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert, um das restliche Medium zu eliminieren.

Direkt nach der Zellernte wurden die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt und in ein Rundbodenröhrchen überführt. Es wurden stets 50.000 Zellen mithilfe des Durchflusszytometers FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, DE) in Kombination mit der dazugehörigen Software CellQuest Pro (Becton Dickinson, Heidelberg, DE) gemessen. Die Analyse wurde mittels FCSalyzer 0.9.18-alpha (Mostböck, Wien, AT) durchgeführt.

### DCFDA-Assay

Der DCFDA-Assay wurde zur direkten Detektion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verwendet. Das Prinzip dieser Lebendfärbung ist in Abb. 9 dargestellt.

Hierbei diffundiert das Zell-permeable Reagenz H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-Dichlorfluorescein Diacetat) in die Zelle und wird von zelleigenen Esterasen deacetyliert. Im Anschluss erfolgt eine Oxidation des DCFDAs durch ROS, wodurch der fluoreszierende Farbstoff DCF (2',7'-Dichlorfluorescein) entsteht. Dieser wird bei einer Exzitationswellenlänge von 495 nm und Emissionswellenlänge von 529 nm mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.



### Abb. 9: Prinzip des DCFDA-Assays

H<sub>2</sub>DCFDA diffundiert in die Zelle und wird durch zelluläre Esterasen zu H<sub>2</sub>DCF deacetyliert. Durch die Oxidation durch ROS entsteht der fluoreszierende Farbstoff DCF.

Der DCFDA-Assay wurde mit dem DCFDA-Cellular ROS-Detection Assay Kit (Abcam, Cambridge, GB) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Im Vorfeld wurden die NDZs mit Testsubstanzen bzw. DMSO für 24 Stunden behandelt. Nach zwei Waschvorgängen mit 1 ml des auf 37 °C angewärmten PBS<sup>-/-</sup> erfolgte die Färbung der Zellen mit 700  $\mu$ l/ 6-Well-Zellkulturplatte mit 0,625  $\mu$ M DCFDA-Reagenz, das aus einer 20 mM Stammlösung durch Zugabe zu phenolrotfreiem Medium (Tab. 2) hergestellt wurde. Für

die Beladung der Zellen wurden diese 5 Minuten im Inkubator bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Als Negativkontrolle wurden stets nicht mit DCFDA beladene Zellen mitgeführt. Daraufgehend wurden die NDZs zweimal mit warmen PBS<sup>-/-</sup> gewaschen.

Für die durchflusszytometrische Analyse erfolgten die Zellernte und die Messung wie oben beschrieben mit einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm. Anhand der mitgeführten Negativkontrolle erfolgte die Festlegung einer Grenze für jede Zelllinie, in der sich ca. 99 % der Zellpopulation befinden. Die fluoreszierenden Zellen wurden hierbei als positive Zellen bezeichnet und liegen außerhalb der zuvor gesetzten Grenze, wobei sie in Prozent der Gesamtpopulation angegeben wurden.

### **Doppelfärbung der NDZs mit DCFDA und Propidiumiodid (PI)**

Die Färbung mit Propidiumiodid (PI) diente zur Abgrenzung von nicht-vitalen Zellen innerhalb des DCFDA-Assays. PI ist ein Nukleinsäureinterkalator, der nur durch perforierte Zellmembranen gelangen kann, wie sie im Rahmen von apoptotischen bzw. nekrotischen Zellprozessen auftreten (Sidhartha und George, 2009). Wie oben beschrieben erfolgte die Durchführung des DCFDA-Assays inklusive der Zellernte. Für die Färbung mit PI wurde aus der 1,5 mM Stammlösung mit einer 1:1000 Verdünnung eine 1,5 µM Arbeitslösung hergestellt, die der Zellsuspension zugesetzt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Zellsuspension für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte mit einer Extinktion von 493 nm und einer Emission von 585 nm. Für die Analyse wurden PI negative und DCF-positive Zellen als ROS-positiv definiert.

## **2.5 Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)**

Für die Quantifizierung der mRNA-Transkripte wurde der LightCycler Nano (Roche, Mannheim, DE) in Kombination mit der LightCycler Nano 1.1 Software oder der Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, DE) und die Rotor-Gene Q Series Software Version 2.3.1 genutzt. Die verwendeten Materialien und Kits sind in den Tab. 7, Tab. 8, Tab. 11 und Tab. 13 (Anhang, siehe S. XV, XVII, XIX, XXI) verzeichnet.

### **Ernte und cDNA-Herstellung**

Die Ernte und die RNA-Isolation der NDZs aus 6-Well Platten nach mindestens 40 Differenzierungstagen erfolgte mit dem Quick-RNA<sup>TM</sup> Mini-Prep Kit (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE), welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Die Ernte erfolgte nach zwei Waschvorgängen mit 0,5 ml Accutase für 5 Minuten bei 37 °C, wonach die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Differenzierungsmedium (Tab. 2) gestoppt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS<sup>-/-</sup> folgte die RNA-Isolation. Alle

folgenden Schritte wurden mit gestopften Spitzen durchgeführt, um jegliche Kontamination zu vermeiden.

Das Zellpellet wurde in 300 µl RNA-Lysepuffer resuspendiert. Zur Entfernung der gDNS erfolgte nach Zentrifugation die Überführung des Überstands in einen Spin-Away™ Filter in einem Reaktionsgefäß, das erneut zentrifugiert wurde. Nach Zugabe einer Mischung aus Ethanol und RNA-Lysepuffer im Verhältnis 1:1 zu der Probe wurde das Gemisch in eine Zymo-Spin™ Säule in einem Reaktionsgefäß transferiert und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang der Säule mit 400 µl RNA-Waschpuffer. Nach Zentrifugation wurden 80 µl der DNase-Reaktionsmischung, bestehend aus 5 µl DNase I und 75 µl DNase-Verdauungspuffer, der Säule zugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Säule zunächst mit 400 µl RNA-Prep Puffer, dann mit 700 µl RNA-Waschpuffer und zuletzt mit 400 µl RNA-Waschpuffer gespült mit jeweils einem Zentrifugationsschritt dazwischen. Nach einem Transfer der Säule in ein RNA-freies PCR-Reaktionsgefäß wurden 50 µl DNase- und RNase-freies H<sub>2</sub>O zu der Säule zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation konnte die RNA direkt verwendet oder bei -80 °C eingefroren werden.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration des entstandenen Lysates wurde das Plattenlesegerät Spark® (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) mit der Software SparkControl magellan (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) verwendet. Das Zelllysat mit frei vorliegender RNA wurde in ein RNA-freies PCR-Reaktionsgefäß transferiert und kann bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C eingefroren werden.

Das Auftauen der Proben mit der dort enthaltenen, instabilen RNA für die Produktion von cDNA erfolgte auf Eis und zur Elimination genomischer DNS wurde ein Lysat hergestellt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, DE) nach Herstellerangaben.

Dabei wurde ein Gemisch aus gDNS-Wipeout-Puffer, RNase-freiem H<sub>2</sub>O und der RNA enthaltenden Probe hergestellt, sodass die RNA-Konzentration 500 ng/µl betrug. Das Lysat wurde für 5 Minuten bei 42 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt.

Die reverse Transkription erfolgte durch Herstellung eines Mastermixes, der sich wie folgt zusammensetzt: 0,5 µl Quantiscript® Reverse Transkriptase, 2 µl Quantiscript® RT-Puffer, 0,5 µl RT Primermix und 7 µl des zuvor hergestellten Lysates. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Gemisch für 30 min bei 42 °C inkubiert. Zum Inaktivieren der reversen Transkription erfolgte im Anschluss eine zweite Inkubation bei 95 °C für 5 min, gefolgt von einer zweiminütigen Kühlung auf Eis. An dieser Stelle können die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverwendet werden.

### Primervalidierung und Messung der mRNA-Menge

In der Tab. 5 sind die verwendeten Primer mit ihren jeweiligen Sequenzen und der Anlagerungstemperatur verzeichnet, wobei alle Primer von Eurofins Genomtic (Ebersberg, DE) bezogen wurden.

**Tab. 5: Primerliste für die RT-qPCR**

Primer	Sequenz 5'→3'	Anlagerungs- temperatur	Quelle
<b>Katalase</b>	fw: TTCCCAGGAAGATCCTGAC	56 °C	Ni et al., 2013
	rw: ACCTTGGTGAGATCGAATGG		
<b>SOD 1</b>	fw: AGGCCCTTAACATCATCT	55 °C	Ni et al., 2013
	rw: CTACAGGTACTTTAAAGCAACTCT		
<b>SOD 2</b>	fw: GCACTAGCAGCATGTTGAGC	55 °C	Ni et al., 2013
	rw: GCGTTGATGTGAGGTTCCAG		
<b>Nrf-2</b>	fw: ACACGGTCCACAGCTCATC	57 °C	Zhao et al., 2009
	rw: TGTCAATCAAATCCATGTCCTG		
<b>HMOX-1</b>	fw: AAGAGGCCAAGACTGCGTTC	55 °C	Chandhok et al., 2014
	rw: TCTGGTCCTTGGTGTGCATGG		
<b>YWHAZ</b>	fw: GTCTGTAAGTGAAGGAGC	56 °C	Coulson et al., 2008
	rw: CTCTGCTTGTGAAGCATTGGG		

Die Primer wurden in RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst mit einer Endkonzentration von 10 µM und bei -20 °C gelagert. Für den Primermix wurde ein Gemisch aus 1 µl reverse (rv) Primer, 1 µl forward (fw) Primer und 8 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O hergestellt.

Zur Bestimmung der Primereffizienz wurde mit dem FastStart DNS SYBRGreen Plus Kit (Roche, Mannheim, DE) nach Herstellerangaben gearbeitet. Hierfür wurde cDNA eines humanen Gehirnlisates verwendet, das später als Positivkontrolle herangezogen wurde. Das Lysat wurde mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt, sodass eine Verdünnungsreihe von 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256 und 1:1024 entstand. Im weiteren Verlauf erfolgte die Bildung eines Mastermixes mit jeweils 10 µl des zuvor gut gemischten 2x Fast Start essential DNS Green Masters, 0,8 µl des Primermixes und 8,2 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O. Zu dem Gemisch wurde 1 µl der cDNA zugefügt, in Doppelbestimmung aufgetragen und zur Verifizierung einer adäquaten Durchführung wurde stets eine Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt. Nach der initialen Denaturierung bei 95 °C für 600 s folgen 40 Zyklen des in Tab. 6 abgebildeten Reaktionsschemas.

**Tab. 6: Reaktionsschema der RT-qPCR Reaktion**

Reaktionsschritt	Zyklusparameter
DNS-Denaturierung	95 °C, 20s
Primeranlagerung	jeweilige Temperatur des Primers, 20 s
Elongation	72 °C, 23 s

Als Abschluss der PCR-Reaktion erfolgte das Schmelzen der DNS-Stränge bei 65 °C für 60 s und bei 95 °C für 20 s. Die Effizienz der Primer wurde von der Light Cycler Nano Software bzw. der Rotor-Gene Q Series Software Version 2.3.1 (Qiagen, Hilden, DE) mithilfe einer Standardgeraden berechnet und für weitere Berechnungen im Folgenden herangezogen.

Zur Bestimmung der mRNA-Menge der Proben wurde zunächst ein Mastermix wie oben beschrieben hergestellt. Jede Probe wurde in Doppelstimmung aufgetragen und wie zuvor wurden zur Verifizierung der Durchführung stets eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt bei gleichen Zyklusparametern der RT-qPCR wie zuvor beschrieben. Die mRNA-Mengen des dazugehörigen untersuchten Proteins der Proben wurden auf die mRNA-Menge von dem Gen YWHAZ normiert, das als Referenzgen bezeichnet wird. Es codiert für das Protein 14-3-3ζ (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide), was in neuronalen Zellsystemen stets eine ähnliche Expressionsrate aufweist (Aitken et al., 1995). Mit der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001) wurden relative Änderungen des mRNA-Gehalts berechnet, wobei  $\Delta Ct$  (cycle time) =  $Ct$  Kontrolle –  $Ct$  Probe des Zielgens bzw. des Referenzgens ist. Dabei kennzeichnet der  $Ct$ -Wert den Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal über das Hintergrundfluoreszenzsignal ansteigt (Pfaffl, 2001). Je mehr RNA vorhanden ist, desto früher wird ein Fluoreszenzsignal gemessen, desto kleiner ist der  $Ct$ -Wert.

**Formel 1: Berechnung der relativen Änderung des mRNA-Gehalts (Pfaffl, 2001)**

$$R = \frac{\text{Primereffizienz}(\text{analysierte RNA})^{\Delta Ct(\text{analysierte RNA})}}{\text{Primereffizienz}(\text{Referenz - RNA})^{\Delta Ct(\text{Referenz - RNA})}}$$

## 2.6 Statistische Analysen

Die Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit GraphPad Prism 8.0.2., wobei die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes von mindestens drei verschiedenen Experimenten angegeben wurden. Die Normierung erfolgte auf die Kontrolle bzw. bei Behandlungen auf die DMSO-Kontrolle der jeweiligen Zelllinie. Mittels des D'Agostino-Pearson Tests erfolgte eine Untersuchung auf Normalverteilung der Daten. Normal verteilte Daten wurden auf statistische Signifikanz geprüft mithilfe der einfaktoriellen ANOVA-Analyse mit dem post-hoc Test nach

---

Dunnett. Bei nicht normal verteilten Daten erfolgte ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's post-hoc Test zur Prüfung auf Signifikanz. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für  $p \leq 0,05$  angenommen mit folgender Kennzeichnung: \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ) und \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nachweis von oxidativem Stress in NDZs im NP-C

Durch einen Überschuss an ROS und RNS, kurz als OS zusammengefasst, entstehen große zelluläre Schäden. Insbesondere in NP-C hat ebendieser OS eine hohe Relevanz in dem pathophysiologischen Mechanismus der Krankheitsentstehung und -progression. Bisherige Studien wiesen OS und dessen Folgen in NP-C nach (Klein et al., 2011; Zampieri et al., 2009), wobei Daten über OS in NP-C mit humanen neuronalen Zellen fehlen. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Parameter von OS sowie spezielle Komponenten des antioxidativen Abwehrsystems wie die SOD und Katalase in neural differenzierten Zellen von NPC-defizienten Patientenspezifischen iPS auf Veränderungen im Vergleich zu der Kontrolle untersucht. Zur Analyse von OS in NP-C1 erfolgte die Betrachtung von drei unterschiedlichen NPC1-defizienten Zelllinien. Zusätzlich wurde das Maß an OS in NP-C2 mithilfe einer NPC2-defizienten Zelllinie gemessen.

Die in Abschnitt 2 beschriebenen Methoden wurden für die im Folgenden dargestellten Basisbestimmungen von oxidativen Stressparametern der zuvor benannten *NPC1*- und *NPC2*-Mutationen (MutA–MutC und NPC2) im Vergleich zur Kontrolllinie (Kon) genutzt. Hierbei wurden eine weit verbreitete Methode der direkten Messung von ROS (Singh et al., 2017; Ahmad et al., 2014; Zampieri et al., 2009; Jiang et al., 2014; Testa et al., 2011) und eine indirekte Messung der SOD-Aktivität (Peskin & Winterbourn, 2000; Tan & Berridge, 2000) als stabile Assays genutzt, um Veränderungen zwischen der Kontrolle und den Mutanten in Bezug auf OS darzustellen. Zur weiteren Testung wurden Western Blots gegen Nitrotyrosin durchgeführt, welches als Folge eines erhöhten RNS-Niveaus gebildet wird (Xiao et al., 2005; Klein et al., 2011). Des Weiteren erfolgte eine Betrachtung von Enzymen des antioxidativen Abwehrsystems (SOD 1, SOD 2 und Katalase) auf Protein- und Expressionsebene.

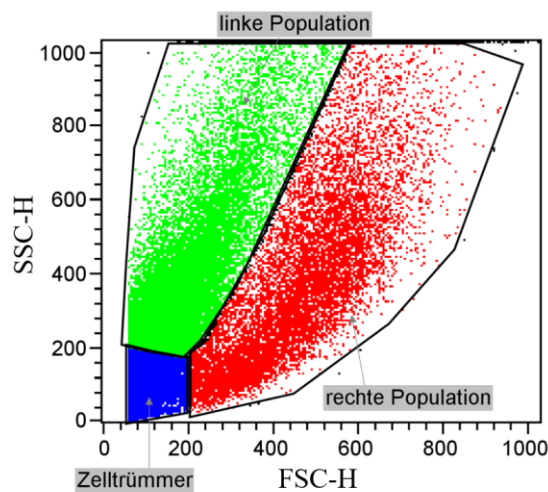
#### 3.1.1 Erhöhte ROS-Werte in NP-C1 bei unverändertem ROS-Niveau in NP-C2

Die ROS-Werte der Kontrollzelllinie und der NPC1- bzw. NPC2-defizienten Zelllinien wurden quantitativ mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des DCFDA-Assays (Kapitel 2.4) bestimmt.

Bei der Durchflusszytometrie kann mithilfe der Vorwärtsstreuung (FSC) ein Rückschluss auf die Größe der Zelle gemacht und durch die Seitwärtsstreuung (SSC) die Komplexität der Zelle betrachtet werden (Brown & Wittwer, 2000). In

Abb. 10 ist beispielhaft ein Punktdiagramm mit Auftragung der FSC und SSC zu sehen. Im unteren linken Abschnitt der Abb. 10 sind die Zelltrümmer gekennzeichnet, die sich als

zersetzte Zellen durch eine geringe FSC und SSC auszeichnen. Die Zelltrümmer sind zur Veranschaulichung im Folgenden in blau dargestellt. Zusätzlich ist im linken Bereich eine weitere Population zu erkennen, die durch eine geringere FSC, d. h. eine kleinere Größe, sowie eine breit gefächerte SSC von geringer bis komplexer Granularität charakterisiert ist und im Folgenden als linke Population bezeichnet wird und mit grün gekennzeichnet ist. Im rechten Abschnitt der Darstellung grenzt sich eine Population ab, die größer ist, ersichtlich durch eine stärkere FSC, mit ebenfalls einer diversen Granularität. Diese Population wird im Folgenden als rechte Population bezeichnet und ist rot dargestellt. Die Aufteilung in eine linke und rechte Population ist sowohl bei der Kontrolle als auch in allen NPC-defizienten Zelllinien in gleicher Weise zu sehen.



#### Abb. 10: Populationen innerhalb der NDZ-Mischkultur

Beispielhaftes Punktdiagramm mit NDZs, wobei anhand des SSC und FSC verschiedene Populationen unterschieden werden können. Zum einen die Zelltrümmer, die eine geringe FSC und SSC aufweisen (blau, unten links). Zum andern teilen sich die restlichen Zellen in eine linke (grün) und eine rechte (rot) Population. Das hier beispielhaft dargestellte Punktdiagramm ist repräsentativ für alle NDZs und entstammt einer Messung der Kontrolllinie.

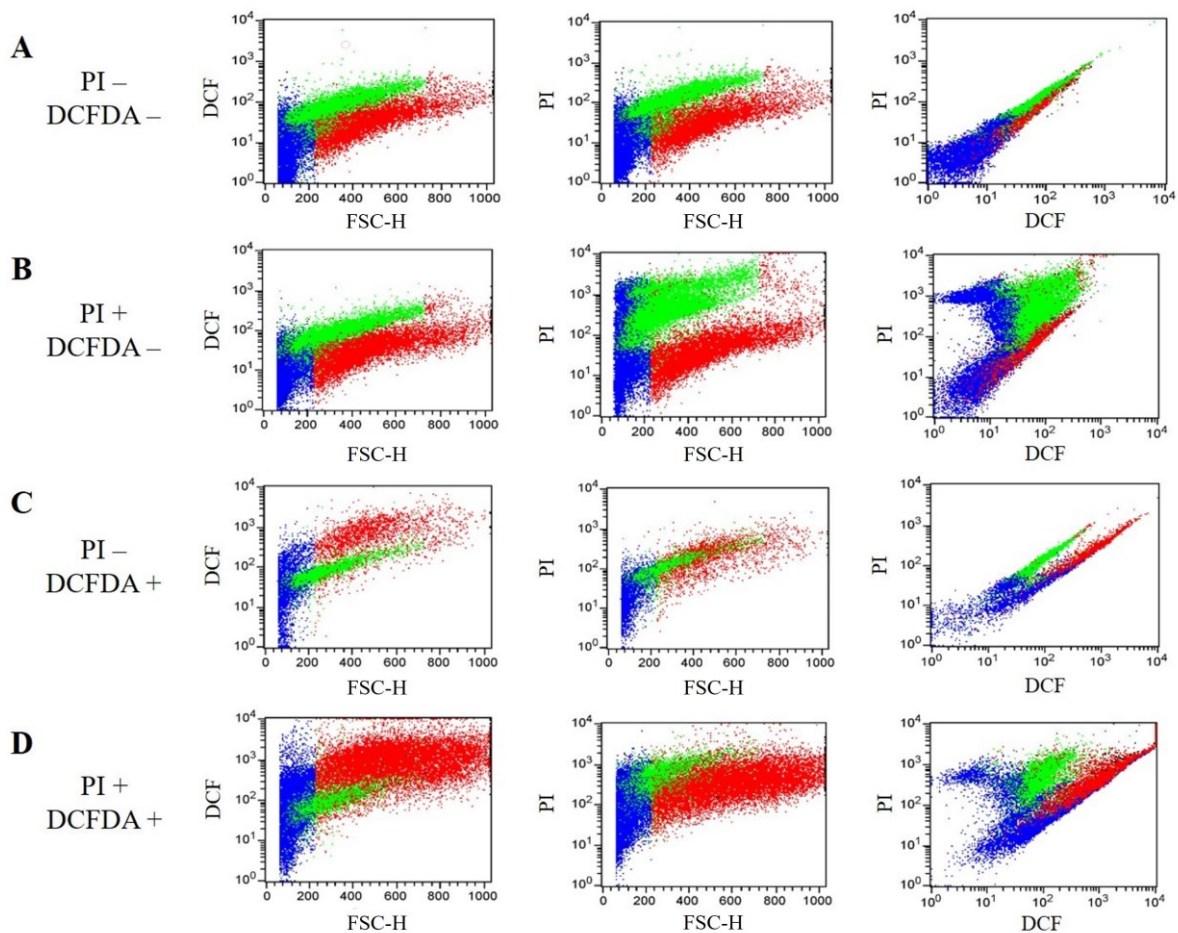
Zur Differenzierung und weiteren Charakterisierung der unterschiedlichen Populationen erfolgte im Verlauf eine Beladung der Zellen mit dem Farbstoff Propodiumiodid (PI) zur Bestimmung der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. Des Weiteren wurden die Zellen zur Bestimmung des OS mit dem Farbstoff DCFDA beladen. Um zu sehen, welche Zellen viabel sind, jedoch unter OS leiden, wurde eine Doppelfärbung mit PI und DCFDA vorgenommen.

Dabei unterschieden sich die einzelnen Populationen bezüglich der Fluoreszenzintensität von DCF. Die linke Population zeigte nahezu keine DCF positiven Zellen unter Setzung einer Schwelle mithilfe der Negativkontrolle (Abb. 11 A). Dahingegen demonstrierte die rechte Population einen hohen Anteil an DCF positiven Zellen (Abb. 11 C). Auffällig ist, dass die linke Population und zum Teil die Zelltrümmer durch eine höhere PI-Fluoreszenzintensität



charakterisiert waren (Abb. 11 B). Bei der Doppelfärbung von PI und DCFDA (Abb. 11 D) präsentiert sich insbesondere die rechte Population als DCF positiv und die linke Population als PI positiv.

Zusammenfassend kann aus der Analyse geschlossen werden, dass die linke Population einen erhöhten PI positiven Anteil aufweist und nahezu keine DCF positiven Zellen. Die rechte Population im Gegensatz dazu ist gekennzeichnet durch einen sehr hohen DCF positiven Anteil. Da PI in Zellen diffundiert, die eine perforierte Zellmembran aufweisen, wurde angenommen, dass die linke Population hauptsächlich aus apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen besteht (Sidhartha & George, 2009). Die Tatsache, dass ebendiese Population DCF negativ erscheint, wobei das DCFDA durch zelleigene funktionsfähige Esterasen deacetyliert werden muss, bekräftigt diese Annahme. Somit wurden die folgenden Analysen ausschließlich unter Einbeziehung der rechten Population vorgenommen, die somit als lebend postuliert wurden.

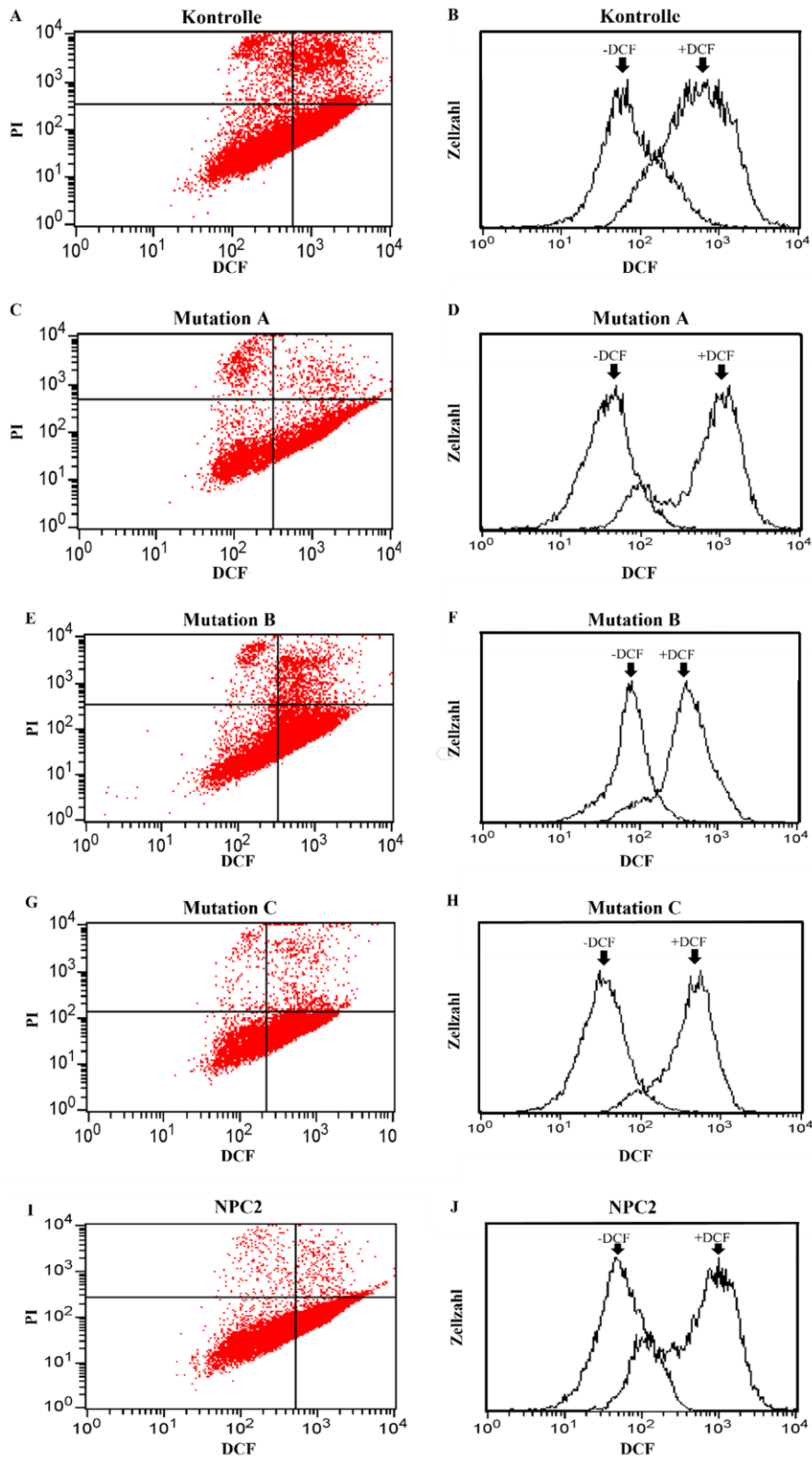


**Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse von DCFDA und PI der NDZs**

Darstellung der Punktdiagramme mit jeweils DCF-Fluoreszenzmessung aufgetragen gegen FSC, spezifische PI-Fluoreszenzmessung gegen FSC sowie die PI-Fluoreszenz gegen die DCF-Fluoreszenz aufgetragen. Die linke Population wird in grün dargestellt, rechte Population in rot und die Zelltrümmer in blau. Zu sehen ist eine Negativkontrolle (A), eine PI-Färbung (B), eine DCFDA-Beladung (C) und eine Doppelfärbung mit PI und DCFDA (D). Die hier dargestellten Punktdiagramme sind repräsentativ für alle NDZs und entstammen einer Messung der Mut A.

In Abb. 12 sind Quadrantendiagramme für jede analysierte Zelllinie dargestellt, wobei die Fluoreszenz von Propidiumiodid (PI), das nekrotische und apoptotische Zellen kennzeichnet (Sidhartha & George, 2009), auf der Ordinate und die DCF-Fluoreszenz auf der Abszisse zu sehen sind, die simultan beladen wurden. Mithilfe der Einteilung in vier Quadranten erfolgte eine Analyse des DCF positiven und PI negativen Anteils der rechten Population, der jeweils im rechten unteren Abschnitt der einzelnen Rechtecke dargestellt ist. Diese Population spiegelt die Zellen wider, die unter OS leiden. Die Zellen im oberen rechten Quadranten sind positiv für PI und DCF, d.h. noch lebende Zellen, die DCFDA deacetylieren können, bei denen jedoch bereits Vorgänge der Apoptose bzw. Nekrose geschehen. In dem oberen linken Quadranten sind PI positive Zellen, die nekrotische bzw. apoptotische Zellen symbolisieren. Des Weiteren sind im unteren linken Abschnitt doppelt negative Zellen ersichtlich, die leben und keinen Hinweis auf OS geben. Beim Vergleich des Quadrantendiagramms der Kontrolle (Abb. 12 A) mit den NPC1-defizienten Zelllinien (Abb. 12 C, E, G) ist zu erkennen, dass die lebenden DCF negativen Zellen, zu sehen im unteren linken Quadranten, bei der Kontrolle einen höheren Anteil hat. Im Einklang damit enthält der rechte untere Quadrant einen höheren Anteil der rechten Population bei den NPC1-defizienten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, was auf OS in NPC1-defizienten Zellen hinweist. Hingegen verhält sich die NPC2-defiziente Zelllinie (Abb. 12 I) ähnlich wie die Kontrolle, wodurch kein Anhalt für OS in NP-C2 zu finden ist.

Des Weiteren ist der Abb. 12 zu jedem Quadrantendiagramm ein entsprechendes Histogramm zu entnehmen, bei dem die Zellzahl auf der Ordinate und die spezifische DCF-Fluoreszenz der Einzelmessungen auf der Abszisse zu sehen ist. Da es sich bei der Durchflusszytometrie um eine Relativmessung handelt, wurde für jede mit DCFDA gefärbte Probe (+DCF) eine Negativkontrolle, die nicht mit DCFDA beladen wurde (-DCF), mitgeführt. Bei der hier verwendeten Schwellenmethode wird anhand der Negativkontrolle eine Grenze festgelegt, was im Verlauf als DCF positiv oder negativ gilt, wodurch die Autofluoreszenz der Zellen für die Analyse zu vernachlässigen ist. Anzumerken ist, dass die gesetzten Schwellen durch Verknüpfung wie hintereinander geschaltete Filter fungieren. In jedem Histogramm ist die Verlagerung der DCF-Fluoreszenz nach rechts zu beobachten, die OS kennzeichnet. Zusätzlich ist zu erkennen, dass die Verlagerung nach rechts bei der Kontrolle (Abb. 12 B) geringer ausgeprägt ist als bei den NPC1-defizienten Zelllinien (Abb. 12 D, F, H), wobei die größte Verschiebung nach rechts bei der Mutation C zu beobachten ist. Für NPC2 (Abb. 12 J) stellt sich analog zu der Darstellung im Quadrantendiagramm auch im Histogramm keine stärkere Rechtsverschiebung im Vergleich zu der Kontrolle dar und somit kein OS.

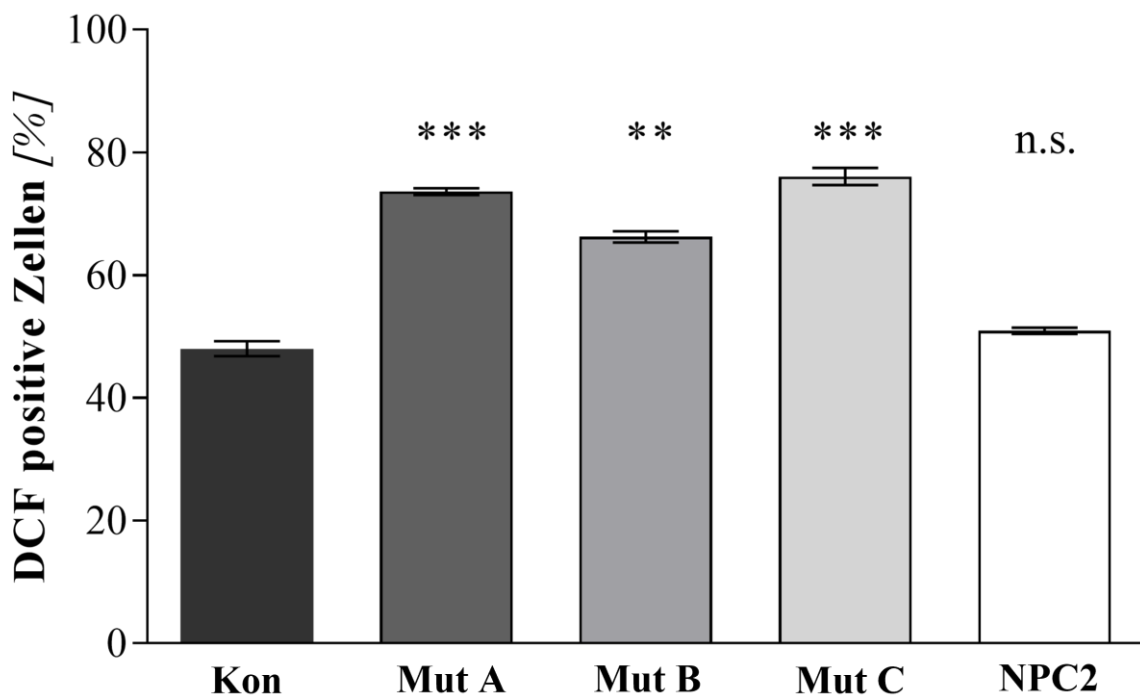


**Abb. 12: Diagrammdarstellungen der DCFDA-Analyse**

Beispielhafte Quadrantendiagramme der Kontrolle (A) und der NPC1- und NPC2-defizienten Zellen (A, C, E, G, I), die simultan mit PI und DCF beladen wurden. Der untere rechte Quadrant stellt die Zellen dar, die unter OS leiden. Die zugehörigen Histogramme der Fluoreszenzverteilung von DCF als ROS-Detektion sind ebenfalls zu sehen (B, D, F, H, J). -DCF: nicht mit DCF beladen. +DCF: mit DCF beladen.

Unter Betrachtung der rechten Population ergab sich ein signifikant erhöhter Anteil an DCF positiven Zellen in allen drei *NPC1*-Mutationen im Vergleich zur Kontrolle, was der Abb. 13 zu entnehmen ist. Mit  $48,0\% \pm 1,2\%$  hatte die Kontrolle den geringsten Anteil an DCF positiven Zellen unter allen betrachteten Zelllinien. Die *NPC1*-defizienten Zelllinien wiesen ähnlich viele DCF positive Zellen auf, wobei die prozentual meisten DCF positiven Zellen bei der Mutation C zu sehen waren mit  $76,1\% \pm 1,4\%$ . Dicht gefolgt von der Mutation A, die einen Anteil von  $73,6\% \pm 0,6\%$  aufwies. Im Vergleich zu den beiden homozygoten *NPC1*-defizienten Zelllinien zeigte die kombinierte heterozygote Linie Mutation B den geringsten DCF positiven Anteil der rechten Population mit  $66,2\% \pm 0,9\%$ . Zu betonen ist, dass alle drei *NPC1*-defizienten Zelllinien einen signifikant erhöhten DCF positiven Anteil vorwiesen im Vergleich zur Kontrolle.

Die *NPC2*-Linie zeigte mit  $50,9\% \pm 0,5\%$  vergleichbare ROS-Werte wie die Kontrolle. Bei dem Vergleich der *NPC1*-defizienten Zelllinien mit den *NPC2*-defizienten Zellen ergaben sich signifikant erhöhte ROS-Werte aller drei *NPC1*-Mutationen.



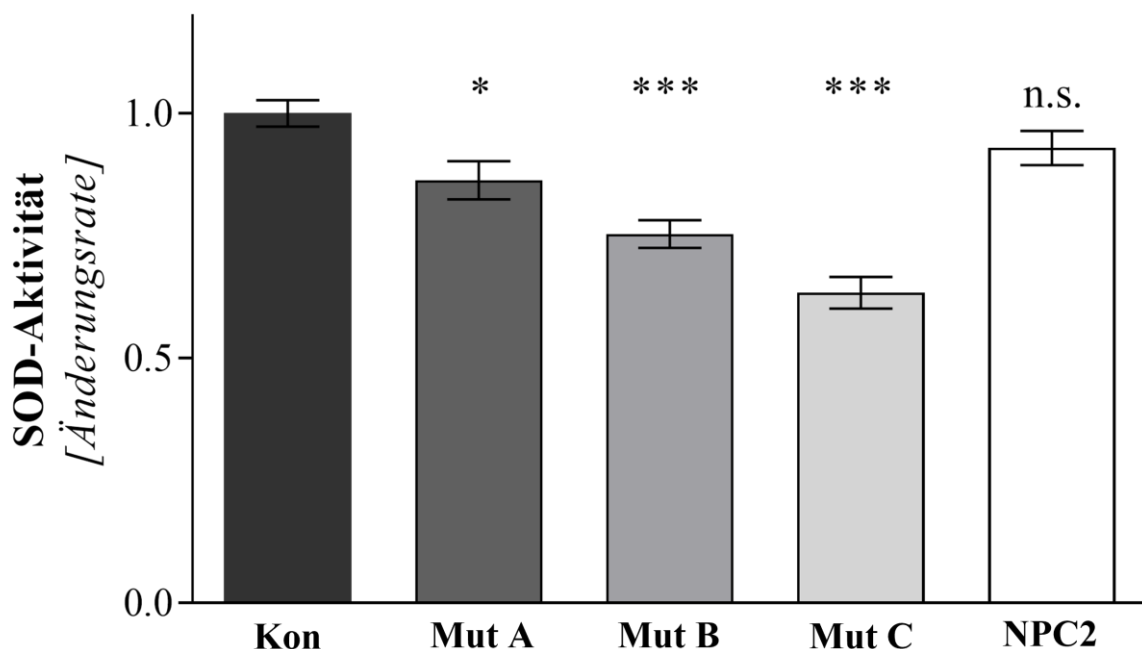
**Abb. 13: Erhöhter Anteil an DCF positiven Zellen in *NPC1*-defizienten NDZs**

Die Analyse der durchflusszytometrisch ermittelten DCF positiven und PI negativen Zellen der NDZs ist in dem Balkendiagramm dargestellt (N=5-6, n=15-18). Hierbei ist in allen *NPC1*-defizienten Zelllinien ein signifikant erhöhter DCF positiver Anteil von 66-76 % vorhanden, wobei der Anteil der Kontrolle 48 % beträgt. *NPC2* weist ein ähnlich hohes Maß an DCF positiven Zellen auf wie die Kontrolle. \*: Signifikanz zur Kontrolle.

### 3.1.2 Verminderte SOD-Aktivität in NPC1-defizienten Zellen

Nach dem Nachweis von erhöhten ROS-Werten in NP-C1 wurde als nächster Schritt das enzymatische Abwehrsystem zur Bekämpfung von OS betrachtet werden. Zunächst erfolgte eine SOD-Aktivitätsbestimmung, die als weiterer Parameter für die Betrachtung von OS in NP-C diente. Als wichtiges antioxidatives Enzym baut die SOD Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff ab (Löffler et al., 2007). Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, wurde die SOD-Aktivität über die WST-1-Formation bestimmt und auf einen einheitlichen Proteingehalt normiert.

Die Daten in Abb. 14 zeigen eine signifikante Reduktion der SOD-Aktivität in allen drei *NPC1*-Mutanten. Für die Analyse wurde die SOD-Aktivität der Kontrolle auf 100 % festgelegt. Im Vergleich zur Kontrolle wies Mutation C die stärkste Reduktion der SOD-Aktivität von  $36,6 \% \pm 3,2 \%$  auf  $63,4 \%$  auf. Bei Mutation B war eine Senkung um  $24,6 \% \pm 2,8 \%$  auf  $75,4 \%$  zu verzeichnen. Der geringste Rückgang war bei Mutation A mit  $13,7 \% \pm 3,9 \%$  auf  $86,3 \%$  zu sehen. Hingegen konnte bei der NPC2-Linie keine signifikante Veränderung der SOD-Aktivität im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet werden, die lediglich eine Reduktion von  $7,1 \% \pm 3,5 \%$  auf mit  $92,9 \%$  zeigte.



**Abb. 14: Bestimmung der SOD-Aktivität der NDZs in NP-C**

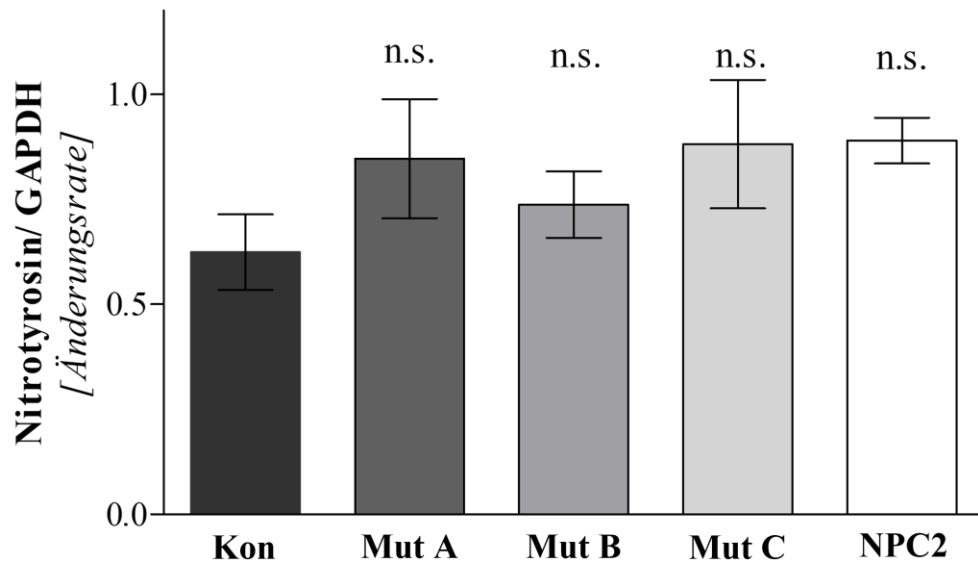
Die SOD-Aktivität der NDZs wurde kolorimetrisch bestimmt und auf den jeweiligen Proteingehalt der Probe normiert (N=5-10, n=10-20). Die Auswertung zeigte eine signifikante Reduktion der SOD-Aktivität in allen drei *NPC1*-Mutanten im Vergleich zur Kontrolle. NPC2 zeigte verglichen mit der Kontrolle keine Veränderung der SOD-Aktivität. \*: Signifikanz zur Kontrolle.

### 3.1.3 Nachweis von Proteinen mit nitrierten Tyrosylresten

Ein weiteres Zeichen von zellulärem OS sind post-translationale Modifizierungen von Proteinen durch reaktive Moleküle wie die Nitrierung von Tyrosylresten unter Ausbildung von 3-Nitrotyrosin. Nach dem Nachweis von erhöhten ROS-Werten und einer verminderten SOD-Aktivität in NP-C1 wurde die Nitrierung von Tyrosylresten in Proteinen als Marker für erhöhte RNS-Werte betrachtet, die einen weiteren Hinweis für OS darstellen. Dies erfolgte über die semiquantitative Western Blot Analyse (Kapitel 2.2), wobei der verwendete Antikörper spezifisch 3-Nitrotyrosin nachweist.

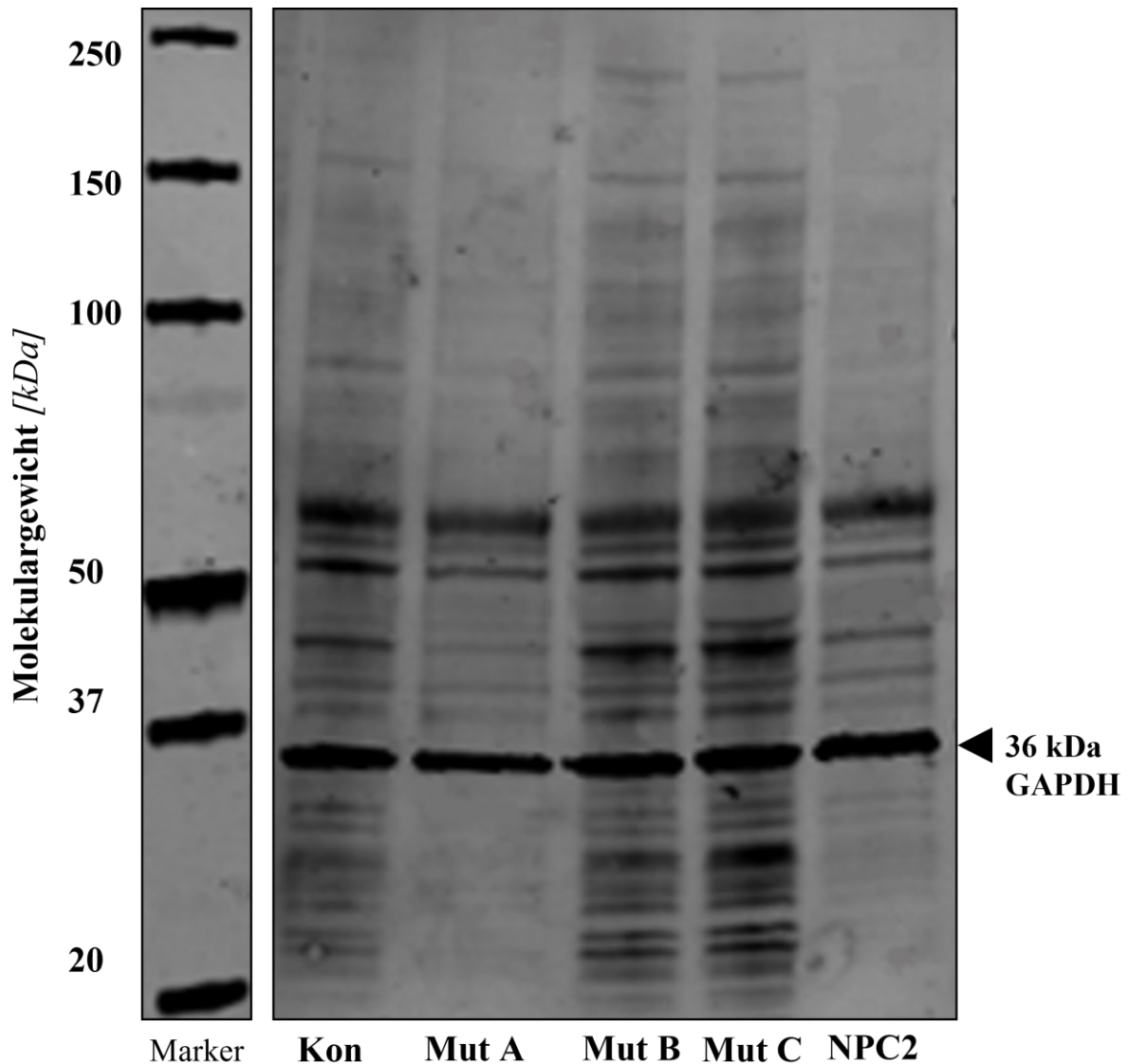
Für die Bestimmung des nitrierten Gesamtproteins wurden der Bereich von 20–250 kDa betrachtet und die Intensität quantifiziert. Im Anschluss erfolgte eine Normierung auf die GAPDH-Intensität. Bei der Quantifizierung wurde ein gesteigertes Niveau an nitriertem Gesamtprotein ohne statistische Signifikanz sowohl in den NPC1-defizienten NDZs als auch in der NPC2-defizienten NDZs festgestellt (Abb. 15). Dabei war die Erhöhung des nitrierten Gesamtproteins bei der Mutation B am geringsten.

Bei näherer Betrachtung des Western Blots gegen 3-Nitrotyrosin unterscheidet sich das Bandenmuster der NPC-Mutationen von dem der Kontrolle Abb. 16 zeigt eine repräsentative Darstellung des Bandenmusters der NDZs der verwendeten Zelllinien. In allen Zelllinien ist eine GAPDH-Bande bei 36 kDa zu verzeichnen sowie weitere Banden im Bereich von 20–250 kDa. Dabei scheint das Bandenmuster bei der Mutation A und NPC2 weniger intensiv und das der Mutation B und Mutation C intensiver ausgeprägt zu sein verglichen mit der Kontrolle. Insgesamt ähnelt sich das Bandenmuster der Mutation B und Mutation C stark. Bei allen verwendeten Zelllinien war eine ausgeprägte Bande bei 70-75 kDa zu erkennen. Darüber hinaus ist anzumerken, dass zwei Banden mit einer Größe von 65-70 kDa bei der Kontrolle und den NPC-Mutanten zu erkennen waren, wobei diese bei Mutation B und Mutation C eine intensivere Darstellung aufwiesen als bei der Kontrolle. Demgegenüber waren ebendiese Banden bei Mutation A und NPC2 weniger intensiv. Bis zu der Größendomäne von 37 kDa waren bei allen abgebildeten Zelllinien weitere Banden zu erkennen, die sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Zelllinien Mutation A und NPC2 deutlich schwächer ausgeprägt waren im Vergleich zu Mutation B und Mutation C. Unter der GAPDH-Bande bei 36 kDa, die ebenfalls deutlich durch den Nitrotyrosin-Antikörper bei allen Zelllinien wahrnehmbar war (siehe Abb. 17), waren deutliche Signalanreicherungen bei Mutation B und Mutation C zu erkennen. Bei eben diesen Mutationen war das gleiche Bandenmuster von nitrierten Tyrosylresten im angegebenen Areal zu beobachten. Zwischen 25-37 kDa war das Bandenmuster bei Mutation A und NPC2 deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 16).



**Abb. 15: Gesteigertes nitriertes Gesamtprotein in NPC-defizienten Zellen**

Mittels Western Blot Analyse der NDZs erfolgte unter Betrachtung aller Proteine im Bereich zwischen 20–250 kDa die Normierung des nitriertem Gesamtproteins in diesem Bereich auf GAPDH (N=5, n=7-8). Hierbei zeigten alle NPC-defizienten Zelllinien ein gesteigertes Niveau an nitriertem Gesamtprotein, wobei keine Signifikanz (n. s.) festgestellt wurde.



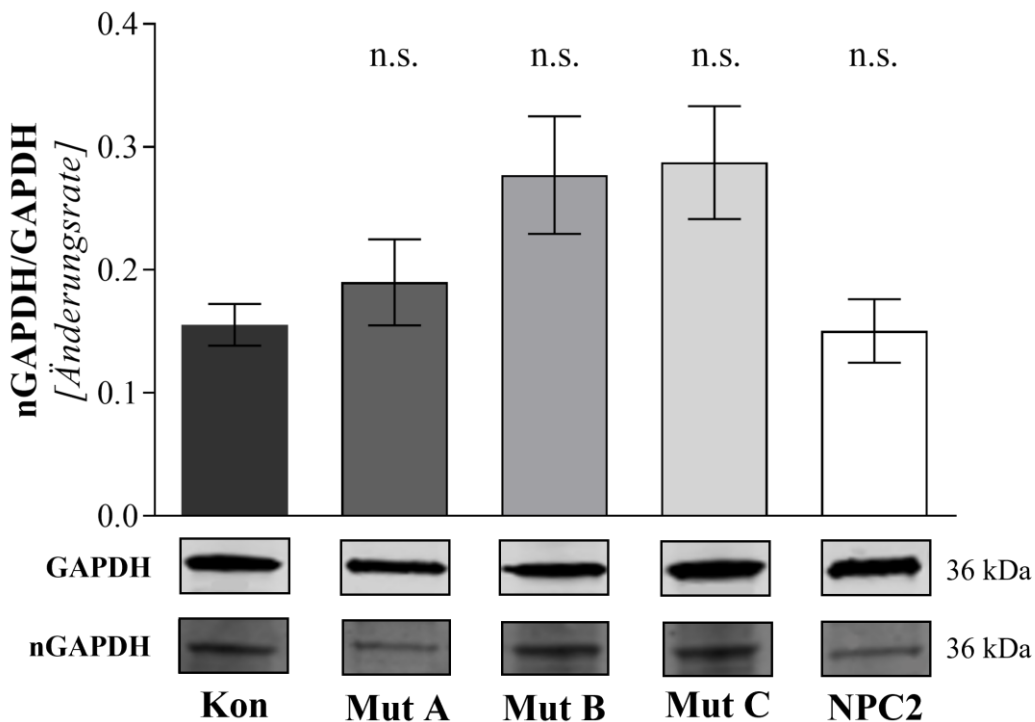
**Abb. 16: Variation des Bandenmusters des Nitrotyrosin Western Blot der NDZs**

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Bandenmuster eines Western Blots gegen Nitrotyrosin aller verwendeten NDZs. Bei 36 kDa ist die Bande von GAPDH zu sehen, wohingegen alle weiteren Banden nitrierte Tyrosylreste darstellen.

Nach dem aktuellen Stand der Forschung sind viele Proteine bekannt, die an Tyrosylresten nitriert werden, wie die SOD 1, SOD 2, Cytochrom C und das Hitzeschockprotein 90 $\alpha$  (Radi et al., 2002; Turko et al., 2003; Xiao et al., 2005). Darüber hinaus ist beschrieben, dass auch GAPDH dieser post-translationalen Modifizierung unterliegt (Buchczyk et al., 2003; Xiao et al., 2005). Somit ist GAPDH ein geeigneter Parameter zur Quantifizierung von nitrierten Tyrosylresten in spezifischen Proteinen als OS-Marker. Die Analyse erfolgte über die Auswertung der Intensitäten des GAPDH-Antikörpers bei 36 kDa und des Nitrotyrosin-Antikörpers im Größenbereich von 36 kDa äquivalent zu dem Gewicht von GAPDH. Dadurch wird der nitrierte Anteil von GAPDH bezogen auf den Gesamtproteingehalt von GAPDH bestimmt und als nGAPDH/ GAPDH im Diagramm dargestellt.



In allen drei NPC1-defizienten Zelllinien war ein erhöhter nitrierter Anteil von GAPDH (nGAPDH) vorhanden, wohingegen bei der NPC2-Linie keine Veränderung beobachtet werden konnte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 17). Die geringste Steigerung des nGAPDH-Gehalts war bei Mutation A festzustellen, die nur leicht über dem nGAPDH-Anteil der Kontrolle lag. Sowohl bei der Mutation B als auch bei der Mutation C war der nGAPDH-Anteil im Durchschnitt verdoppelt verglichen mit der Kontrolle. Jedoch war keine Steigerung des nGAPDH-Anteils statistisch signifikant.



**Abb. 17: Erhöhter nitrierter GAPDH-Anteil in NP-C1**

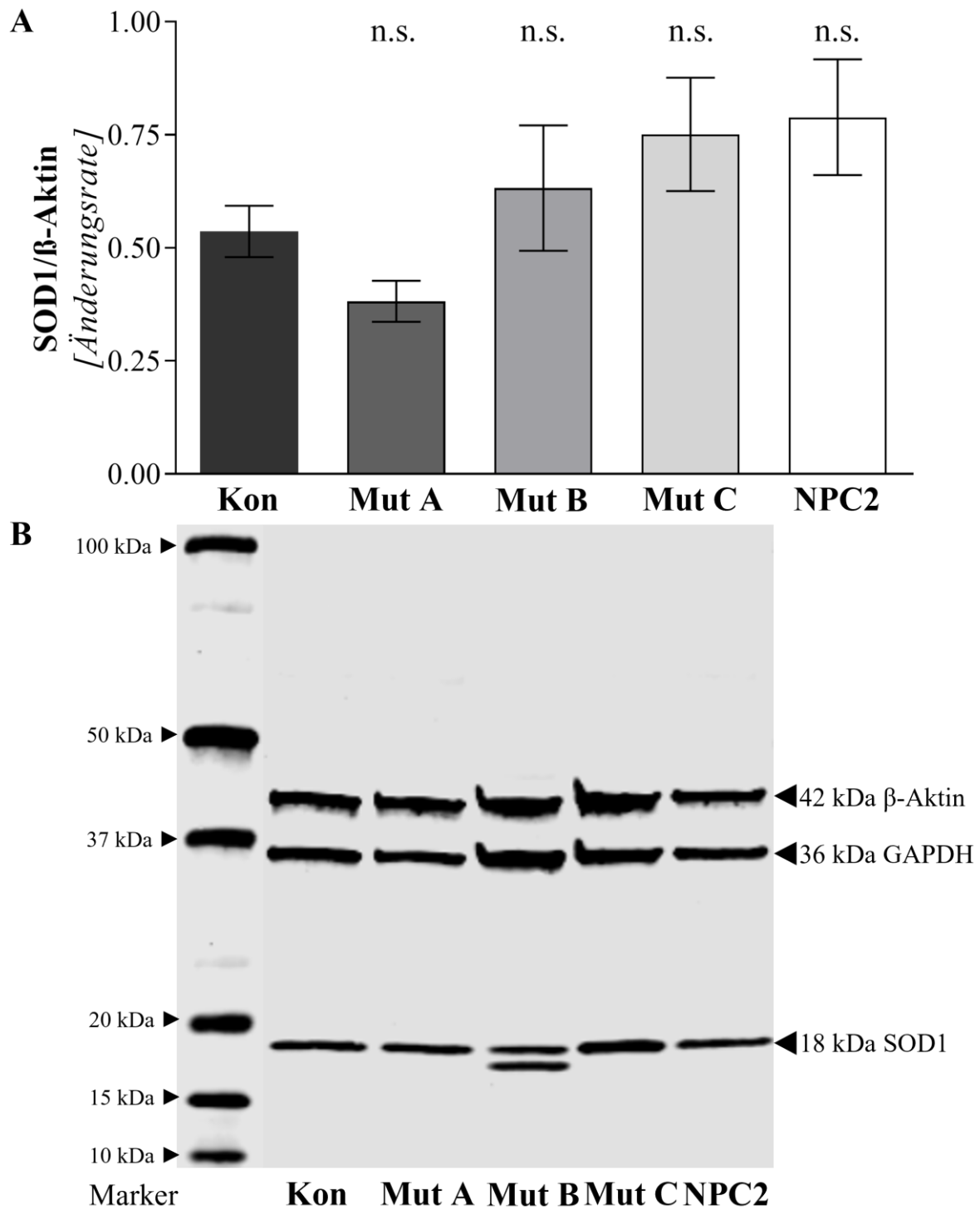
Die Menge an Nitrotyrosin-GAPDH (nGAPDH) bei 36 kDa wurde mittels semiquantitativer Western Blot Analyse ermittelt. Hierbei stellte sich bei allen NPC1-defizienten NDZs ein erhöhter Gehalt an nGAPDH dar, insbesondere bei Mutation B und Mutation C, ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. In der NPC2-defizienten Zelllinie wurde keine Veränderung des nGAPDH-Anteils gesehen verglichen mit der Kontrolle (N=7-12, n=11-21). Die Banden unter den jeweiligen Balken des Diagramms entstammen alle dem Western Blot der Abb. 16.

### 3.1.4 Veränderungen der SOD1-, SOD2- und Katalase-Expression auf Proteinebene in NPC-defizienten Zellen

Bei OS versucht die Zelle eine Gegenregulation zur Beseitigung von ROS und RNS anzusteuern, um wieder eine Balance zwischen Produktion und Beseitigung von reaktiven Molekülen herzustellen und somit OS zu eliminieren. Dies geschieht hauptsächlich durch das enzymatische, antioxidative Abwehrsystem einer Zelle. Die Schlüsselenzyme dieses Abwehrsystems stellen die SOD1, SOD2 und die Katalase dar. Deswegen erfolgte nach dem Nachweis von erhöhten OS-Parametern in NP-C1 die Betrachtung der Proteinexpression ebendieser Enzyme.

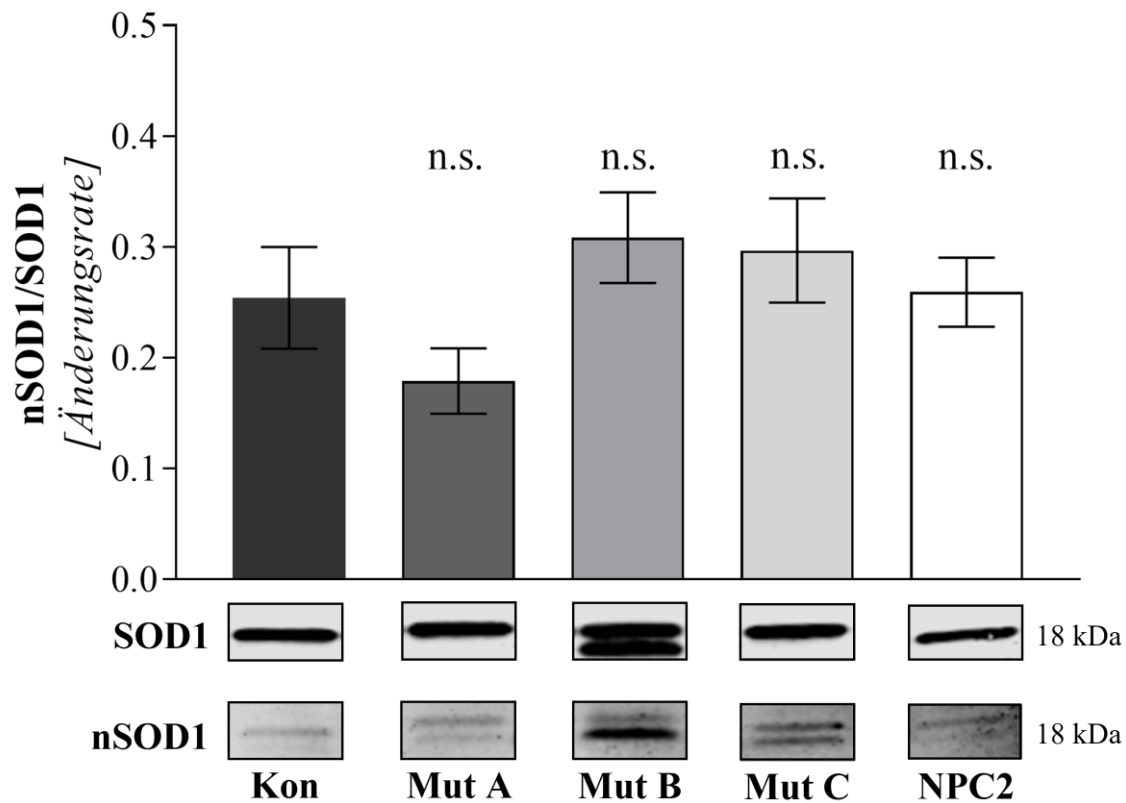
Mittels semiquantitativer Western Blot Analyse wurde die Expression der SOD1, die v. a. im Zytosol, im Nukleus und der mitochondrialen Membran zu finden ist (Miao & St. Clair, 2010), auf Proteinebene bestimmt. Hierbei war auffällig, dass die kombiniert heterozygote Mutation B eine deutliche Doppelbande aufwies, während diese bei den anderen Zelllinien nicht zu erkennen war (Abb. 18). Weder bei NP-C1 noch bei NP-C2 konnte eine signifikante Veränderung des SOD1-Proteingehalts festgestellt werden. Eine geringe Steigerung verglichen mit der Kontrolle ohne statistische Signifikanz konnte allerdings bei der Mutation C und NPC2 gesehen werden. Bei der Mutation B wurde hingegen eine reduzierte SOD1-Proteinmenge beobachtet ohne statistische Relevanz (Abb. 18).

Zur weiterführenden Betrachtung der SOD1 als wichtigem antioxidativem Enzym wurde bei nachgewiesener verminderter SOD-Aktivität sowie erhöhter Proteinnitrierung in NP-C1 als potenzieller Einflussfaktor der nitrierte Anteil der SOD1 (nSOD1) untersucht. Die Untersuchungen ergaben weder für die betrachteten NPC1-defizienten Zelllinien noch für die NPC2-defiziente Linie eine signifikante Veränderung des nSOD1-Anteils im Vergleich zu der Kontrolle. Jedoch war eine geringe Reduktion bei der Mutation A zu sehen (Abb. 19).



**Abb. 18: Unveränderter SOD1-Proteingehalt in NPC-defizienten Zellen**

Mittels Western Blot Analyse mit  $\beta$ -Aktin (42 kDa) als Referenzprotein konnte keine signifikante Veränderung des SOD1-Proteingehalts bei 18 kDa festgestellt werden (A). Eine geringe Steigerung wurde bei Mutation C und NPC2 gesehen (N=6-10, n=10-13). In B ist eine repräsentative Darstellung eines Western Blots mit der SOD1 bei 18 kDa als Zielprotein sowie  $\beta$ -Aktin bei 42 kDa und GAPDH bei 36 kDa als Referenzproteine dargestellt.



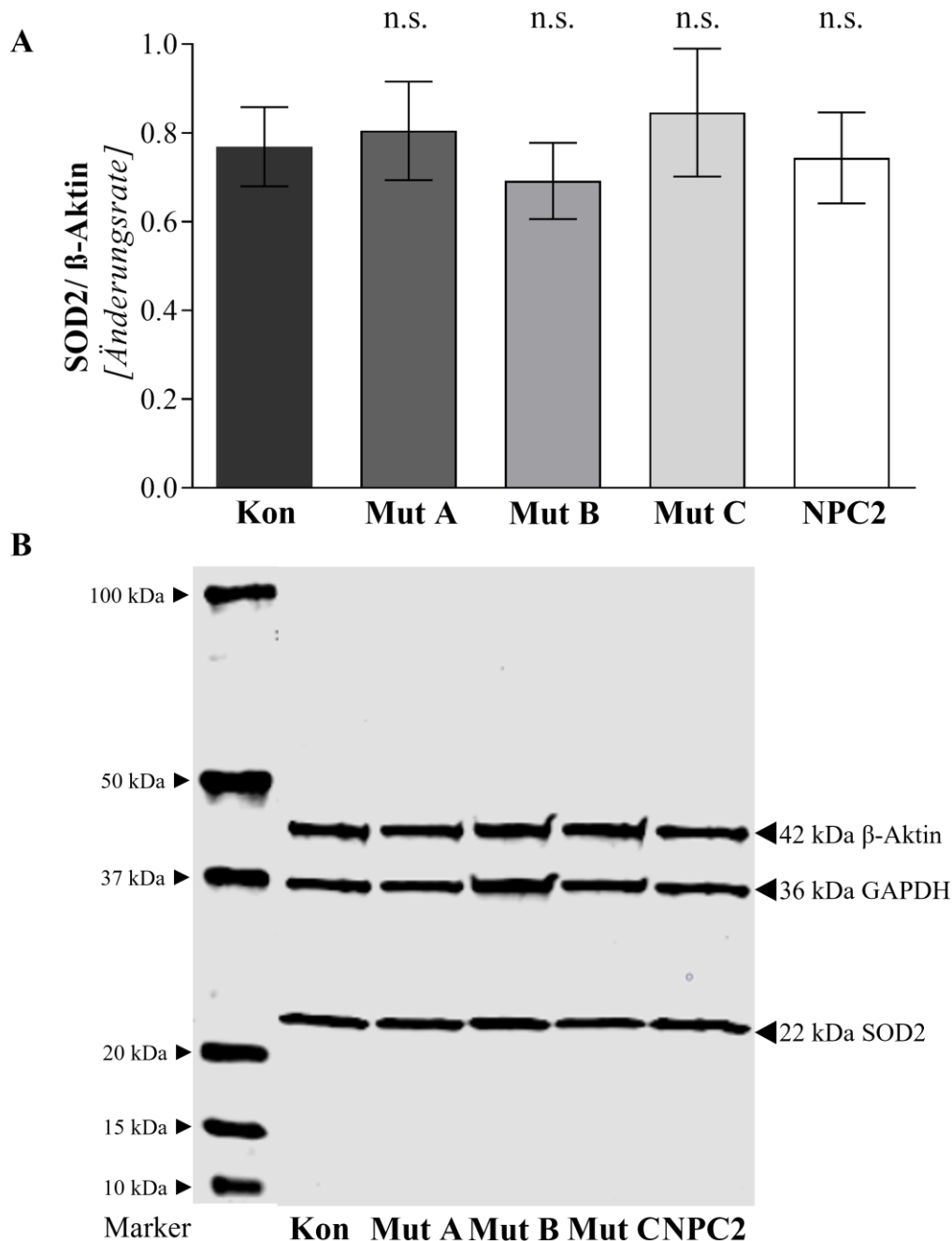
**Abb. 19: Kein erhöhter Anteil an nitrierter SOD1 in NPC-defizienten NDZs**

Mittels semiquantitativer Western Blot Analyse wurde der nitrierte Anteil der SOD1 (nSOD1) im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge der SOD1 (18 kDa) der untersuchten NDZs bestimmt. Hierbei zeigte keine der *NPC*-Mutanten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (N=3-4, n=4-8). Eine repräsentative Darstellung der Banden der entsprechenden Zelllinien ist unter dem jeweiligen Balken des Balkendiagrammes zu finden, wobei die Banden alle demselben Blot entstammen. Ein gesamter Blot gegen nSOD1 ist im Anhang in Abb. 38 zu finden.

Maßgebend an der Regulation von OS beteiligt ist die SOD2, die gehäuft in der mitochondrialen Matrix vorzufinden ist (Miao & St. Clair, 2010). Da bedingt durch die Atmungskette in der mitochondrialen Matrix viele Sauerstoffradikale anfallen, ist die SOD2 ein Schlüsselenzym des antioxidativen Abwehrsystems. Bei verminderter SOD-Aktivität und unveränderter SOD1-Expression auf Proteinebene in NP-C1 erfolgte die Betrachtung des Proteingehalts der SOD2. Dabei wurde in keiner der verwendeten NPC-defizienten Zelllinien ein signifikanter Unterschied der SOD2-Expression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abb. 20).

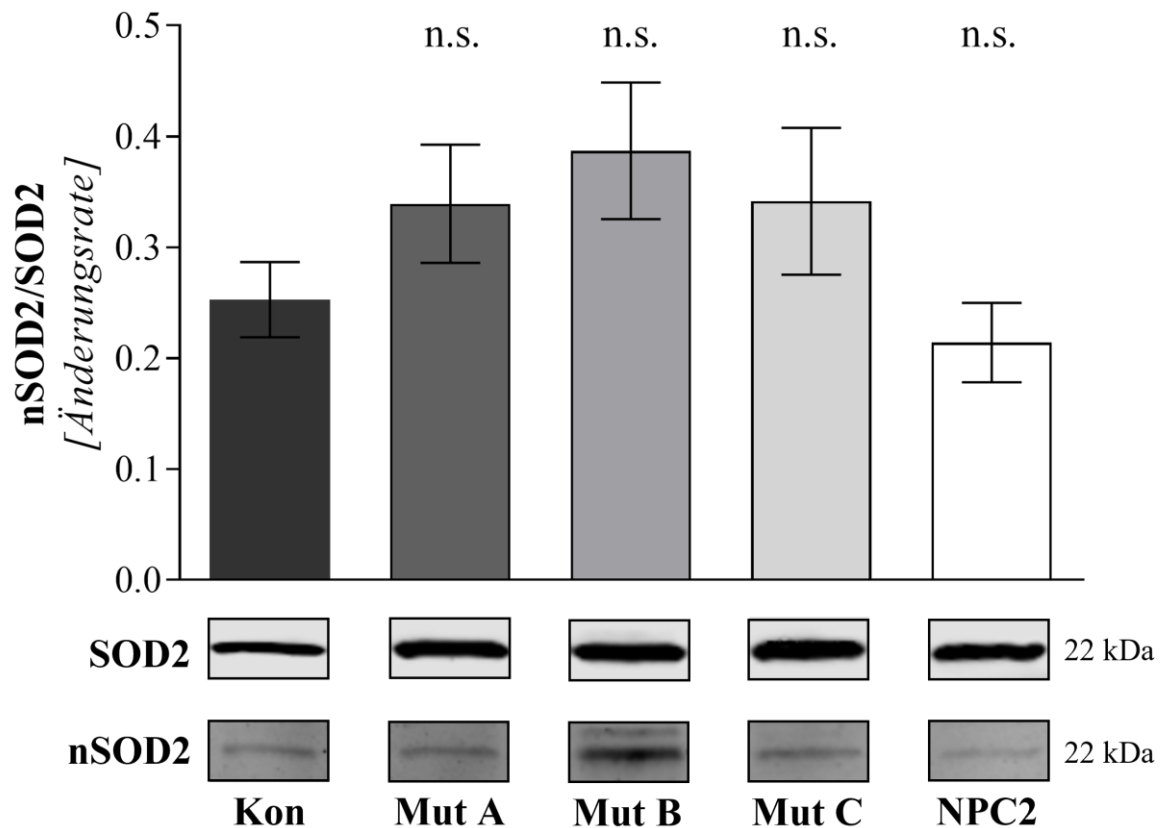
Durch ein gesteigertes RNS-Niveau innerhalb der Zelle werden insbesondere im aktiven Zentrum der SOD2-Tyrosylreste nitriert unter Ausbildung von 3-Nitrotyrosin, was zu einem Funktionsverlust der Enzymaktivität mit sekundärer Degradierung des Proteins führt (MacMillan-Crow et al., 1998; Macmillan-Crow & Thompson, 1999). Aufgrund des Nachweises eines erhöhten Maßes an nitrierten Proteinen in NPC1-defizienten NDZs sowie verminderter SOD-Aktivität bei unveränderter SOD-Expression erfolgte eine Analyse des nitrierten Anteils der

SOD2 (nSOD2) mittels Western Blot. Hierbei wurde in allen NPC1-defizienten, neuronalen Zellen ein erhöhter nSOD2-Anteil festgestellt, jedoch ohne statistische Signifikanz. Bei Mutation B wurde ein Anstieg von 56 % verglichen mit der Kontrolle nachgewiesen und bei den Mutation A und Mutation C wurde eine Erhöhung um 36 % festgestellt. Die NPC2-defizienten Zellen zeigten keine Veränderung des nSOD2-Anteils verglichen mit der Kontrolle (Abb. 21).



**Abb. 20: Unveränderter SOD2-Proteingehalt in NPC-defizienten Zellen**

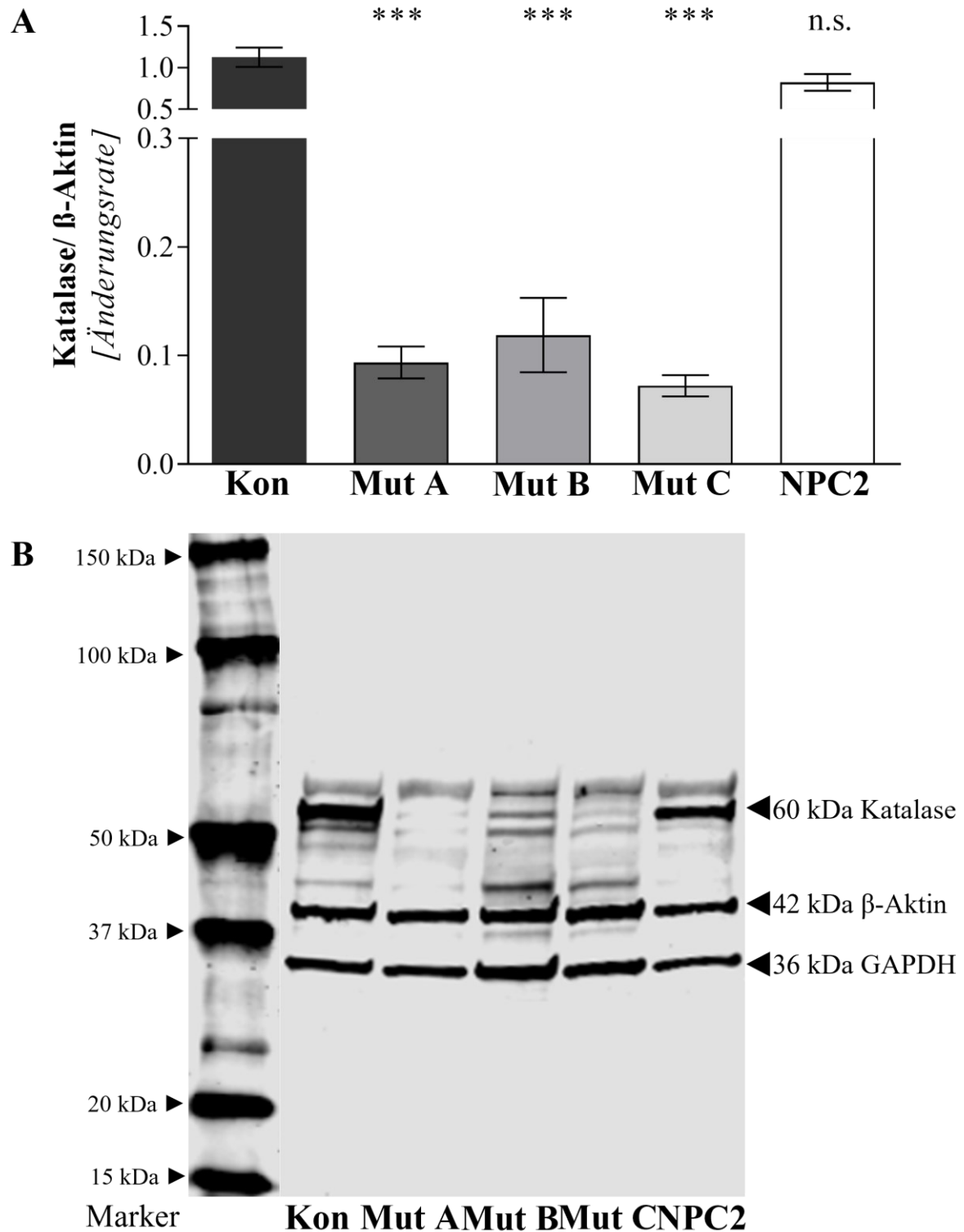
Mittels Western Blot Analyse mit β-Aktin als Referenzprotein wurde die SOD2-Proteinexpression der NDZs betrachtet (A). Es war keine signifikante (n. s.) Veränderung des SOD2-Proteingehalts zu erkennen (N=6-10, n=10-13). B zeigt eine repräsentative Darstellung eines Western Blots mit der SOD2 bei 22 kDa als Zielprotein sowie β-Aktin bei 42 kDa und GAPDH bei 36 kDa als Referenzproteine.



**Abb. 21: Nachweis von nitrierter SOD2 in NPC1-defizienten NDZs**

Mithilfe der semiquantitativen Western Blot Analyse wurde der nitrierte Anteil der SOD2 (nSOD2) im Verhältnis zum gesamten SOD2-Proteingehalts (22 kDa) von NPC-defizienten NDZs bestimmt. Dabei wiesen alle NPC1-defizienten Zelllinien einen erhöhten nSOD2-Anteil auf ohne statistische Signifikanz (N=6-10, n=10-13). Eine repräsentative Darstellung der Banden der entsprechenden Zelllinien ist unter dem jeweiligen Balken des Balkendiagrammes zu finden, wobei die Banden alle demselben Blot entstammen. Ein repräsentatives Beispiel für einen vollständigen Western Blot gegen nSOD2 ist in Abb. 37 zu finden.

Ein weiteres wichtiges Enzym zur Beseitigung von ROS ist die Katalase, die neben der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Elimination unter Bildung von H<sub>2</sub>O und ½ O<sub>2</sub> (Young & Woodside, 2001) Peroxynitrit abbauen kann (Heinzelmann & Bauer, 2010). Bei dem Nachweis von gesteigerten ROS-Werten und einem erhöhten Maß an nitrierten Proteinen, bedingt durch RNS wie Peroxynitrit, in NPC1-defizienten neuronalen Zellen wurde die Proteinexpression der Katalase als weiterer wichtiger Bestandteil der antioxidativen Abwehr analysiert. Alle drei NPC1-defizienten Zelllinien zeigten eine signifikante Reduktion der Katalase auf Proteinebene zwischen 89 % und 94 % im Vergleich zu der Kontrolle. Insbesondere bei Mutation A und Mutation C war nahezu keine Bande zu erkennen, wohingegen die Kontrolllinie eine starke Bande bei 60 kDa aufwies. Bei den NPC2-defizienten NDZs konnte im Gegensatz dazu eine deutliche Bande abgegrenzt werden bei unveränderter quantitativer Katalase-Expression verglichen mit der Kontrolle (Abb. 22).



**Abb. 22: Verringerung der Katalase in NPC1-defizienten Zellen**

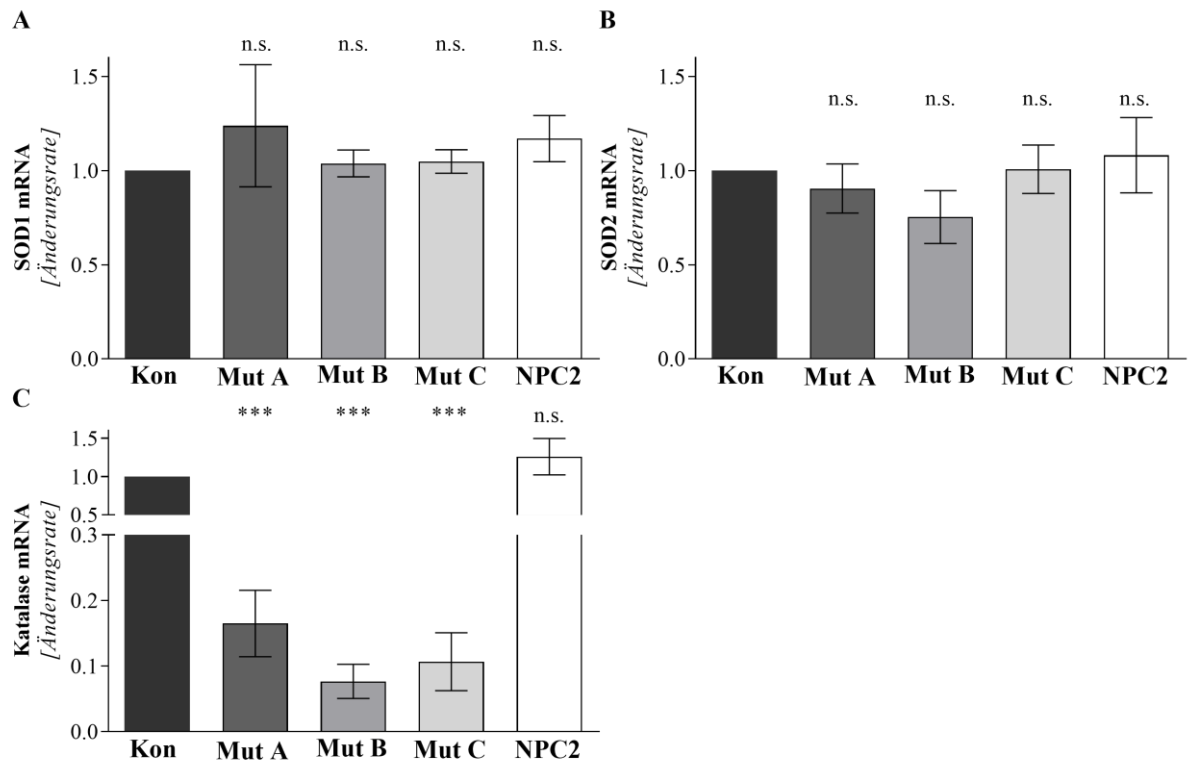
Die Katalase wurde mittels semiquantitativer Western Blot Analyse bestimmt, wobei  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein fungierte. Bei allen drei *NPC1*-Mutationen war eine signifikante Reduktion der Katalase auffällig (N=6-10, n=11-15). Im rechten Abschnitt der Abbildung ist eine repräsentative Darstellung eines Western Blots mit der Katalase bei 60 kDa als Zielprotein sowie  $\beta$ -Aktin bei 42 kDa und GAPDH bei 36 kDa als Referenzproteine zu finden.

### 3.1.5 Veränderungen des antioxidativen Abwehrsystems auf Genexpressionsebene in NPC-defizienten Zellen

Aufgrund der erhöhten OS-Parameter bei nicht signifikant veränderter SOD1- und SOD2-Proteinexpression sowie einer Reduktion der Katalase auf Proteinebene in NPC1-defizienten NDZs stellte sich die Frage, inwieweit der OS die Genexpression der antioxidativen Enzyme verändert. Hierfür erfolgte eine Betrachtung der SOD1, SOD2 und Katalase mittels RT-qPCR mit YWHAZ als Referenzgen. Das Gen YWHAZ codiert dabei das Protein 14-3-3 $\zeta$  (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide), was von neuronalen Zellen konstant exprimiert und nicht durch äußere Faktoren reguliert wird (Aitken et al., 1995). Somit stellt es eine geeignete Referenz dar.

Bei der Betrachtung der SOD1 und SOD2 auf Genexpressionsebene wurde weder eine Veränderung in NP-C1 noch in NP-C2 im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet (Abb. 23 A, B). Da bereits auf Proteinebene ein nahezu vollständiges Fehlen der Katalase in NPC1-defizienten NDZs nachgewiesen wurde, erwarteten wir ebenfalls eine verminderte Katalase-Genexpression. Dies bestätigten die Analysen, wobei die Katalase-Expression der NPC1-defizienten Zelllinien signifikant reduziert war und verglichen mit der Kontrolle lediglich zwischen 17 % und 7 % betrug (Abb. 23 C). Im Gegensatz dazu ergab sich ebenfalls auf Genexpressionsebene keine signifikante Veränderung der NPC2-defizienten Zelllinie in Bezug auf die Katalase verglichen mit der Kontrolle. Die Ergebnisse waren somit analog zu der unveränderten Expression der Katalase auf Proteinebene, wobei eine geringe Steigerung ohne statistische Signifikanz auf Genexpressionsebene beobachtet wurde.





**Abb. 23: Geringere Katalase- bei unveränderter SOD-Genexpression in NPC1-defizienten NDZs**

Mittels RT-qPCR erfolgte die Bestimmung der Genexpression der SOD1 (A), SOD2 (B) und Katalase (C) mit YWHAZ als Referenzgen (N=5-6, n=5-6). Hierbei waren keine signifikanten Veränderungen bei der SOD1 und SOD2 der NPC-defizienten Zellen verglichen mit der Kontrolle zu erkennen. Jedoch wurde bei allen NPC1-defizienten Zelllinien eine signifikante Reduktion der Katalase-Genexpression beobachtet. Die NPC2-defiziente Linie zeigte keine Veränderungen verglichen mit der Kontrolle.

## **3.2 Untersuchung des Einflusses der Flavonoide Quercetin und Kaempferol auf oxidativen Stress in NPC-defizienten Zellen**

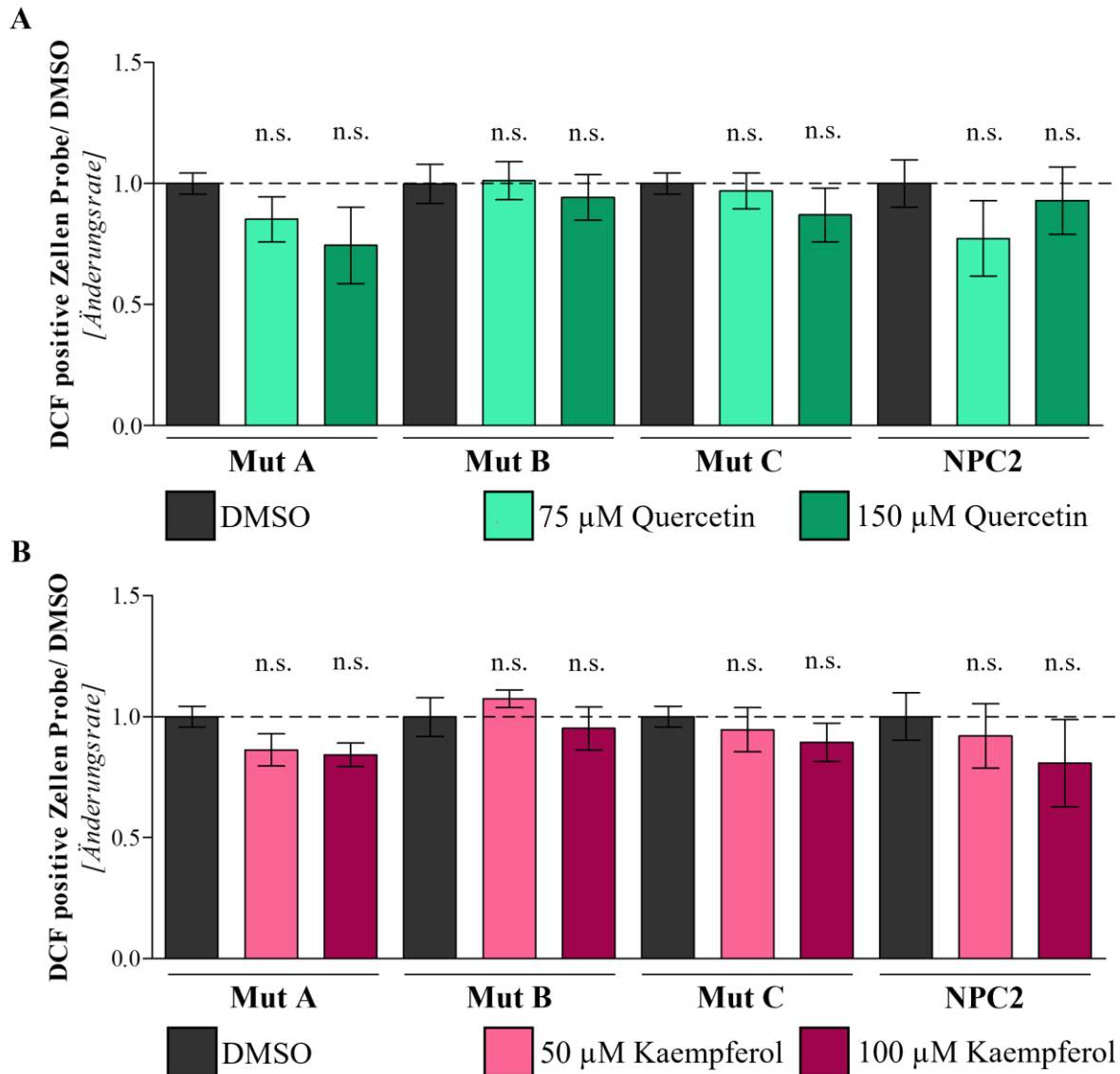
Mittels verschiedener Methoden wurde OS in NPC1-defizienten neuronalen Zellen nachgewiesen. Mit dem Vorhaben, diesen OS zu senken, wurden die NPC1- bzw. NPC2-defizienten NDZs für 24 Stunden mit Antioxidantien behandelt. Die verwendeten Flavonoide Quercetin und Kaempferol besitzen durch die Hydroxygruppen der Phenole direkte antioxidative Eigenschaften (Heijnen et al., 2002; Kumar et al., 2016). Um die Fragestellung zu beantworten, ob die Flavonoide den OS der NPC-defizienten NDZs lindern können, wurde mit dem gleichen methodischen Spektrum wie bei der Basisbestimmung gearbeitet.

### **3.2.1 Quercetin und Kaempferol ergaben keine Senkung des ROS Niveaus in NPC-defizienten Zellen**

Da insbesondere in NPC1-defizienten NDZs ein signifikant erhöhtes Maß an ROS beobachtet wurde, erfolgte eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit den ROS-Fängern Quercetin und Kaempferol. Um einen direkten Einfluss der verwendeten Substanzen auf das ROS-Niveau zu bestimmen, wurde ROS wie zuvor mithilfe der Durchflusszytometrie unter Verwendung des DCFDA-Assays detektiert.

Nach Behandlung der NDZs mit 75  $\mu\text{M}$  bzw. 150  $\mu\text{M}$  Quercetin wurde weder in NPC1-defizienten Zellen noch in der NPC2-defizienten Zelllinie eine signifikante Senkung der DCF positiven Zellen im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle festgestellt (Abb. 24 A). Bei Mutation A konnte eine geringe Senkung ohne statistische Signifikanz der ROS-Werte mit steigender Konzentration von Quercetin beobachtet werden sowie auch bei Mutation C in einem geringeren Maße. Im Unterschied dazu zeigte die Quercetin-Behandlung bei Mutation B keine Veränderung der DCF positiven Zellen verglichen mit DMSO. In NPC2 wurde eine Minderung der ROS-Werte unter Behandlung mit 75  $\mu\text{M}$  Quercetin im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle gesehen, die nicht nach Behandlung der Zellen mit 150  $\mu\text{M}$  Quercetin in selbiger Linie beobachtet wurde (Abb. 24 A).

Die Behandlung der NDZs mit Kaempferol erfolgte mit 50  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden. Im Einklang mit der Quercetin-Behandlung konnte auch nach Behandlung der NDZs mit Kaempferol keine statistisch signifikante Veränderung der DCF positiven Zellen festgestellt werden im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (Abb. 24 B). Eine geringe Verminderung der DCF positiven Zellen ohne statistische Signifikanz konnte in den Mutationen A und C sowie in der NPC2-Linie nach Kaempferol-Behandlung gesehen werden im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle (Abb. 24 B).

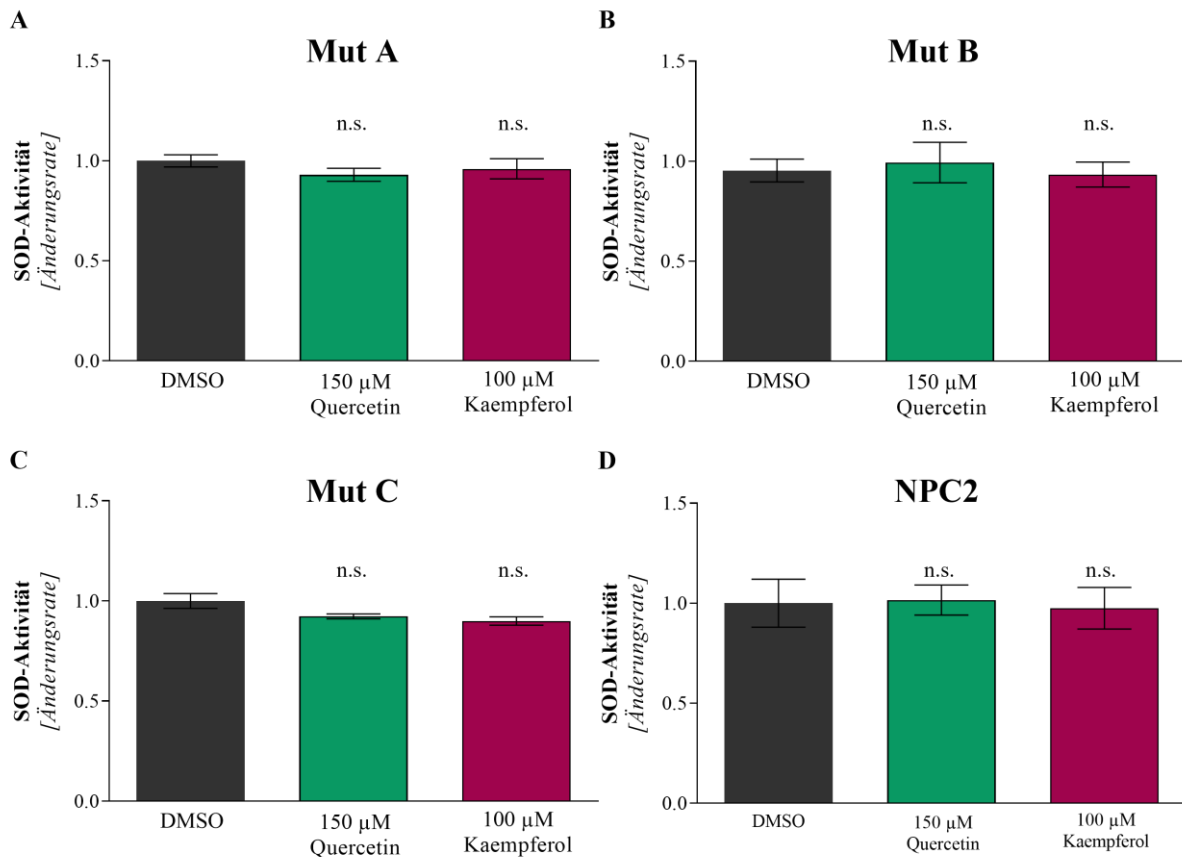


**Abb. 24: ROS-Messung der NDZs nach Behandlung mit Flavonoiden**

Das ROS-Niveau der NDZs wurde nach 24-stündiger Behandlung mit 75 bzw. 150 µM Quercetin oder 50 bzw. 100 µM Kaempferol sowie einer DMSO-Kontrolle mittels DCFDA Assay bestimmt. Die behandelten Proben wurden auf die jeweilige DMSO-Kontrolle normiert (N=3-4, n=3-7). Dabei konnten keine signifikanten Veränderungen der DCF positiven Zellen unter Behandlung mit hoch dosiertem Quercetin (A) bzw. Kaempferol (B) beobachtet werden.

### 3.2.2 NPC-defiziente Zellen zeigten keine Veränderung der SOD-Aktivität nach Behandlung mit Quercetin und Kaempferol

Da bei allen NPC1-defizienten neuronalen Zellen eine signifikante Verminderung der SOD-Aktivität beobachtet wurde, erfolgte als weiterer OS-Parameter die Bestimmung der SOD-Aktivität über die WST-1-Formation unter Behandlung der NDZs mit 150 µM Quercetin bzw. 100 µM Kaempferol. Weder die Behandlung der NPC-defizienten NDZs mit Quercetin noch mit Kaempferol erbrachten eine signifikante Veränderung der SOD-Aktivität verglichen mit der DMSO-Kontrolle (Abb. 25).



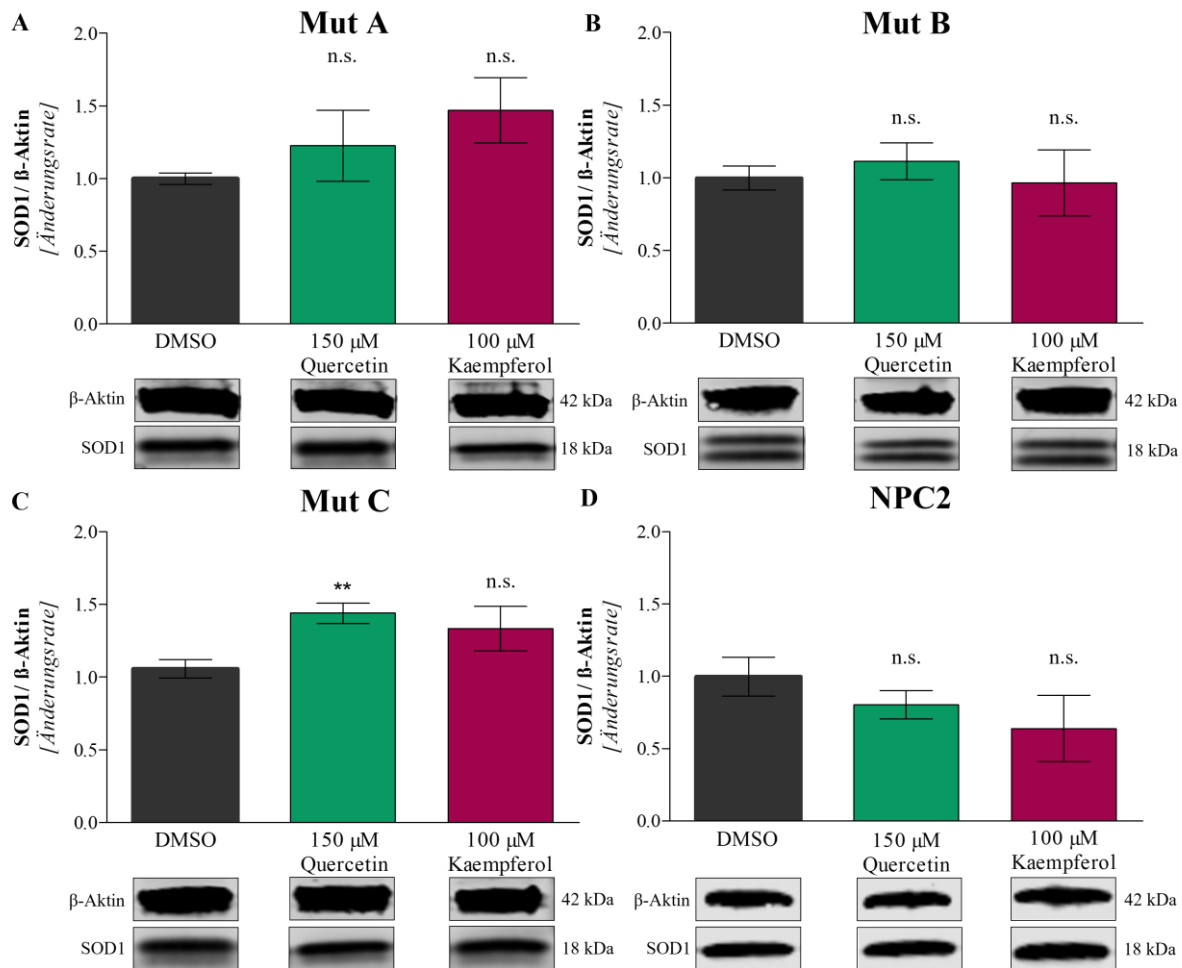
**Abb. 25: Bestimmung SOD-Aktivität nach Behandlung mit Quercetin und Kaempferol**  
 Nach 24-stündiger Behandlung mit DMSO bzw. hoch dosierten Flavonoiden wurde die SOD-Aktivität der NDZs bestimmt und auf den Proteingehalt der Probe normiert (N=3-4, n=3-4). Hierbei sind keine Veränderungen der SOD-Aktivität weder bei den *NPC1*-Mutationen (A, B, C) noch bei der *NPC2*-Mutation (D) unter Behandlung verglichen mit DMSO detektiert worden.

### 3.2.3 Beeinflussung der Proteinexpression der SOD1, SOD2 und Katalase durch hoch dosierte Flavonoide

Neben der direkten antioxidativen Wirkung für Quercetin und Kaempferol wurde eine indirekte Wirkung über die Stimulation des Nrf-2-Signalweges beschrieben (Arredondo et al., 2010), wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf das antioxidative Abwehrsystem der Zelle auf Proteinebene mittels semiquantitativer Western Blot Analysen untersucht.

Nach dem Nachweis von geringen Veränderungen der SOD1-Proteinexpression in NPC-defizienten Zellen erfolgte die Betrachtung des SOD1-Proteingehalts nach Behandlung der NDZs mit Quercetin bzw. Kaempferol. Hierbei ergab sich eine geringe Steigerung verglichen mit der DMSO-Kontrolle sowohl unter Behandlung mit 150 µM Quercetin als auch unter Behandlung mit 100 µM Kaempferol in Mutation A ohne statistische Signifikanz (Abb. 26 A). Bei Mutation C wurde eine signifikante Erhöhung der SOD1-Expression um 44 % nach Quercetin-Behandlung im Vergleich zu DMSO festgestellt, wobei die Steigerung nach Kaempferol-Behandlung nicht signifikant war (Abb. 26 C). Im Gegensatz dazu ergab die SOD1-Bestimmung in NPC2

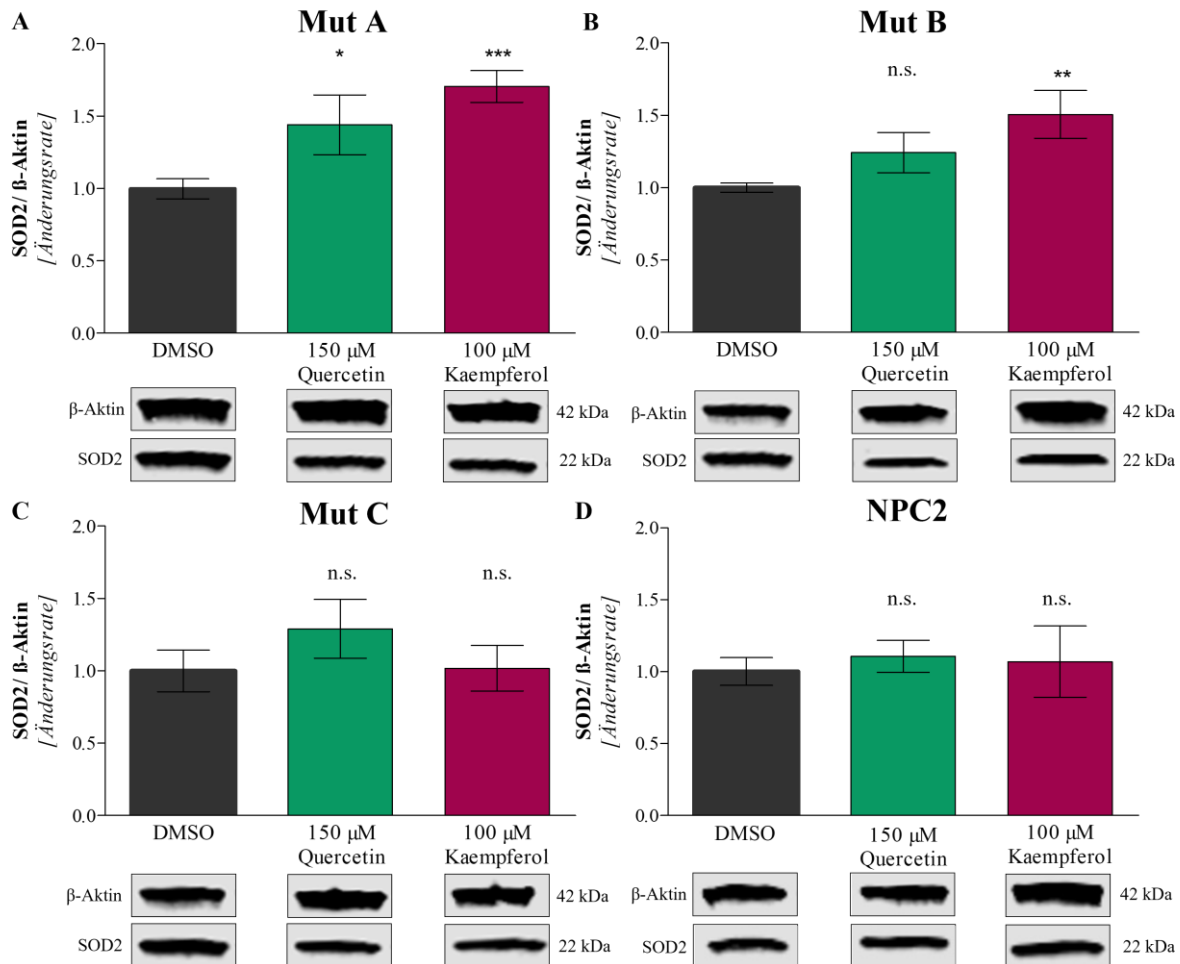
nach Flavonoid-Behandlung verglichen mit der DMSO-Kontrolle eine nicht signifikante Senkung (Abb. 26 D), während in Mutation B keine Veränderung nach Flavonoid-Behandlung beobachtet wurde (Abb. 26 B).



**Abb. 26: SOD1-Proteinexpression nach Flavonoid-Behandlung in NPC-defizienter NDZs** Mithilfe einer semiquantitativen Western Blot Analyse der NDZs nach 24-stündiger Behandlung mit den Testsubstanzen wurde der SOD1-Gehalt (18 kDa) detektiert unter Verwendung von  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein (42 kDa) (N=3-4, n=3-6). Es wurden in Mutation A (A), Mutation B (B) und in der NPC2-Linie (D) keine signifikanten Veränderungen gesehen. Bei der Mutation C wurde bei der Behandlung mit 150  $\mu$ M Quercetin eine signifikante Erhöhung des SOD1-Proteins beobachtet, wobei die Kaempferol-Behandlung keinen signifikanten Effekt hatte (C). Unter jedem Balkendiagramm sind repräsentative Darstellungen der  $\beta$ -Aktin- und SOD1-Bande desseligen Gels abgebildet. Im Anhang in Abb. 39 ist eine repräsentative Darstellung eines Western Blots der vier Zelllinien unter Flavonoid-Behandlung zu finden.

Als weiteres wichtiges zelluläres Regulationselement bei OS gilt die SOD2 aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle, umgeben von vielen reaktiven Molekülen, sowie ihrer Induzierbarkeit durch äußere und innere Faktoren (Miao & St. Clair, 2010). Nach Behandlung der NPC-defizienten NDZs erfolgte eine Bestimmung des SOD2-Proteinniveaus. Hierbei war bei der Mutation A eine signifikante Steigerung der SOD2 nach Behandlung mit 150  $\mu$ M Quercetin um 44 % und 100  $\mu$ M Kaempferol um 71 % verglichen mit DMSO zu beobachten (Abb. 27 A).

Ebenfalls ein signifikanter Anstieg der SOD2 auf Proteinebene um 51 % war bei der Mutation B mit der Behandlung von 100  $\mu\text{M}$  Kaempferol zu verzeichnen im Vergleich zu DMSO. Bei der Behandlung mit 150  $\mu\text{M}$  Quercetin wurde eine geringe, nicht signifikante Erhöhung beobachtet (Abb. 27 B). Keine Änderung der SOD2-Expression verglichen mit der DMSO-Kontrolle wurde bei der Mutation C sowie bei der NPC2-Linie unter Flavonoid-Behandlung beobachtet (Abb. 27 C, D).

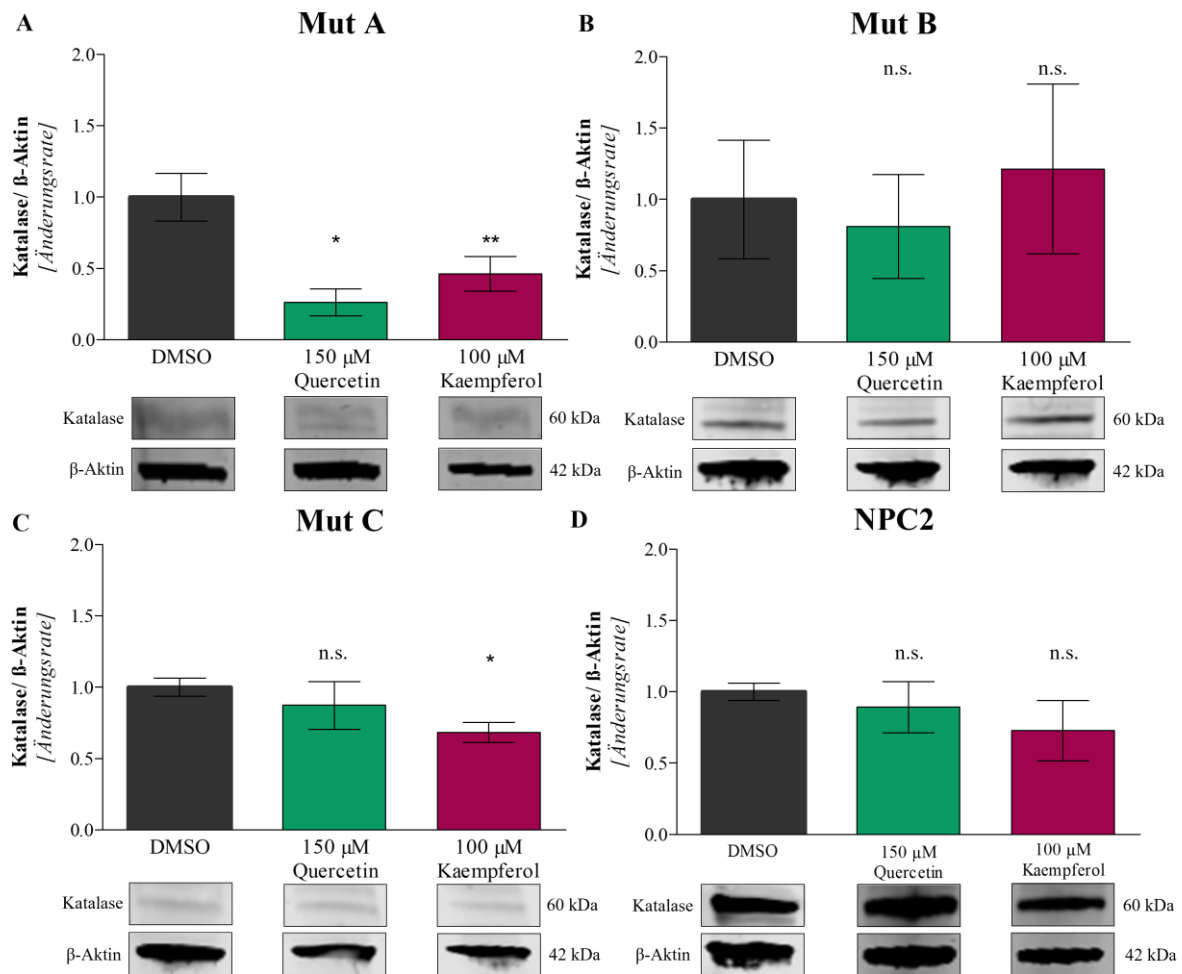


**Abb. 27: SOD2-Proteinniveau nach Flavonoid-Behandlung der NPC-defizienten NDZs**

Nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit 150  $\mu\text{M}$  Quercetin bzw. 100  $\mu\text{M}$  Kaempferol sowie der DMSO-Kontrolle erfolgte eine Western Blot Analyse zur Bestimmung des SOD2-Proteinniveaus (22 kDa) mit  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein (42 kDa) (N=3-4, n=3-6). Dabei konnten signifikante Steigerungen bei der Mutation A unter Quercetin- und Kaempferol-Behandlung verglichen mit DMSO nachgewiesen werden (A). In Mutation B ergab sich eine signifikant erhöhte SOD2-Expression unter Kaempferol-Behandlung (B). In Mutation C (C) und NPC2 (D) waren keine Veränderungen der SOD2-Expression unter Behandlung mit Quercetin und Kaempferol zu sehen. Repräsentative Darstellungen der  $\beta$ -Aktin- und SOD2-Bande desselbigen Gels sind unter den Balkendiagrammen abgebildet. Im Anhang in Abb. 40 ist eine repräsentative Darstellung von Western Blots der vier Zelllinien unter Flavonoid-Behandlung zu finden.

Aufgrund des verringerten Basiswertes der Katalase in allen NPC1-defizienten NDZs stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit Flavonoiden eine Verbesserung der Katalase-Expression

bewirkt und so den OS senken kann. Jedoch zeigte keine der untersuchten NPC-defizienten neuronalen Zellen eine Erhöhung der Katalase auf Proteinebene nach Behandlung mit Quercetin und Kaempferol im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (Abb. 28). Im Gegensatz dazu wurde bei der Mutation A eine signifikante Verringerung unter Behandlung mit Quercetin bzw. Kaempferol beobachtet (Abb. 28 A). Gleiches gilt für die Mutation C, die nach der Behandlung mit 100  $\mu$ M Kaempferol eine signifikante Reduktion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zeigte (Abb. 28 C). Unbeeinflusst von den Flavonoid-Behandlungen stellten sich die Mutation B und NPC2 dar (Abb. 28 B, D).



**Abb. 28: Unveränderte Katalase-Expression nach Behandlung der NDZs mit Flavonoiden** Mithilfe der Western Blot Analyse erfolgte nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit 150  $\mu$ M Quercetin bzw. 100  $\mu$ M Kaempferol sowie der DMSO-Kontrolle die Bestimmung des Katalase-Proteinniveaus (60kDa) mit  $\beta$ -Aktin als Referenzprotein (42 kDa) (N=3-5, n=3-8). Signifikante Reduktionen unter Behandlung wurden bei der Mutation A und C (A, C) beobachtet. Bei Mutation B (B) und bei der NPC2-Linie (D) waren keine Veränderungen zu sehen. Jeweilige, repräsentative Darstellungen der Katalase- und  $\beta$ -Aktin-Bande desselben Gels sind unter den Balkendiagrammen abgebildet. Im Anhang in Abb. 41 ist eine repräsentative Darstellung von Western Blots der vier Zelllinien unter Flavonoid-Behandlung zu finden.

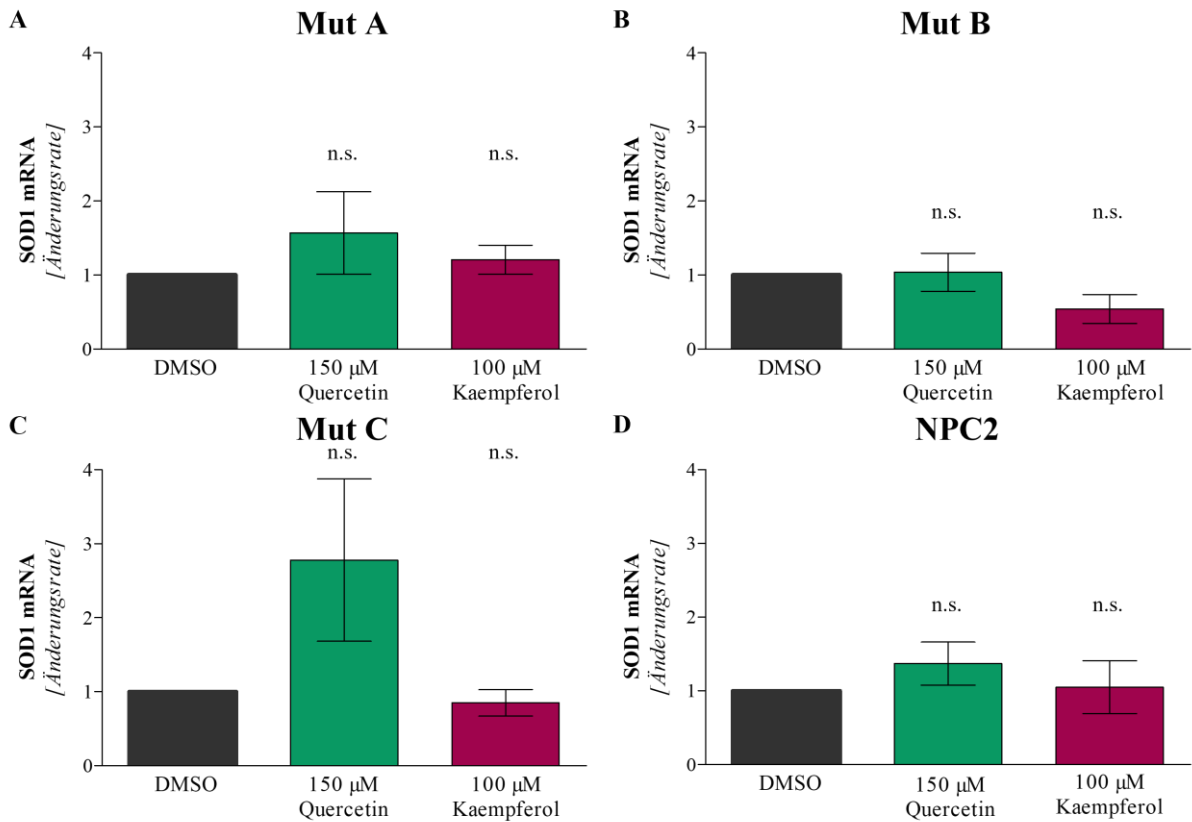
### 3.2.4 Betrachtung des enzymatischen Abwehrsystems nach hoch dosierter Flavonoid-Behandlung auf Genexpressionsebene

Nachdem vereinzelt Erhöhungen der Proteine SOD1 und SOD2 in NPC-defizienten neuronalen Zellen beobachtet wurden, blieb die Frage offen, ob die Unterschiede ebenfalls auf Genexpressionsebene vorhanden sind. Für die Untersuchung dieser Fragestellung erfolgten RT-qPCR-Analysen nach 24-stündiger Behandlung der NPC-defizienten NDZs mit 150  $\mu$ M Quercetin bzw. 100  $\mu$ M Kaempferol, wobei stets eine DMSO-Kontrolle mitgeführt wurde.

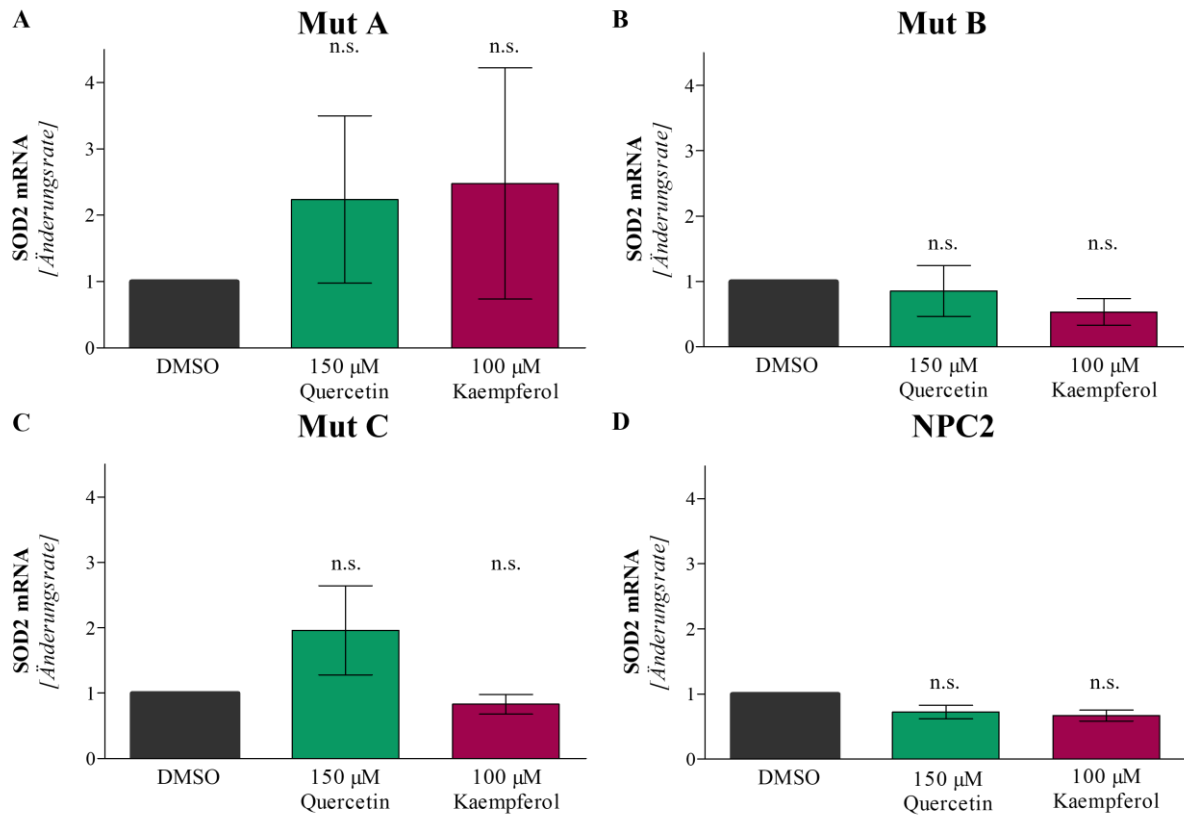
Bei der Expressionsanalyse des *SOD1*-Gens wurde in keiner untersuchten NPC-defizienten Zelllinie ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle beobachtet (Abb. 29). Bei der Mutation C wurde, entsprechend dem signifikant gesteigerten SOD1-Proteinniveau (Abb. 26 C), ebenfalls auf Genexpressionsebene eine Steigerung um 178 % der SOD1-Expression nach Quercetin-Behandlung festgestellt verglichen mit DMSO. Bei einem hohen Standardfehler war die Erhöhung nicht statistisch signifikant (Abb. 29 C). Eine geringe Steigerung der SOD1-Expression nach Quercetin-Behandlung ohne statistische Signifikanz war ebenfalls bei Mutation A zu erkennen, während Kaempferol keinen Effekt zeigte (Abb. 29 A). Sowohl die mRNA der SOD1 von Mutation B als auch von NPC2 blieben unbeeinflusst von den Flavonoid-Behandlungen verglichen mit der DMSO-Kontrolle (Abb. 29 B, D).

Die Analyse der SOD2-Genexpression der NPC-defizienten NDZs nach Quercetin- bzw. Kaempferol-Behandlung ergab keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (Abb. 30). Während bei Mutation B und in der NPC2-Linie das Niveau an SOD2 mRNA nach der Behandlung mit den Flavonoiden vergleichbar hoch war wie nach der DMSO-Behandlung (Abb. 30 B, D), wurde in Mutation A eine Steigerung ohne statistische Signifikanz unter Flavonoid-Behandlung bei hoher Abweichung vom Mittelwert beobachtet (Abb. 30 A). Nach Quercetin-Behandlung wurde bei der Mutation C ein um das Doppelte erhöhter SOD2 mRNA-Gehalt verglichen mit der DMSO-Kontrolle festgestellt, der nicht signifikant war (Abb. 30 C).





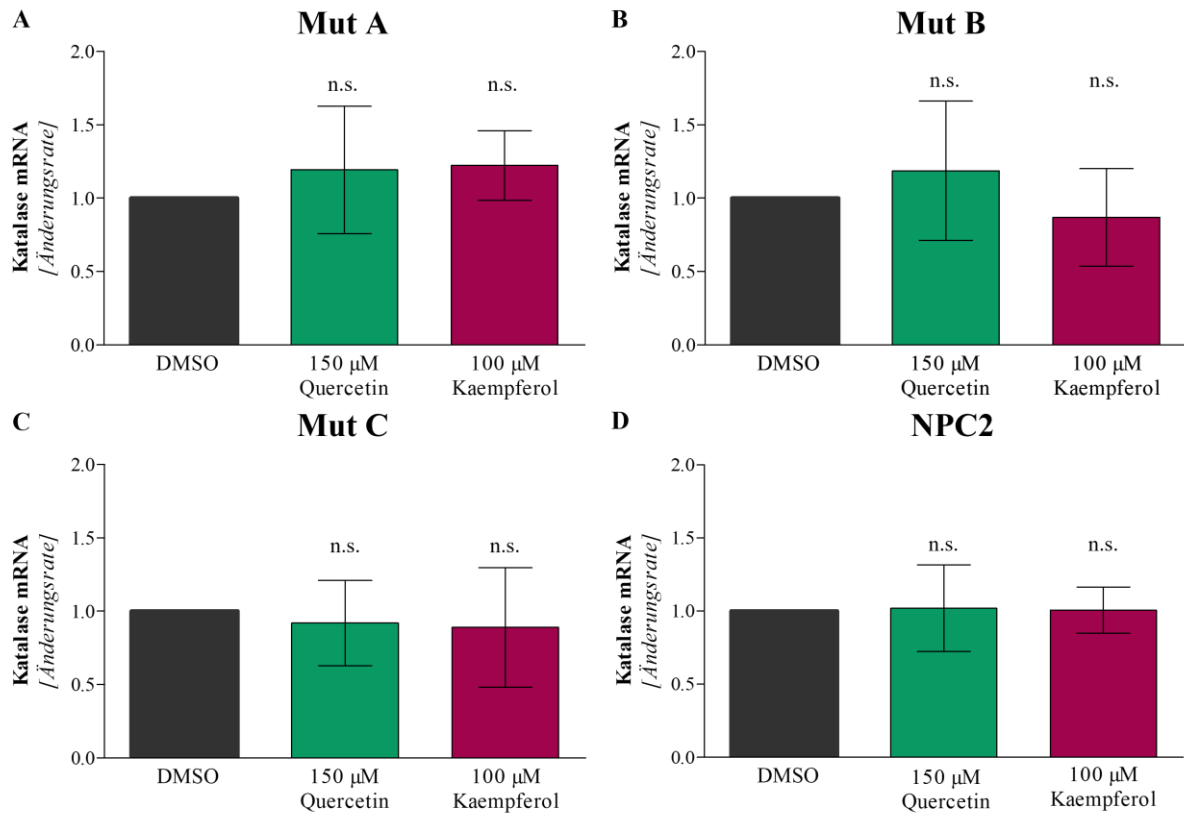
**Abb. 29: Fehlender Einfluss der Flavonoide auf die SOD1 mRNA-Expression der NDZs**  
Nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit den Testsubstanzen bzw. DMSO wurde der SOD1 mRNA-Gehalt mittels RT-qPCR bestimmt (N=3, n=3). Es wurden keine signifikanten Veränderungen der *SOD1*-Genexpression festgestellt.



**Abb. 30: Bestimmung der SOD2-Genexpression nach Flavonoid-Behandlung der NPC-defizienten NDZs**

Nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit den Testsubstanzen bzw. DMSO wurde der SOD2 mRNA-Gehalt mittels RT-qPCR bestimmt (N=3, n=3). Es wurden keine signifikanten Veränderungen der SOD2-Genexpression festgestellt.

Bei nachgewiesener verminderter Genexpression der Katalase in allen untersuchten NPC1-defizienten neuronalen Zellen erfolgte die Bestimmung der Katalase-Expression nach Behandlung der NDZs mit Quercetin und Kaempferol (Abb. 31). Entsprechend der Ergebnisse der Katalase-Expression auf Proteinebene nach Flavonoid-Behandlung wurden auf Genebene ebenfalls keine Erhöhungen der Katalase-Expression nach Behandlung mit den Testsubstanzen verglichen mit der DMSO-Kontrolle festgestellt (Abb. 31).



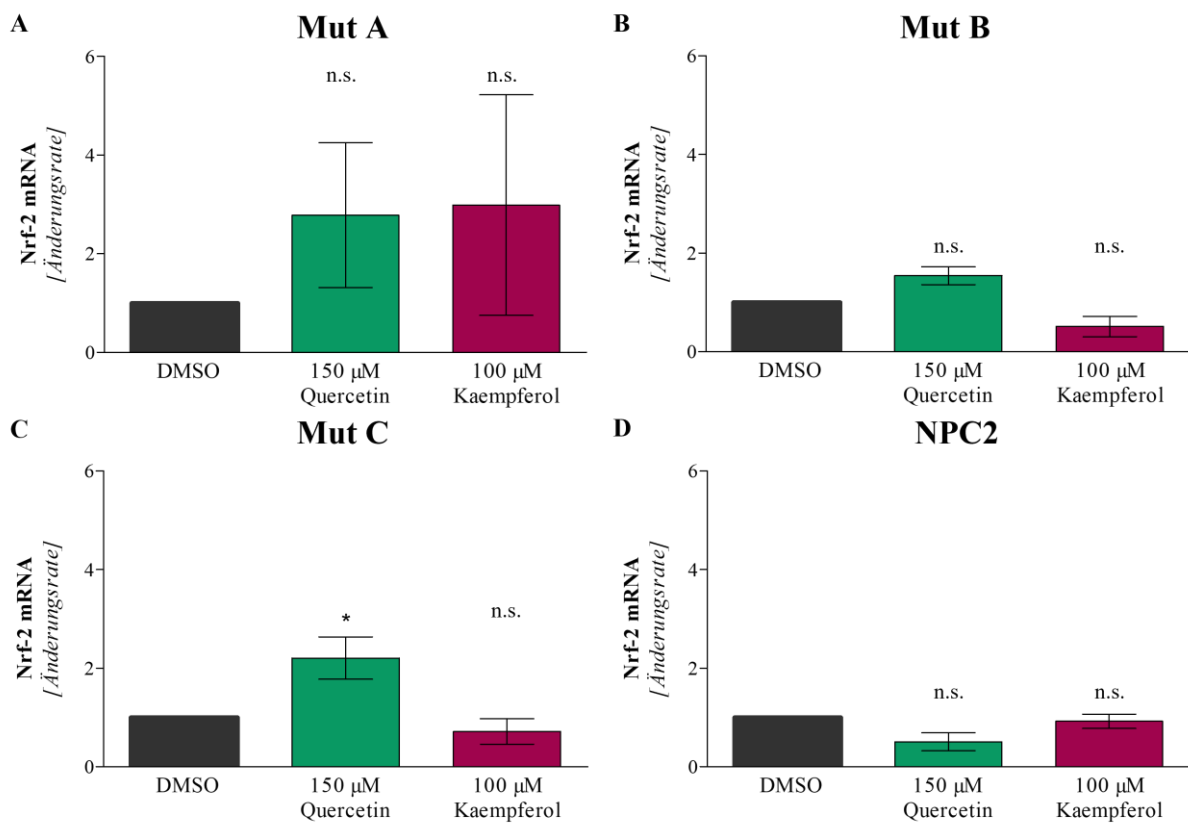
### Abb. 31: Keine Beeinflussung der Katalase durch Flavonoide

Nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit den Testsubstanzen bzw. mit der DMSO-Kontrolle wurde die mRNA der Katalase mittels RT-qPCR bestimmt (N=3, n=3). Es wurden keine signifikanten Veränderungen der *Katalase*-Genexpression nach Flavonoid-Behandlung verglichen mit der DMSO-Kontrolle beobachtet.

Des Weiteren wurden Parameter der regulatorischen Ebene betrachtet, die u. a. als wichtiger Signalweg bei der Expression von antioxidativen Enzymen eine Rolle spielen. Einer dieser Parameter ist der Transkriptionsfaktor Nrf-2, wobei in Arredondo et al. (2010) eine Steigerung der Nrf-2-Expression in primären zerebellären Körnerzellen über einen direkten Einfluss von Quercetin beschrieben wurde. In den hier verwendeten NDZs wurde bei allen drei NPC1-defizienten Zelllinien eine Steigerung unter Quercetin-Behandlung verglichen mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle beobachtet, wobei der Anstieg um 121 % bei der Mutation C signifikant war (Abb. 32). In der NPC2-Mutante zeigt sich keine Veränderung der Nrf-2-Expression unter Quercetin-Behandlung im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (Abb. 32 D). Nach Kaempferol-Behandlung zeigte Mutation A eine nicht signifikante Steigerung der Nrf-2 mRNA verglichen mit DMSO, wobei ebenfalls ein hoher Standardfehler gesehen wurde (Abb. 32 A). Die Nrf-2-Expression der Mutation B, Mutation C und von der NPC2-Linie waren nach Kaempferol-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nicht verändert (Abb. 32).

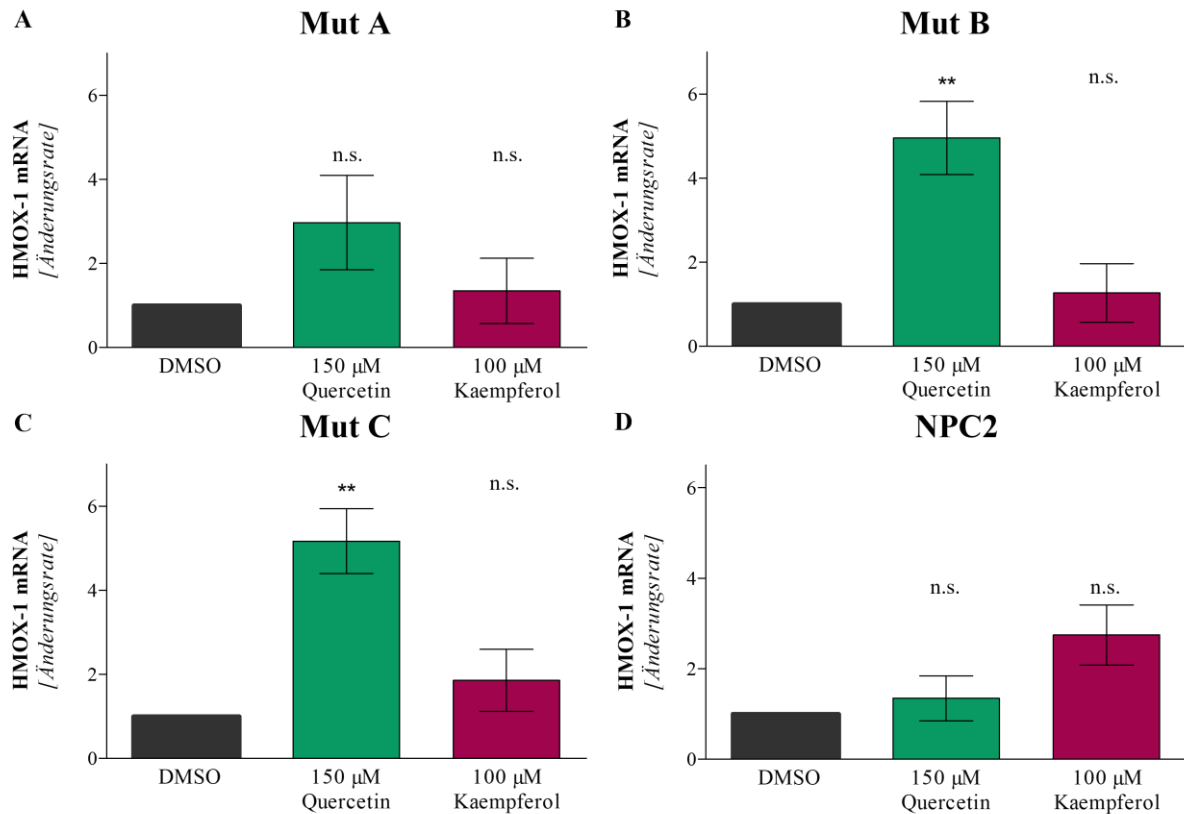
HMOX-1 (kurz für heme oxygenase 1), die ebenfalls durch Nrf-2 reguliert wird, wurde nach Behandlung der NDZs mit den Testsubstanzen auf Expressionsebene untersucht. Auffallend

war hierbei die signifikant gesteigerte HMOX-1-Expression nach der Behandlung mit 150  $\mu\text{M}$  Quercetin bei der Mutation B um 396 % (Abb. 33 B) sowie der Mutation C um 417 % (Abb. 33 C) verglichen mit der jeweiligen DMSO-Kontrolle. Des Weiteren wurde eine nicht signifikante Steigerung bei Mutation A nach Quercetin-Behandlung im Vergleich zu DMSO detektiert. Quercetin zeigte keinen Einfluss auf die HMOX-1-Expression in NPC2 (Abb. 33 D). Die Behandlung der NPC1-defizienten NDZs mit 100  $\mu\text{M}$  Kaempferol zeigte keinen Einfluss auf die HMOX-1-Expression verglichen mit DMSO, wohingegen bei der NPC2-Linie ein nicht signifikanter Anstieg der HMOX-1 mRNA im Vergleich zu DMSO beobachtet wurde (Abb. 33).



**Abb. 32: Expression von Nrf-2 nach Behandlung der NDZs mit Flavonoiden**

Nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit Quercetin bzw. Kaempferol unter Mitführung einer DMSO-Kontrolle wurde die mRNA von Nrf-2 mittels RT-qPCR bestimmt (N=3, n=3). Dabei war die mRNA-Expression nach Quercetin-Behandlung bei der Mutation C signifikant (C). Bei den Zelllinien Mutation A (A), Mutation B (B) und NPC2 (D) konnten keine signifikanten Veränderungen der *Nrf-2*-Genexpression nach Flavonoid-Behandlung verglichen mit der DMSO-Kontrolle festgestellt werden.



**Abb. 33: Beeinflussung der HMOX-1-Expression der NDZs durch Flavonoide**

Nach 24-stündiger Behandlung der NDZs mit Quercetin bzw. Kaempferol unter Mitführung einer DMSO-Kontrolle wurde die mRNA von HMOX-1 mittels RT-qPCR bestimmt (N=3, n=3). Die Mutation B (B) und Mutation C (C) zeigten nach Quercetin-Behandlung verglichen mit DMSO eine signifikante Steigerung der HMOX-1-Expression.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, oxidativen Stress in einem neuronalen Zellmodell des Morbus Niemann-Pick zu untersuchen. Hierzu wurden neurale, differenzierte Patienten-spezifische induzierte pluripotente Stammzellen mit verschiedenen Mutationen des *NPC1*- bzw. *NPC2*-Gens verwendet. Oxidativer Stress und Enzyme des antioxidativen Abwehrsystems wurden hierbei mithilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden analysiert. Oxidativer Stress wurde mittels DCFDA-Assay, Western Blot Bestimmung von nitrierten Tyrosylresten und der kolorimetrischen Bestimmung der SOD-Aktivität untersucht. Der Nachweis der Enzyme SOD1, SOD2 und Katalase des antioxidativen Abwehrsystems erfolgte auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse und auf Transkriptionsebene mit RT-q-PCR-Analysen. Des Weiteren wurde der Einfluss der antioxidativ wirksamen Substanzen Quercetin und Kaempferol auf die oben benannten Parameter untersucht. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- NPC1-defiziente, aber nicht NPC2-defiziente NDZs, wiesen eine erhöhte Menge an ROS auf.

- NPC1-defiziente, aber nicht NPC2-defiziente NDZs, besaßen einen erhöhten Anteil an nitrierten Tyrosylresten in Proteinen, insbesondere nGAPDH und nSOD2.
- NPC1-defiziente, aber nicht NPC2-defiziente NDZs, wiesen eine verminderte SOD-Aktivität auf.
- NPC1- und NPC2-defiziente NDZs zeigten keine Veränderung des Proteingehalts oder der Genexpression der SOD1 oder SOD2.
- NPC1-defiziente, aber nicht NPC2-defiziente NDZs, wiesen eine signifikante starke Reduktion der Katalase auf Protein- und Genexpressionsebene auf.
- Quercetin und Kaempferol erniedrigten, statistisch nicht signifikant, die ROS-Menge in NPC1- und NPC2-defizienten NDZs.
- Quercetin und Kaempferol hatten keinen Einfluss auf die SOD-Aktivität in NPC1- und NPC2-defizienten NDZs.
- Quercetin und Kaempferol beeinflussten die SOD1-, SOD2- und Katalase-Expression in NPC1- und NPC2-defizienten NDZs nicht.
- Quercetin, aber nicht Kaempferol, erhöhte die HMOX-1- und die Nrf-2-Expression in NPC1-defizienten NDZs, aber nicht in NPC2-defizienten NDZs.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die neuronalen NPC1-defizienten Zellen erhöhte OS-Parameter aufweisen, wohingegen bei den NPC2-defizienten Zellen keine Anzeichen für OS gefunden werden konnten. Herausstechend erscheint hierbei der Verlust der Katalase in NPC1-defizienten Zellen. Die Behandlung mit den Flavonoiden Quercetin und Kaempferol, zur Wiederherstellung der Balance zwischen ROS-Produktion und -Abbau, zeigte nur geringe Effekte bei der Betrachtung der OS-Parameter in NPC1-defizienten Zellen. Ein Effekt auf die NPC2-defizienten NDZs wurde weder erwartet noch beobachtet.

## 4 Diskussion

Morbus Niemann-Pick Typ C ist eine seltene, neuroviszerale Erkrankung mit dysfunktionalem NPC1- bzw. NPC2-Protein, woraus eine Akkumulation von Cholesterol und Sphingolipiden resultiert. Diese Anreicherung ist vornehmlich in Lysosomen zu finden, wobei sich die Lipide auch in anderen zellulären Organellen wie Mitochondrien anreichern (Kelly et al., 1993; Vanier et al., 1988). Bei einem erhöhten Gehalt an mitochondrialem Cholesterol in NPC1-Modellen (Balboa et al., 2017) sind kürzlich mitochondriale Dysfunktionen in NPC1- und NPC2-defizienten, neural differenzierten Zellen von Liedtke et al. (2022) beschrieben wurden. Daraus resultiert nicht nur ein hohes Maß an Veränderungen im gesamten Metabolismus der Zellen, sondern auch in der Regulation der Enzyme des antioxidativen Abwehrsystems, wodurch ein *circulus vitiosus* entsteht (Kennedy et al., 2013; Woë et al., 2016). Dabei ist oxidativer Stress als herausstechende Pathophysiologie nicht nur im Morbus Niemann-Pick Typ C zu sehen, sondern tritt ebenfalls in anderen neurodegenerativen Erkrankungen auf (Lin & Beal, 2006). Beispielsweise sind neben mitochondrialen Dysfunktionen erhöhte OS-Parameter mit resultierender Entzündung und Destruktion von neuralem Gewebe für die Encephalitis disseminata (ED), oder auch Multiple Sklerose (MS) genannt, beschrieben (Haider et al., 2011; Sadeghian et al., 2016). Aber auch im Morbus Parkinson und der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) sind neben den Nachweisen von veränderten Makromolekülen durch OS abweichende Regulationen von antioxidativen Enzymen im Vergleich zu Kontrollen beobachtet worden (Deas et al., 2016; Tam et al., 2019). In NP-C erscheint der therapeutische Ansatz vielversprechend, neben einer herkömmlichen Therapie wie Miglustat eine ergänzende Behandlung mit antioxidativen Substanzen durchzuführen, um ebendiesen OS zu mindern. Daher bestand das Ziel dieser Arbeit im Nachweis von OS und Veränderungen im enzymatischen Abwehrsystem der NPC-defizienten neuralen Zellen sowie der Testung von antioxidativ wirksamen Flavonoiden als potenzieller therapeutischer Ansatz des NP-C.

### 4.1 Oxidativer Stress als pathophysiologisches Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen

Oxidativer Stress ist definiert als Dysbalance zwischen der Synthese und dem Abbau reaktiver Moleküle, bei der die Produktion ebendieser überwiegt. Diese reaktiven Metaboliten greifen Biomoleküle wie die DNS, Proteine und Lipide an und führen zum ROS/ RNS induzierten Schaden. Allerdings muss ebenfalls betont werden, dass auch unter physiologischen Bedingungen 1-2 % des verwendeten Sauerstoffs zu reaktiven Molekülen konvertieren, was überdies essenziell für spezifische Signalwege ist, die zelluläre Funktionen modulieren (Apel & Hirt,

2004; Uttara et al., 2009). Eine erhöhte Produktion von reaktiven Molekülen steht bei vielen Erkrankungen in der Pathogenese im Vordergrund. Beim Diabetes mellitus beispielweise spielt OS in der Entstehung und Progression der Erkrankung eine fundamentale Rolle. Die mit erhöhten OS-Parametern einhergehenden zellulären Veränderungen induzieren insbesondere beim Diabetes mellitus Typ 2 vermehrt Komplikationen wie Schlaganfälle, Neuropathien, Retinopathien und Nephropathien (Asfandiyarova et al., 2006; Collier et al., 1992; Phillips et al., 2004). Darüber hinaus spielt OS eine Schlüsselrolle bei Ischämien wie beispielsweise beim Myokardinfarkt. Die Arbeitsgruppe Calvieri et al. (2018) weist auf die wichtige Rolle von OS zusammen mit der Plättchenaktivierung bei der Thrombusbildung und dem -wachstum im Rahmen von myokardialen Ischämien hin. Dies sei in der progressiven Erhöhung der OS-Marker bei solchen Patienten zu sehen (Calvieri et al., 2018). Ebenfalls wurde bei diversen Krebsarten ein großer Einfluss des OS in der Entstehung und Progression der Erkrankung bestätigt. Erhöhte ROS-Werte, wie sie auch in dieser Arbeit für NP-C1 nachgewiesen wurden, aktivieren Tumor fördernde Signalwege, die das Zellüberleben und die unregelte zelluläre Proliferation stimulieren. Dies führt in den Tumorzellen zu DNS-Schäden und genetischer Instabilität. Allerdings ist der Reduktions-Oxidationsstatus bei Krebszellen komplexer. Hier würden zu hohe Spiegel an reaktiven Molekülen zum programmierten Zelltod führen wie in neuronalen Zellen von neurodegenerativen Erkrankungen. Auch für NP-C wurde eine erhöhte Apoptoserate beschrieben (Klein et al., 2011; Wu et al., 2005). In Tumorzellen führen spezielle Signalwege zu einer Erhöhung von antioxidativen Enzymen und wirken auf diese Weise einem Zelluntergang entgegen. Somit entsteht ein erhöhter, jedoch kein zu hoher Gehalt an reaktiven Molekülen, sodass die Tumorzellen sich ungerichtet vermehren können (Arfin et al., 2021). Darüber hinaus können reaktive Moleküle ebenfalls direkt die DNS angreifen und Chromosomeninstabilität sowie Mutationen hervorrufen, sodass es zur Karzinogenese kommt (Du et al., 1994).

Nicht überraschend ist die hohe Relevanz von OS bei neurologischen Erkrankungen. Insbesondere im Gehirn führen begünstigende Faktoren zu einer überschießenden Synthese von reaktiven Metaboliten sowie zu einer Hypersensibilität gegenüber OS. Einer dieser Faktoren ist der hohe Energiemetabolismus mit einer sehr hohen aeroben ATP-Produktion. Das Gehirn macht 2 % des Körpergewichts aus, verbraucht aber 20 % des Sauerstoffs des Körpers (Schipper, 2004). Einen weiteren begünstigenden Faktor für die Produktion von ROS und RNS stellt der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren dar. Durch in Beschlag nehmen eines Elektrons einer Doppelbindung der ungesättigten Fettsäure und der somit ausgelösten Kettenreaktion durch eine erneute Bildung eines Radikals, kommt es zur Modifizierung von vielen Lipidmolekülen durch ein einziges Hydroxylradikal. Dieser Vorgang wird auch als Lipidperoxidation



bezeichnet (Butterfield et al., 2002; Löffler et al., 2007). Die Modifizierung der Lipide führt zur Reduktion der Membranfluidität sowie zu veränderten zellulären Funktionen bis hin zum Zelluntergang (Cazzola et al., 2004; Pegoretti et al., 2020). Bei NP-C wurde äquivalent dazu eine verminderte Membranfluidität beobachtet, die in einem gestörten Transport von antioxidativ wirksamen Molekülen resultiert (Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005; Torres et al., 2017). Cerebral führen zusätzlich der Metabolismus der Neurotransmitter und der hohe Eisen-gehalt, entsprechend der Fenton-Reaktion, ebenfalls zur Produktion vieler reaktiver Metabolite (Floyd & Carney, 1992; Gilgun-Sherki et al., 2001; Lloyd et al., 1997). In anderen Körperregi-onen haben reaktive Moleküle eine geringe Überlebensdauer durch das umfangreiche antioxi-dative Abwehrsystem einer Zelle. Allerdings ist im zentralen Nervensystem im Vergleich zu anderen Organen das Maß an antioxidativen Abwehrmechanismen geringer, insbesondere die Enzyme Glutathionperoxidase und Katalase, die in dieser Arbeit näher betrachtet wurde. Dieses Ungleichgewicht zwischen hoher oxidativer Belastung und geringen Abwehrmechanismen führt bei den postmitotischen Neuronen und Gliazellen zu zellulären Schäden (Cadet & Brannock, 1997). Da zu viele reaktive Moleküle zu einer Aktivierung des programmierten Zell-tods führen, wird ein Untergang von Neuronen hervorgerufen (S. Wang et al., 2017; Whitemore et al., 1994). Dieser Vorgang wird als Neurodegeneration bezeichnet. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in neurodegenerativen Erkrankungen OS eine essenzielle Rolle in der Pathogenese spielt wie in der chronisch-entzündlich demyelinisierenden ZNS-Erkrankung Encephalomyelitis disseminata (ED) oder auch Multiple Sklerose (MS) genannt. Einer der un-tersuchten OS-Parameter ist die ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Beladung der Zellen mit DCFDA. Äquivalent zu den hier demonstrierten Untersuchungen der NPC-defizienten NDZs konnte auch in ED-erkrankten Zellen ein erhöhter ROS-Gehalt aufgezeigt werden (De Rasmio et al., 2020). Darüber hinaus ist in immunhistochemischen Untersuchungen von post mortem entnommenem ZNS-Gewebe von ED-Patienten vermehrt Nitrotyrosin als Marker für OS-ver-mittelten Schaden zu sehen (Cross et al., 1998). Dies ist im Einklang mit den hier beobachteten erhöhten Werten an nitrierten Proteinen in NPC-defizienten NDZs. Weiterhin gemeinsam ha-ben ED und NP-C das Vorkommen von Veränderungen im antioxidativen Abwehrsystem. So ist analog zu der in dieser Arbeit gezeigten, verminderten SOD-Aktivität ebenfalls in ED er-krankten Zellen eine reduzierte SOD1-Aktivität vorhanden (Zagórski et al., 1991). Dabei be-schreiben neuste Studien die Beteiligung der SOD1 in wichtigen pathophysiologischen Signal-wegen in ED (Rubino et al., 2021), die ebenfalls in dem Pathomechanismus von NP-C einen Einfluss spielen könnten. Wie auch in NP-C sind mitochondriale Veränderungen als wahr-scheinliche Hauptquelle von reaktiven Molekülen ebenfalls in ED zu sehen (Liedtke et al.,

2022; Sadeghian et al., 2016). OS ist in ED erkrankten Zellen involviert in der Destruktion von Myelin, axonaler Degeneration und Inflammation. Interessanterweise korreliert der Grad des oxidativen Schadens mit dem Ausmaß der Entzündung (Haider et al., 2011). Obwohl in NP-C erhöhte Entzündungszeichen zu sehen sind (Walkley & Suzuki, 2004), wurde eine Korrelation zwischen der Entzündung und dem oxidativen Schaden bisher nicht untersucht. In der neurodegenerativen Krankheit Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) wird, trotz unbekanntem Pathomechanismus, eine exzessive ROS-Produktion bei ineffektivem antioxidativem Abwehrsystem beschrieben, wie es auch in den hier untersuchten NPC-defizienten Zellen zu beobachten ist. Somit ist OS involviert in dem für die Erkrankung typischen Absterben von Motoneuronen (Ferrante et al., 1997; Tam et al., 2019). Wie in den hier durchgeführten Experimenten mit NPC-defizienten Zellen suggeriert ebenfalls in ALS erkrankten neuronalen Zellen eine Erhöhung ohne statistische Signifikanz von 3-Nitrotyrosin als OS-Marker eine Beteiligung von Peroxynitrit-vermitteltem Zellschaden in der Pathogenese von ALS (Fang et al., 2010). Weitere Studien zeigen oxidative Schäden an Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und der DNS in neuronalem Gewebe von ALS-Patienten (Cunha-Oliveira et al., 2020; Fang et al., 2010; Ferrante et al., 1997). Für die genetisch determinierte Form der ALS sind verschiedene Mutationen beschrieben, wobei Mutationen in der SOD1 zu diesem Spektrum gehören. Durch *SOD1*-Mutationen konvertiert das Enzym zu einem pro-oxidativen Protein mit erhöhter ROS-Produktion (Lin & Beal, 2006) und verminderter SOD-Aktivität, wie es in post mortem Studien von kortikalen Zellen und Blutzellen der genetischen Formen der ALS zu sehen ist (Gilgun-Sherki et al., 2001). Bei ebenfalls verminderter SOD-Aktivität in NP-C unterscheidet sich die SOD1-Expression von der in ALS, die bei den hier verwendeten NPC-defizienten Zellen nicht signifikant verändert ist. Das lässt vermuten, dass die SOD1-Expression in NP-C nur einen geringen Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung hat. Auch der Morbus Alzheimer zeigt, wie die anderen neurodegenerativen Erkrankungen, erhöhte OS-Marker. So konnte ein erhöhter ROS-Gehalt im Morbus Alzheimer über die ebenfalls hier verwendete Substanz DCFDA detektiert werden (Yatin et al., 1999). Hierbei führen die für die Erkrankung charakteristischen Amyloid-Ablagerungen zur Oxidation von Biomolekülen wie Lipiden und Proteinen und somit zur Neurotoxizität (Butterfield et al., 2002; Koppal et al., 1998; Sultana, Boyd-Kimball et al., 2006). Darüber hinaus sind Veränderungen von antioxidativen Enzymen für Morbus Alzheimer beschrieben. In verschiedenen Gehirnarealen konnte beispielsweise ein erhöhter Gehalt der SOD und der Katalase, als potenzieller Kompensationsmechanismus gegen OS, gezeigt werden (Lovell et al., 1995). Die Expression der Katalase sowie die SOD-Aktivität zeigen sich auch in dieser Arbeit mit NPC-defizienten Zellen verändert. Jedoch sind hier sowohl die SOD-Aktivität

als auch der Katalase Gehalt vermindert, sodass nicht von einem Kompensationsmechanismus in den neuronalen NPC-defizienten Zellen ausgegangen werden kann. Vielmehr scheinen die Veränderungen im antioxidativen Abwehrsystem zu einer Aggravation des OS zu führen. Das letzte, hier angeführte Beispiel für die Beteiligung von OS in neurodegenerativen Erkrankungen ist der Morbus Parkinson. Diese Erkrankung ist charakterisiert durch Ablagerungen von aus  $\alpha$ -Synuklein bestehenden Lewy Körperchen. Neben diesen Proteinaggregaten stellen wie auch im NP-C mitochondriale Veränderungen eine Hauptquelle von ROS dar (Banerjee et al., 2010; Devi et al., 2008; Woß et al., 2016). Analog zu NP-C geht der erhöhte Gehalt an  $\alpha$ -Synuklein einher mit einer vermehrten Bildung von 3-Nitrotyrosin in Proteinen (C. Y. Chung et al., 2013), was die Funktion der Proteine stark beeinflussen kann. Aber auch veränderte antioxidative Enzyme sind für den Morbus Parkinson beschrieben wie Fehlfaltungen der SOD1 mit folgender Dysfunktion, ähnlich wie es bei ALS zu sehen ist (Trist et al., 2017). Der daraus resultierende OS führt zum progressiven Verlust von dopaminergen Neuronen (Bose & Beal, 2019; Dagda et al., 2009; Deas et al., 2016).

Charakteristisch für den Morbus Niemann-Pick als neurodegenerative Erkrankung ist die Degeneration von Purkinjezellen im Kleinhirn, die früh einsetzt und sich schnell entwickelt. Zusätzlich degenerieren Neurone im Thalamus, Hirnstamm sowie in geringerem Ausmaß ebenfalls im Hippocampus, Neostriatum und Neokortex (Tang et al., 2010). Allerdings ist bisher der pathogenetische Mechanismus der Degeneration der speziellen Neurone noch nicht bekannt. Wie auch in den beschriebenen anderen neurodegenerativen Erkrankungen spielt OS in NP-C eine elementare Rolle in den pathophysiologischen Prozessen der Krankheitsentstehung und -progression. So konnten in verschiedenen in vivo und in vitro NP-C Modellen erhöhte OS-Parameter und Veränderungen im endogenen und exogenen antioxidativen Abwehrsystem nachgewiesen werden. Jedoch erfolgten zum derzeitigen Kenntnisstand zuvor keine Untersuchungen von OS in NP-C in einem humanen neuronalen Zellmodell. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene OS-Parameter wie die direkte ROS-Messung und die durch OS induzierte Nitrierung von Proteinen untersucht. Zudem wurde das antioxidative Abwehrsystem begutachtet und insbesondere die Expression der Schlüsselenzyme SOD und Katalase bestimmt. Verwendet wurden hierfür die gut charakterisierten, neural differenzierten Zellen, die von NPC-Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen stammen (Peter, Trilck et al., 2017; Trilck et al., 2013, 2017; Völkner et al., 2019).

#### **4.1.1 Oxidativer Stress in neuronalen NPC1-defizienten Zellen**

Als direkter Parameter konnten in allen drei *NPC1*-Mutanten signifikant erhöhte ROS-Werte als Indikator für OS beobachtet werden über eine Beladung der Zellen mit DCFDA und

anschließender Fluoreszenzmessung. Die verwendete Methode wird als zuverlässiger Nachweis von ROS in vielen Studien zur Bestimmung des Maßes an OS genutzt (De Rasmio et al., 2020; Eruslanov & Kusmartsev, 2009; Yatin et al., 1999). Die Bestimmung des ROS-Niveaus gilt als herausstechendes Kriterium in der Beurteilung, ob OS in den untersuchten Zellen vorliegt. So zeigen andere neurodegenerative Erkrankungen ebenfalls erhöhte ROS-Werte. Für periphere Blutzellen von ED-Patienten konnte über den Fluoreszenzfarbstoff DCFDA ein erhöhter ROS-Gehalt nachgewiesen werden (De Rasmio et al., 2020) wie auch in hippocampalen Zellen von an Morbus Alzheimer leidenden Ratten (Yatin et al., 1999). Die Erhöhung von ROS in den verwendeten NPC1-defizienten NDZs steht im Einklang mit anderen Studien in NP-C, in denen verschiedene Modelle untersucht wurden. In hippocampalen Neuronen von dem weit verbreiteten BALB/c-Mausmodell sowie in hippocampalen Neuronen von Ratten, die zur Induktion des NPC1-Phänotyps mit U18666A behandelt wurden, konnte eine Anreicherung von DCF über dessen fluoreszierende Eigenschaften nach Oxidation lichtmikroskopisch dargestellt werden (Klein et al., 2011). Unter Verwendung des *Amplex Red*-basierenden, fluorometrischen Tests zeigen auch NPC1-defiziente CHO-Zellen gesteigerte ROS-Werte (Kennedy et al., 2014). In NPC1-defizienten Patienten-spezifischen Fibroblasten sind durchflusszytometrisch mit dem DCFDA-Assay ebenfalls erhöhte ROS-Werte detektiert wurden (Zampieri et al., 2009).

Als weiterer Marker für reaktive Moleküle ist ein erhöhter Gehalt an nitrierten Proteinen bestimmt worden. Durch eine erhöhte Anzahl an reaktiven Molekülen reagiert das inerte NO mit Superoxiden, wodurch Peroxynitrit entsteht. Da Peroxynitrit sehr reaktiv ist, attackiert es direkt Biomoleküle, die dann eine Bindung eingehen. Bei Proteinen geschieht dies vornehmlich an Tyrosylresten, was über spezifische Antikörper detektiert werden kann und somit eine Quantifizierung der RNS indirekt möglich macht (Beckman, 1996). So wurde ein erhöhtes Maß an nitrierten Proteinen, als Zeichen für ein gesteigertes RNS-Niveau und somit als Stressparameter, in den NPC1-defizienten neural differenzierten Zellen beobachtet. Äquivalent dazu konnte ebenfalls in anderen neurodegenerativen Erkrankungen die vermehrte Nitrotyrosin-Bildung detektiert werden. Neben den beschriebenen, erhöhten ROS-Werten als direktem OS-Marker konnte in neuronalem Gewebe immunhistochemisch vermehrt RNS über die Nitrotyrosin-Färbung in ED-Patienten gesehen werden (Cross et al., 1998). Zusätzlich zeigen Anreicherungen von  $\alpha$ -Synuklein wie beim Morbus Parkinson als  $\alpha$ -Synukleinopathie einen erhöhten Gehalt an nitrierten Proteinen, die über den Nachweis von 3-Nitrotyrosin mittels Western Blot Analyse wie in dieser Arbeit belegt wurden (C. Y. Chung et al., 2013). Für die neurodegenerative Erkrankung ALS ist ebenfalls in Rückenmarkszellen ein erhöhter Gehalt an 3-Nitrotyrosin beschrieben (Fang et al., 2010), der Ausdruck von OS ist. Die in den hier verwendeten, humanen

NPC1-defizienten NDZs detektierten, erhöhten Werte an nitrierten Proteinen stehen im Einklang mit weiteren Studien in NP-C. Im murinen NPC1-Modell erfolgte mehrfach der Nachweis von Tyrosin-Veränderungen durch einen erhöhten Gehalt an reaktiven Molekülen. So zeigen Immunfluoreszenzfärbungen mit Nitrotyrosin von Thalami von NPC1<sup>-/-</sup> Mäusen eine vermehrte Färbung als Marker von oxidativem Schaden in NP-C (D. Smith et al., 2009). Nochmals bestätigt wurde das gesteigerte RNS-Niveau in NP-C über immunhistochemische Färbungen von Nitrotyrosin in Kleinhirnlisaten von NPC1<sup>-/-</sup>-Mäusen (Marín et al., 2014; Torres et al., 2017). Im Kontrast zu den zuvor beschriebenen Studien, die Immunfluoreszenzfärbungen nutzten, erfolgte die Untersuchung von nitrierten Proteinen in dieser Arbeit mittels semiquantitativer Western Blot Analyse. Dies wurde zuvor ebenfalls durch Klein et al. (2011) an murinen NPC1-defizienten Kleinhirnlisaten durchgeführt, die zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen mit Nitrotyrosin anfertigte. Beide Nachweismethoden spiegeln einen deutlich erhöhten Gehalt an nitrierten Proteinen in NPC-defizienten Zellen wider (Klein et al., 2011). In den in dieser Arbeit verwendeten NPC-defizienten NDZs konnte insbesondere in Mutation B und Mutation C ein intensives Bandenmuster gesehen werden, was ein starker Hinweis für ein erhöhtes RNS-Niveau in diesen neuronalen Zellen ist. Um das Ausmaß des oxidativen Schadens noch genauer zu quantifizieren, erfolgte die Begutachtung von dem nitrierten GAPDH-Anteil (nGAPDH). GAPDH wird als Teil der Glykolyse in jeder Zelle exprimiert (Barber et al., 2005) und bei einem erhöhten RNS-Niveau nitriert mit resultierender verminderter Aktivität des Enzyms (Buchczyk et al., 2003; Xiao et al., 2005). In den bereits bei der Betrachtung des Bandenmusters für nitrierte Proteine auffälligen NPC1-defizienten Zelllinien ergab sich ein erhöhtes Verhältnis von nGAPDH/ GAPDH, was die Annahme auf ein erhöhtes Stressniveau in diesen Zellen bekräftigt. Damit einher gehen Studien, die wahrscheinlich als dessen Folge auf einen verminderten ATP-Gehalt sowie erhöhte Laktatwerte in NPC1-defizienten Zellen hinweisen (Kennedy et al., 2014; Woś et al., 2016). Aus der Datenlage geht hervor, dass neben der zuverlässigen direkten ROS-Messung über die Fluoreszenz von DCFDA die Betrachtung von nitrierten Proteinen ein weiterer verlässlicher Marker für OS ist. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen somit, dass die untersuchten neuronalen NPC1-defizienten Zellen, die von Patienten-spezifischen iPS abgeleitet wurden, an einem hohen Maß an OS leiden.

Eine wichtige Quelle für die nachgewiesenen reaktiven Metaboliten sind dysfunktionale Mitochondrien (Vázquez et al., 2012). In der lysosomalen Speichererkrankung NP-C konnte gezeigt werden, dass nicht nur in Lysosomen, sondern auch in Mitochondrien eine Cholesteroll-Akkumulation stattfindet (Balboa et al., 2017; Woś et al., 2016). Derzeit wird ein Cholesterolltransport von den Lysosomen zu Mitochondrien über MLN64 und das NPC2-Protein angenommen

(Balboa et al., 2017; Charman et al., 2010; Kennedy et al., 2014). Bei erhöhtem Anteil an Cholesterin ist die Membranfluidität der mitochondrialen Membran verringert (Colell et al., 2003). Dies geht einher mit einem verminderten, mitochondrialen Membranpotential in NPC1-defizienten CHO-Zellen (Balboa et al., 2017). Dadurch entsteht eine Störung des Energiemetabolismus mit reduzierter ATP-Produktion (Woś et al., 2016; Yu et al., 2005). Aufgrund des verminderten ATP-Spiegels entstehen Beeinträchtigungen des Neuritenwachstums und somit eine erhöhte Anfälligkeit für die hier nachgewiesenen, vermehrt vorkommenden Sauerstoffradikale (Yu et al., 2005). Allerdings zeigt die kürzlich erschienene Studie von Liedtke et al. (2022) in den hier verwendeten humanen neuronalen NPC-defizienten Zellen keine signifikante Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials im Gegensatz zu morphologischen Veränderungen der Mitochondrien, die durch besagte Arbeitsgruppe gesehen wurden. So sind kleinere Mitochondrien mit reduzierter Länge und Breite zu beobachten in NPC1- und NPC2-defiziente Zellen (Liedtke et al., 2022). Durch die bereits erwähnte Verminderung der Membranfluidität kommt es überdies zum gestörten Transport von GSH aus dem Zytosol in die Mitochondrien (Fernandez-Checa & Kaplowitz, 2005; Torres et al., 2017). Durch den hervorgerufenen, reduzierten mitochondrialen GSH-Gehalt, als Teil des antioxidativen Abwehrsystems, verschiebt sich das Reduktions-Oxidations-Gleichgewicht weiter Richtung ROS-Überschuss, wie es in dieser Arbeit für NP-C1 ermittelt wurde. Mitochondrien stellen einen Hauptentstehungsort für ROS dar (Murphy, 2009). So erscheint eine gestörte Beseitigung von Mitochondrien, was auch Mitophagie genannt wird, die ROS-Konzentration und damit den durch ROS-induzierten Schaden, wie nitrierte Proteine, zu erhöhen. Beide Komponenten wurden, wie zuvor dargestellt, für die NPC1-defizienten NDZs nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe Liedtke et al. (2022) beobachtete ebensolche Störungen der Mitophagie sowie einen reduzierten Transport von Mitochondrien in den hier verwendeten NPC1- und NPC2-defizienten Zellen. Dadurch kann die Zelle nicht adäquat auf mitochondrialen Schaden reagieren und defekte Mitochondrien akkumulieren in der Zelle (Elrick et al., 2012; Lieberman et al., 2012; Liedtke et al., 2022). Solche Defekte führen zur Akkumulation von reaktiven Molekülen. Dazu gehören die in dieser Arbeit nachgewiesene ROS-Erhöhung und die gesteigerte RNS-induzierte Proteinnitrierung in allen NPC1-defizienten neuronalen Zellen. Aber nicht nur der Abbau der Mitochondrien ist in NP-C defekt, sondern auch die Beseitigung anderer zellulärer Komponenten ist betroffen, was unter dem Begriff Autophagie zusammenfasst wird. Autophagie ist ein physiologischer, kataboler Prozess zum Recyclen von Proteinen und Organellen sowie zur Elimination dysfunktionaler zellulärer Bestandteile (Lionaki et al., 2015). Störungen der Autophagie sind in vielen neurodegenerativen Erkrankungen zu sehen, wie auch in den verwendeten NPC-defizienten NDZs (Liedtke et

al., 2022; Liedtke, Völkner & Jürs et al., 2021). Zusätzlich trägt die Autophagie ebenfalls zur Aktivierung von zellulären Signalwegen bei, die auf Stress reagieren (Jiménez-Moreno et al., 2017). Einer dieser Signalwege umfasst das multifunktionale zytoplasmatische Protein p62, das während der Autophagie-Induktion an das zu degradierende Material bindet. In einem p62-Knockout Modell wurde eine verminderte Expression des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf-2 nach oxidativer Stressinduktion beschrieben. Umgekehrt gibt es auch Hinweise, dass eine erhöhte Nrf-2-Expression ebenfalls die p62-Expression steigert (Gureev et al., 2020; W. Liao et al., 2019). In dem hier verwendeten Zellmodell konnte eine verminderte p62 Expression gesehen werden in NPC-defizienten Zellen (Liedtke et al., 2022), was konsekutiv zu einer verminderten Nrf-2-Expression führen könnte. Somit könnte ein enger Zusammenhang zwischen hier beobachteten Veränderungen des antioxidativen Abwehrsystems, insbesondere der verminderten SOD-Aktivität und der stark reduzierten Katalase-Expression, in NPC-defizienten NDZs zu den beobachteten Veränderungen der Autophagie bestehen. Denn Nrf-2 als wichtiger Regulator für das antioxidative Abwehrsystem erhöht bei dessen Aktivierung unter anderem die Katalase und SOD-Expression (J. Chen et al., 2014).

#### **4.1.2 Veränderung des antioxidativen Abwehrsystems in NP-C1**

Das zelluläre System kann auf viele Wege auf OS reagieren. Einer der wichtigsten Akteure zur enzymatischen Bekämpfung des OS stellt hierbei die SOD dar. Diese ist ubiquitär im Gehirn vorhanden und katalysiert die Dismutation von Superoxidradikalen in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und molekularem Sauerstoff (Fridovich, 1997; Löffler et al., 2007). In dieser Arbeit wurde die SOD als elementarer Bestandteil des antioxidativen Abwehrsystems im Hinblick auf ihre Aktivität sowie auf die Expression der Unterformen SOD1 und SOD2 untersucht. Hierbei ergab sich eine signifikante Reduktion der SOD-Aktivität in allen drei NPC1-defizienten neuronalen Zelllinien. Zuvor wurde die SOD-Aktivität in mehreren Studien in verschiedenen Zellmodellen betrachtet, wobei sich inkonsistente Ergebnisse darstellten. In Erythrozyten von Patienten ergaben sich keine Veränderungen der SOD-Aktivität (Ribas et al., 2012), während sie in CHO-Zellen mit einem NPC1-Knockout erhöht war (Dominko et al., 2020), was als zellulärer Kompensationsmechanismus gedeutet werden kann. Eine Verminderung der SOD-Aktivität wurde wie in den hier untersuchten NPC1-defizienten NDZs in einem Hefemodell des NP-C1 gefunden. Dort zeigte sich, im Gegensatz zu hier vorliegenden Studie, bei unveränderter Aktivität der gesamten SOD eine verminderte SOD2-Aktivität (Vilaça et al., 2014). Eine Ursache für die verminderte SOD-Aktivität in NP-C1 könnte eine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins im Rahmen von posttranslationalen Modifizierungen sein. Dabei spielen strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum eine wichtige Rolle, die zu einer verminderten

Aktivität oder gar zum Verlust der Funktionstüchtigkeit des Proteins führen. Erhöhte Werte an reaktiven Molekülen, die in OS münden, führen häufig zu solchen funktionsverändernden Modifizierungen an Makromolekülen, insbesondere an Proteinen. Mit dem Nachweis eines erhöhten Anteils an nitrierten Proteinen in NPC1-defizienten NDZs, die durch ein erhöhtes Maß an RNS entstanden sind, wurden bereits solche funktionsverändernden Modifizierungen an Proteinen gezeigt. Somit stellte sich die Frage, ob die nachgewiesene, verminderte SOD-Aktivität in NP-C1 durch eine erhöhte Nitrierungsrate der SOD1 oder SOD2 zu erklären ist. Hierbei gilt insbesondere die SOD2 als Hauptziel für Nitrierungen an Tyrosylresten im aktiven Zentrum des Enzyms, wodurch die katalytische Aktivität inaktiviert wird (Macmillan-Crow & Thompson, 1999; Yamakura et al., 1998). Für die SOD1 ist ebenfalls eine Nitrierung an Tyrosylresten beschrieben, die im Gegensatz zu der SOD2 nicht zu einer Inaktivierung der enzymatischen Aktivität des Proteins führen soll (Ischiropoulos et al., 1992; Yamakura et al., 1998). Für diese Fragestellung wurde das Verhältnis von nitrierter SOD1 (nSOD1) und der Gesamtproteinmenge der SOD1 (nSOD1/SOD1) sowie nSOD2/SOD2 in den NPC1-defizienten NDZs bestimmt. In keiner der drei *NPC1*-Mutanten konnte eine signifikant erhöhte Nitrierung der SOD1 gesehen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein erhöhter Anteil an nitrierter SOD2 in den NPC1-defizienten neuronalen Zellen. Durch die erhöhte Anzahl an Tyrosylresten im aktiven Zentrum der SOD2 mit konsekutiver Nitrierung dieser ist eine folgende Verminderung der SOD Aktivität plausibel, insbesondere da die SOD2 die wichtigste Unterform der SOD für den Erhalt der zellulären Funktionen ist (Miao & St. Clair, 2010). Zur weiteren Untersuchung des SOD Status der hier verwendeten NPC1-defizienten Zelllinien erfolgte zur Proteinquantifizierung eine Western Blot Analyse sowie eine Untersuchung des Expressionsstatus mittels RT-qPCR von der SOD1 und der SOD2. Für die Regulation des OS und des Überlebens der Zelle ist die SOD2, die auch als Mn-SOD bekannt und hauptsächlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, von höchster Relevanz (Carlioz & Touati, 1986; Lebovitz et al., 1996). Allerdings ergaben die Untersuchungen an den iPS-basierten NPC1-defizienten Zellen keine Änderung der SOD1- oder SOD2-Expression, weder auf Protein- noch auf Genexpressionsebene. Die Literatur zu der SOD-Expression in NP-C1 ergab inkonsistente Ergebnisse. In Kleinhirnlisaten eines murinen NP-C1-Modells wurde eine erhöhte SOD2-Proteinexpression detektiert (Kennedy et al., 2013), wie auch in murinen zerebellären Purkinjezellen (C. Chung et al., 2016). Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe von Kim et al. (2007) in murinen neuronalen Stammzellen mit einem NPC1-Knockout eine verminderte Genexpression der SOD2. Dies wurde ebenfalls von Studien mit NP-C1-Patienten-spezifischen Fibroblasten bestätigt, die sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine Herabregulierung der SOD2 beschrieben (Rauniyar et al.,



2015; Woś et al., 2016). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen konnte in CHO-Zellen mit einem NPC1-Knockout weder Veränderungen der SOD1- noch der SOD2-Proteinexpression beobachtet werden (Dominko et al., 2020).

Verschiedene regulatorische Elemente können einen Einfluss auf die Genexpression der SOD2 nehmen. Hierbei spielt das epigenetische Silencing durch Cytosinmethylierung in CpG-Inseln der Promotorregion der SOD2 eine elementare Rolle, wodurch die SOD2-Expression herunter reguliert wird, wie es für Tumorzellen beschrieben wurde (Y. Huang et al., 1999). Zusätzlich sind genetische Polymorphismen der SOD2 mit folgender Veränderung der Expression beschrieben (H. Li et al., 2005). Darüber hinaus können erhöhte ROS-Werte, wie sie auch in dieser Arbeit für alle NPC1-defizienten neuronalen Zellen nachgewiesen wurden, die SOD2-Expression erhöhen (Miao & St. Clair, 2010). Dies würde als Kompensationsmechanismus das antioxidative Abwehrsystem stärken und die Dysbalance zwischen ROS-Produktion und ROS-Abbau lindern. Allerdings stehen die hier erzielten Ergebnisse im Kontrast zu dieser Theorie, denn trotz erhöhter ROS-Werte in den NPC1-defizienten NDZs ergab sich keine veränderte SOD Expression. Vielmehr zeigte sich die SOD-Aktivität in NP-C1 vermindert, was somit durch andere Einflussfaktoren erklärt werden muss. In der Regulierung der SOD2-Expression spielt ebenfalls das SOD2-RNS-Bindungsprotein eine wichtige Rolle, dessen Aktivität negativ durch Phosphorylierung reguliert wird. Hierbei erhöht die dephosphorylierte Form, die durch Tyrosinkinasen erzeugt wird, die RNS-Bindungsaktivität. In verschiedenen Phasen von OS können reaktive Moleküle diese Tyrosinkinasen inaktivieren, sodass ein größerer Teil des Bindungsproteins in der phosphorylierten Form verweilt. Das führt zu einer geringeren Aktivität des Bindungsproteins und somit zu einer verminderten Translation bei unveränderter Transkription (Knirsch & Clerch, 2001). Dies könnte die ausbleibende kompensatorische Erhöhung der SOD2 bei OS erklären. Da in den hier durchgeführten Untersuchungen jedoch weder auf Gen- noch auf Proteinebene eine veränderte Expression detektiert werden konnte, liegt die regulatorische Komponente, die verantwortlich für die verminderte SOD-Aktivität ist, höchstwahrscheinlich posttranslational. Neben posttranslationalen Nitrierung können andere posttranslationale Modifizierungen zu einer verminderten SOD-Aktivität führen wie die Inaktivierung durch S-Thiolierungsreaktionen, was zu einer Instabilität des Enzyms führen kann (Borgstahl et al., 1996). Somit kann beispielsweise ein erhöhter Proteinumsatz durch eine vorzeitige und überdurchschnittliche proteasomale Degradierung im Rahmen von post-translationalen Modifizierungen bei gleichzeitiger Translationsinduktion zu einer verminderten Gesamtaktivität der SOD führen. Dies könnte für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine mögliche Erklärung für die

verminderte SOD-Aktivität bei unveränderter Expression der SOD in NPC1-defizienten NDZs sein.

Die SOD1 oder auch Cu/Zn-SOD ist v. a. im Zytoplasma lokalisiert, kann aber auch im Zellkern, in Mikrosomen und in dem mitochondrialen Intermembranraum gefunden werden (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001). Veränderungen der SOD1 sind bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen bereits beschrieben wurden. Hierzu zählt eine erbliche Variante der ALS mit einer Mutation im *SOD1*-Gen, sodass die SOD1 statt als antioxidatives Enzym prooxidativ wirkt (Valentine & Hart, 2003). Ähnliches konnte für die SOD1 in post-mortem Studien für Morbus Parkinson Fehlfaltungen gezeigt werden (Trist et al., 2017), wodurch der OS verstärkt und der oxidativen Schaden vergrößert wird. Jedoch konnte im Gegensatz dazu keine Veränderung der SOD1-Expression in den verwendeten NPC1-defizienten neuronalen Zellen beobachtet werden. So unterschieden sich sowohl die Protein- als auch die Genexpression der SOD1 in NP-C1 nicht von der Kontrolle. Auffälliger Weise wurde in der kombiniert heterozygoten *NPC1*-Mutante (Mut B) in den Western Blot Analysen stets eine Doppelbande bei der SOD1-Detektion gesehen. Eine Erklärung hierfür bietet das Vorhandensein von zwei Isoformen der SOD1, die sich lediglich um 2 kDa voneinander unterscheiden und am ehesten hier zur Darstellung kommen (UniProt 1, 2). Ob das isolierte Auftreten mit der Heterozygotie der *NPC1*-Mutation im Zusammenhang steht, bleibt lediglich zu spekulieren. Bei der Betrachtung der SOD1-Expression in andere NP-C1-Studien zeigten sich im Gegensatz zu dieser Arbeit ein veränderter SOD1-Gehalt. So konnte im Liquor von NP-C1-Patienten erhöhte SOD1 Werte im Vergleich zu Gesunden gefunden werden (Cologna et al., 2012). Im NPC1-Mausmodell wurden ähnliche Ergebnisse erzielt mit erhöhter mRNA Konzentration der SOD1 in den NPC1-defizienten Zellen (Kennedy et al., 2013). Im Gegensatz dazu erwiesen Studien mit NPC1-defizienten Fibroblasten eine verminderte SOD1-Proteinmenge (Woś et al., 2016). Regulatorische Komponenten der SOD1-Expression in NP-C1 wurden jedoch zum derzeitigen Stand nicht betrachtet.

Diese Unterschiede der SOD-Expression in den verschiedenen Zellmodellen könnten als zelltypspezifische Effekte in verschiedenen Modellen einer Erkrankung gedeutet werden. Dies verdeutlicht erneut die Notwendigkeit der Verwendung von neuronalen Modellen bei neurologischen Erkrankungen wie NP-C für eine differenzierte Betrachtung der zellulären Regulationen, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von neuen Therapieoptionen.

#### **4.1.3 Verminderte Katalase als Auslöser oder Resultat von oxidativem Stress in NP-C1?**

Das bei der Katalyse durch die SOD entstehende  $H_2O_2$  kann durch weitere Enzyme des Abwehrsystems eliminiert werden wie der Glutathionperoxidase, Peroxiredoxine und der Katalase

(Chae et al., 1994; Kirkman & Gaetani, 1984; Rupérez et al., 2014). Hierbei beugt das Glutathion-System radikalische Kettenreaktionen im Rahmen von Lipidperoxidationen vor und sorgt somit für die Membranstabilisierung (Cadet & Brannock, 1997). Die Peroxiredoxine gehören zu der Familie der Peroxidasen und können neben  $H_2O_2$  ebenfalls Peroxynitrit und andere Peroxide reduzieren. Diese werden sowohl in humanen Astrozyten als auch in Neuronen exprimiert. Interessanterweise konnte eine Erhöhung der Expression verschiedener Subtypen der Peroxiredoxine in neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer festgestellt werden (Szeliga, 2020), was als kompensatorische Reaktion bei erhöhtem OS gedeutet werden kann. Die Katalase, als weiteres Schlüsselenzym des antioxidativen Abwehrsystems, kann neben  $H_2O_2$  auch Peroxynitrit eliminieren (Heinzelmann & Bauer, 2010), wobei Wasser und molekularer Sauerstoff entsteht (Kirkman & Gaetani, 2007). Die Katalase ist hauptsächlich in Lysosomen, Peroxisomen und Mitochondrien zu finden (Cadet & Brannock, 1997; Murakami et al., 2013; Walton et al., 2017), da dort in Relation zu anderen zellulären Kompartimenten die meisten reaktiven Moleküle anzutreffen sind. Zum derzeitigen Wissensstand sind die Untersuchungen in dieser Arbeit die einzige Bestimmung der Katalase-Expression in humanen neuronalen NPC1-defizienten Zellen. So zeigte sich in allen drei untersuchten NPC1-defizienten Zelllinien eine stark verminderte Genexpression der Katalase mit einem fast vollständigen Verlust des Katalase-Proteins. Dabei deutet der Mangel der Katalase als wichtiges Teil des enzymatischen antioxidativen Abwehrsystems zur Beseitigung von reaktiven Molekülen, der im Einklang steht mit dem aufgezeigten erhöhten Niveau an ROS und RNS, auf eine elementare Bedeutung in der Pathogenese des NP-C1 hin. Bisher wurde in verschiedenen NPC1-Modellen lediglich die Katalase Aktivität betrachtet ohne Bestimmung der Expression dieser. So konnte sowohl in NPC1-defizienten Hefezellen, als auch in Homogenisaten von Leber und Gehirnen in dem gängigen BALB/c Mausmodell eine verminderte Katalase Aktivität gezeigt werden (Schedin et al., 1997; Vilaça et al., 2014). Die reduzierte Aktivität der Katalase wurde ebenfalls in NP-C1-Patienten spezifischen Fibroblasten beobachtet (Zampieri et al., 2009), wobei dies am ehesten als Folge der hier gezeigten verminderten Expression der Katalase anzusehen ist. Cadet und Brannock (1997) beschreiben eine Inaktivierung der Katalase durch Superoxidradikale. In diesem Fall würde die hier aufgezeigte verminderte SOD-Aktivität in den NPC1-defizienten NDZs eine erhöhte Anzahl von Superoxidradikalen und somit eine gesteigerte Inaktivierung der Katalase Aktivität zur Folge haben. Dadurch ist allerdings die enorm verminderte Expression der Katalase in den hier verwendeten NPC1-defizienten neuronalen Zellen nicht erklärt.

Eine Begründung für die in dieser Arbeit beobachtete Herunterregulierung der Katalase auf Genexpressionsebene ist die Herabregulierung durch erhöhte ROS-Werte, die ebenfalls in den NPC1-defizienten neuronalen Zellen gefunden wurden. Dieses als epigenetisches Silencing bezeichnete Phänomen wurde in diesem Zusammenhang in Zellen eines hepatozellulären Karzinoms gezeigt, die ebenfalls wie in NP-C1 durch erhöhte ROS- und RNS-Niveaus unter OS leiden. Dabei führten verlängerte ROS-Expositionen zur Induktion der Methylierung der CpG-Insel II innerhalb der Promotorregion der Katalase (Min et al., 2010). CpG-Inseln setzen sich aus einer Ansammlung eines Dinukleotids bestehend aus Cytosin und Guanin zusammen. Die Methylierung dieser CpG-Inseln innerhalb eines Promotors führt zur Blockierung der Transkription und somit zum epigenetischen Silencing des betreffenden Gens (Jones & Takai, 2001), sodass dieses nicht mehr abgelesen und exprimiert werden kann. Übertragen auf das verwendete NP-C1-Zellmodell würden die nachgewiesenen erhöhten Werte an ROS und RNS zu einer Methylierung des Katalasepromotors führen. Dies hätte die verminderte Transkription mit folgender Reduktion der Katalase mRNA sowie verminderter Translation mit konsekutiver Minderung des Proteinniveaus zur Folge, wie es in den hier verwendeten NPC1-defizienten NDZs nachgewiesen wurde. Die mangelnde Beseitigung von  $H_2O_2$  durch die Katalase würde das ROS-Niveau erneut erhöhen, wodurch die Expression der Katalase noch stärker inhibiert werden würde. Denn nicht nur durch exogen zugeführte zelluläre ROS-Erhöhungen konnte eine Methylierung des Katalasepromotors induziert werden. Vielmehr wurde beobachtet, dass im Tumorgewebe, das durch ein erhöhtes Maß an ROS an OS leidet, ebenfalls eine Hypermethylierung der CpG-Insel II im Vergleich zum Nicht-Tumorgewebe vorhanden ist. Diese führt dann wiederum zu einer verringerten mRNA- und Proteinexpression der Katalase (Min et al., 2010) äquivalent zu den hier gezeigten Ergebnissen. Die protektive Funktion der Katalase im zellulären Metabolismus besteht in dem Abbau von reaktiven Metaboliten als Schutz vor oxidativen Schäden. Ein Beispiel für die hohe antioxidative Potenz des Enzyms ist eine durch Überexpression der Katalase in hepatozellulären Karzinomzellen hervorgerufene, signifikante Reduktion des intrazellulären ROS-Niveaus (Min et al., 2010). Umgekehrt bedeutet ein Mangel der Katalase, wie hier für NPC1-defiziente Zellen gezeigt, eine unkontrollierbare Überproduktion von ROS und RNS. Diese wiederum ruft oxidative Schäden an Makromolekülen hervor wie die demonstrierten Nitrierungen von Proteinen in den NPC1-defizienten neuronalen Zellen.

Neben der direkten Methylierung des Katalasepromotors fand die Arbeitsgruppe von Quan et al. (2011) einen indirekten Mechanismus, wodurch erhöhte ROS-Werte die Katalase-Expression negativ regulieren. Dabei fungiert der Transkriptionsfaktor Oct-1 als Sensor für zellulären Stress. Dieser dient physiologisch als Katalase Aktivator, indem er an den Promotor bindet. Bei

erhöhten ROS-Werten stieg jedoch ebenfalls die Methylierung der Promotorregion von Oct-1 mit folgender verminderter Expression, wodurch eine Aktivierung der Transkription der Katalase ausblieb (Quan et al., 2011). Dies bedeutet, dass die ROS-Erhöhung in NP-C1 zum einen direkt die Katalase-Expression vermindert und zum anderen regulatorische Komponenten inhibiert, die unter physiologischen Bedingungen zu einer Erhöhung des zellulären Katalasegehalts und somit zur Erhöhung der antioxidativen Abwehr führen. Welcher dieser Mechanismen in den neuronalen NPC1-defizienten Zellen führend ist, bleibt letztendlich ungeklärt. Zusammenfassend kann allerdings gesagt werden, dass die hier detektierte, stark verminderte Katalase-Expression in NPC1-defizienten NDZs in engem Zusammenhang steht mit dem hohen Maß an OS, das die Zellen aufweisen. Dabei führt eine Dysregulation von pro- und antioxidativen Komponenten des zellulären Stresssystems zu einem stark erhöhten Maß an reaktiven Molekülen, wobei der nahezu vollständige Verlust der Katalase einen großen Einfluss auf diesen Regulationsprozess in NP-C1 zu haben scheint.

Zusätzlich wurde auf Proteinebene eine Regulation der Katalase durch die c-Abl-Kinase beschrieben, die durch OS aktiviert werden kann und pro-apoptotisch wirkt. Diese stabilisiert das Protein bei einer niedrigen  $H_2O_2$ -Konzentration durch Phosphorylierung und dephosphoryliert die Katalase bei einer sehr hohen  $H_2O_2$ -Konzentration als pro-apoptotischer Stimulus, wodurch es zum Abbau des Enzyms kommt (Vázquez et al., 2012). Für NP-C1-Neurone wurde eine c-Abl-Aktivierung beschrieben (Klein et al., 2011). Da in dieser Arbeit allerdings eine Verminderung der Katalase-Expression bereits auf Transkriptionsebene zu sehen ist, kommt die c-Abl-Aktivierung als Folge von OS nicht als alleiniger Mechanismus in Frage. Jedoch kann dies als zusätzlicher Faktor zu einer Aggravation der geringen Proteinexpression der Katalase in den NPC1-defizienten NDZs führen. Neben den beschriebenen Möglichkeiten der Regulation tragen weitere regulatorische Mechanismen zur Expression der Katalase bei: darunter das Protein p53, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und der Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, der durch Bindung in der Promotorregion zur erhöhten Expression der Katalase (Girnun et al., 2002; Kodydková et al., 2014) sowie der SOD1 führt (Yoo et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von PPAR $\gamma$  eine Senkung der Superoxide, am ehesten durch eine vermehrte Katalase-Expression, und die Lipidperoxidation als oxidiertes Biomolekül zur Folge hat (Beheshti et al., 2019). Darüber hinaus ist bekannt, dass die PPAR-Isoformen notwendig für die Biosynthese der Peroxisomen sind. Die Arbeitsgruppe Schedin et al. beschrieb bereits 1997 Alterationen der Peroxisomen in einem NP-C1-Mausmodell. Bei unauffälliger Morphologie wurden funktionelle Veränderungen beschrieben, insbesondere eine verminderte Aktivität der Katalase (Schedin et al.,

1997). Dies könnte in einer verminderten Expression der Katalase begründet sein, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde. Somit könnte eine verminderte PPAR $\gamma$ -Aktivierung zum einen direkt zu einer verminderten Expression der Katalase in den NPC1-defizienten NDZs führen und zum anderen die Funktion der Peroxisomen beeinflussen. Interessanterweise wurden die Veränderungen der Peroxisomen bereits in frühen Stadien der Erkrankung beobachtet (Schedin et al., 1997), sodass die Vermutung nahe liegt, der beobachtete Mangel der Katalase könnte ein Hauptauslöser des OS in NP-C1 darstellen. Letztendlich bleibt es zu diesem Zeitpunkt ungeklärt, ob der OS-Auslöser oder Resultat der verminderten Katalase in NP-C1 ist. Eine Expression von PPAR $\gamma$  in neuralem Gewebe wurde beschrieben, wobei durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors eine Neuroprotektion beobachtet werden konnte (Inestrosa et al., 2005; Kiaei et al., 2005), die möglicherweise in der Induktion der Katalase-Expression durch PPAR $\gamma$  begründet ist. Umgekehrt könnte das Fehlen der Katalase, wie es in den hier verwendeten NPC1-defizienten neuronalen Zellen registriert wurde, einen erheblichen Faktor in dem Prozess der Neurodegeneration in NP-C1 ausmachen.

Therapeutisch konnte bereits in einer Mischkultur von humanen Neuronen und Astrozyten mit Trägerschaft der Trisomie 21 die Zugabe der Katalase die Neurodegeneration verbessern, wohingegen eine Addition der SOD keinen Effekt zeigte (Busciglio & Yankner, 1995). Diese Beobachtung weist erneut auf die hohe Relevanz der Katalase in neurodegenerativen Prozessen hin, die auch in NP-C1 eine wichtige Rolle spielen. Darüber hinaus konnte bei transgenen Mäusen mit einer Katalase-Überexpression eine Zunahme der Neurogenese und eine gesteigerte synaptische Integrität beobachtet werden (Ahn et al., 2019; A. C. Liao et al., 2013). Dies stellt erneut die Katalase in Bezug auf Neurogenese und im Umkehrschluss auf Neurodegeneration in den Vordergrund. Somit würde eine Herabregulierung der Katalase zu einer Neurodegeneration führen. Obwohl der genaue Mechanismus, der zur Herunterregulierung der Katalase in den NPC1-defizienten neuronalen Zellen führt, noch ungeklärt ist, deutet der Mangel in dem hier verwendeten humanen Zellmodell stark auf eine elementare Beteiligung in der Pathogenese des NP-C1 als neurodegenerative Erkrankung hin. Die therapeutische Konsequenz wäre somit eine Wiederherstellung des physiologischen Katalase Niveaus zur Minimierung der Neurodegeneration in NP-C1. Dies könnte über eine direkte Substitution der Katalase geschehen oder über eine Aktivierung der Katalase-Expression beispielsweise über die Aktivierung von PPAR $\gamma$ .

#### **4.1.4 Oxidativer Stress und dessen Regulation in NP-C2 mit vergleichender Betrachtung zu NP-C1**

Die ebenfalls neurodegenerative Erkrankung Morbus Niemann Pick Typ C2 hat einen ähnlichen Phänotyp wie NP-C1. Bei verwandtem pathophysiologischen Mechanismus ist für NP-C2

eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschrieben (Millat, Chikh et al., 2001). In der verwendeten NPC2-Zelllinie erfolgte eine Charakterisierung mit einem Nachweis des Verlustes des NPC2-Proteins sowie eine daraus resultierende Cholesterol Akkumulation, welche über eine Filipin Färbung gezeigt wurde (Liedtke, Völkner & Jüres et al., 2021; Völkner et al., 2019). Nach dem Aufdecken erhöhter OS-Markern bei einem nahezu vollständigen Verlust der Katalase in allen betrachteten NPC1-Zelllinien wurde ein ebenso hohes Maß an OS in den neuronalen NPC2-defizienten Zellen erwartet. Ebenso wie für NPC1-defiziente Zellen wurde für die NPC2-defizienten neuronalen Zellen die ROS-Werte, die SOD-Aktivität sowie die mRNA- und Proteinexpression der SOD1, SOD2 und Katalase untersucht. Entgegen der Erwartungen konnten keine eindeutigen Hinweise für OS in den NPC2-defizienten Zellen gefunden werden. Sowohl die ROS-Werte als auch das RNS-Niveau, gemessen über Nitrierung der Tyrosylreste, zeigten im Gegensatz zu den NPC1-defizienten Zellen keine Erhöhung. Im Gegenteil ergab sich nochmals ein leicht vermindertes Bandenmuster mit weniger Banden bei der semiquantitativen Western Blot Analyse gegen Nitro-Tyrosin. Eine mögliche Erklärung für den geringen OS könnte eine kompensatorische Gegensteuerung der Zellen gegen gering vorhandenen OS sein durch eine Hochregulierung des antioxidativen Abwehrsystems.

Bei der Betrachtung der SOD als Schlüsselenzym in der antioxidativen Abwehr fielen jedoch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle auf. Allenfalls der Proteingehalt der SOD1 erschien leicht erhöht bei unveränderter SOD-Aktivität in der NPC2-defizienten Zelllinie. Interessanterweise fand sich keine Veränderung der Katalase-Expression auf Proteinebene in der NPC2-defizienten Zelllinie, was den größten Unterschied zu dem nahezu vollständigen Verlust der Katalase in den untersuchten NPC1-defizienten Zelllinien darstellt. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit eine geringe Erhöhung ohne statistische Relevanz der mRNA-Expression der Katalase bei NPC2-defizienten Zellen gesehen werden. Das deutet darauf hin, dass NPC1-defiziente Zellen an OS leiden, weil ihnen die Katalase fehlt. Umgekehrt kann daraus geschlossen werden, dass NPC2-defiziente Zellen mit einer unveränderten Expression der Katalase nicht an OS leiden, weil die Katalase reaktive Moleküle beseitigt. Darüber hinaus scheint die Funktion SOD als elementarer Bestandteil des antioxidativen Abwehrsystems erhalten zu sein. Diese beseitigt zusätzlich zu der erhaltenen Katalase reaktive Metaboliten des aeroben Stoffwechsels, wodurch eine Balance zwischen ROS-Produktion und -Abbau zustande kommt. Dazu muss bedacht werden, dass OS eine Dysbalance zwischen ROS-Bildung und -Abbau darstellt und insgesamt ein sehr vulnerables System widerspiegelt, das durch diverse zelluläre und extrazelluläre Faktoren beeinflusst wird. Allerdings stellt die mRNA- und Proteinexpression der Katalase, bei vergleichender Betrachtung zwischen NPC1- und NPC2-defizienten Zellen,

einen großen Unterschied dar. Die signifikant geminderte Katalase-Expression in NPC1- im Vergleich zu NPC2-defizienten Zellen lässt vermuten, dass ebendieser Verlust der Katalase in den NPC1-defizienten Zelllinien im engen Zusammenhang mit OS steht. Somit kann der Mangel an Katalase als Auslöser oder Folge des OS angesehen werden. Umgekehrt kann geschlossen werden, dass in NPC2-defizienten Zellen entweder das Vorhandensein der Katalase zu einer Vermeidung des OS führt oder, dass nahezu kein OS vorhanden ist und deswegen die Katalase-Expression nicht beeinflusst wird.

Jedoch kann die Funktion der Katalase nicht als alleiniger Grund für den großen Unterschied zwischen NPC1- und NPC2-defizienten Zellen bezüglich OS angesehen werden, insbesondere im Hinblick auf die hohe Relevanz des OS in der Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen. So zeigten Studien mit Hippocampi von Ratten, die eine Alzheimer Pathologie aufwiesen, eine ROS-Erhöhung, was mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DCFDA detektiert wurde, der auch in dieser Arbeit zur ROS-Detektion genutzt wurde. Neben einer verminderten SOD-Aktivität wurde ebenfalls eine signifikant reduzierte Katalase Aktivität nachgewiesen, die in einer Neurodegeneration mit kognitiven Defiziten mündet. Dabei wird davon ausgegangen, dass durch die Amyloidakkumulation mitochondrialer OS durch ROS-Erhöhrungen induziert wird (A. K. Singh et al., 2017). Allerdings wird keine Aussage darüber angestellt, ob die Erniedrigungen der Enzymaktivitäten der SOD und Katalase als Folge der gesteigerten ROS-Werte anzusehen sind. Wenngleich eine Katalase-Überexpression in transgenen Mäusen eine Neurogenese hervorruft und vor Strahlungs-induzierten kognitiven Defiziten schützt (Ahn et al., 2019; A. C. Liao et al., 2013; V. K. Parihar et al., 2015), kann der Erhalt der Katalase allein nicht die Neurodegeneration aufhalten. So zeigten NP-C2-Patienten trotz des in dieser Arbeit detektierten Erhalts der Katalase-Expression, sowie am ehesten damit einhergehendem verminderten OS-Niveau, eine progressive Neurodegeneration mit resultierender neurologischer Symptomatik (Yilmaz et al., 2020). Sicherlich sind weitere Studien notwendig, um zu klären, ob die veränderte Katalase-Expression und der Unterschied des OS einen generellen Unterschied zwischen NP-C1 und NP-C2 kennzeichnen oder ob die Veränderung als mutationsspezifischer Effekt gedeutet werden muss.

Darüber hinaus wäre es von Interesse den Methylierungsstatus des Katalasepromotors zu untersuchen und somit, im Hinblick auf die Unterschiede zwischen NPC1- und NPC2-defizienten Zellen, Hinweise auf die Kausalität zu erhalten. Wie zuvor aufgeführt, führen erhöhte ROS-Werte zum epigenetischen Silencing der Expression der Katalase (Min et al., 2010) und somit könnte eine epigenetische Modifizierung durch unterschiedliche ROS-Niveaus die Abweichung zwischen NP-C1 und NP-C2 erklären. Dazu kommt, dass auf Proteinebene relativ milde



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Erhöhungen über eine Interaktion mit der c-Abl-Kinase zu einer Stabilisierung der Katalase führen (Vázquez et al., 2012). Somit wird das Protein nicht degradiert und kann bei mildem OS gegenregulieren. Einen weiteren Aspekt in der Regulierung des OS in NP-C2 stellt Nrf-2 dar, dessen Expression in NPC2-defizienten CHO-Zellen erhöht war (Kennedy et al., 2014). Der Transkriptionsfaktor stimuliert die Expression der antioxidativen Enzyme SOD1, SOD2 und Katalase (Bellezza et al., 2020), was OS verringert. Die von OS ausgelöste Stimulation von Nrf-2 könnte eine mögliche Erklärung für die gesteigerte SOD1- und Katalase-Expression sein, die in derselben NPC2-defizienten Zelllinie wie der hier verwendeten gesehen wurde. Andererseits zeigten NPC1-defiziente Zellen in der Literatur ebenfalls Nrf-2-Erhöhungen (Kennedy et al., 2014; Klein et al., 2011), sodass dies nicht pauschal für die Unterschiede zwischen NP-C1 und NP-C2 bezüglich OS angesehen werden kann. Ein Vergleich zu weiteren Studien zu OS in NP-C2 ist jedoch nur sehr eingeschränkt möglich, da bisher nur wenige Publikationen zu NPC2-defizienten Zellen im Hinblick auf OS veröffentlicht sind. Um die Rolle von OS in NP-C2, sowie regulatorische Mechanismen aufzudecken, sind weitere Studien mit anderen Zellmodellen sowie mit weiteren *NPC2*-Mutationen erforderlich, ebenso wie vergleichende Analysen zwischen NP-C1 und NP-C2, insbesondere in Bezug auf die Katalase.

Zusammenfassend ist das Fehlen von OS-Parametern in NPC2-defizienten neuronalen Zellen auffällig. Dies könnte durch eine unbeeinträchtigte Funktion der SOD sowie durch die erhaltene Expression der antioxidativ wirksamen Katalase erklärt werden, die bei erhöhter ROS- und RNS-Produktion dessen Abbau erhöhen, sodass die Balance zwischen Auf- und Abbau der reaktiven Moleküle wiederhergestellt ist und die Zellen nicht unter OS leiden.

#### **4.1.5 Antioxidative Wirkung der Flavonoide als möglicher therapeutischer Ansatz in der NP-C Behandlung**

In neurodegenerativen Erkrankungen spielt OS eine verhängnisvolle Rolle in der Pathogenese der Erkrankung aufgrund der Toxizität der reaktiven Moleküle (Deas et al., 2016; Haider et al., 2011; Tam et al., 2019). Durch den Nachweis von OS, der insbesondere in NP-C1 zu sehen ist, erscheint die Behandlung mit Antioxidantien vielversprechend. Primäre Ziele in der antioxidativen Therapie ist die Minimierung der reaktiven Moleküle sowie die Modulation der antioxidativen Regulationsmechanismen, um Interaktionen der reaktiven Moleküle mit neuronalen Lipiden, Proteinen und anderen Makromolekülen zu verhindern und die Neurodegeneration zu verlangsamen. Sinnvoller als medikamentöse Interventionen der oxidativen Effekte erscheint die Absicht, ROS und RNS zu minimieren und das antioxidative Abwehrsystem direkt zu initiieren und somit an einer Stelle anzugreifen, die oxidativen Schäden vorausgeht. Das enzymatische Abwehrsystem wird dabei maßgeblich durch nicht enzymatische Substanzen unterstützt.

Diese Antioxidantien können endogene oder exogene Moleküle sein, die OS bekämpfen, indem sie insbesondere reaktive Moleküle neutralisieren. Hierbei spielen Vitamin C und E sowie Flavonoide eine elementare Rolle (Bleilevens et al., 2019; Cotelle et al., 1996; Salehi et al., 2015). Vitamin E ist ein fettlösliches Vitamin und deswegen u. a. in Plasmamembranen zu finden. Es fängt v. a. Peroxylradikale ab, wobei Vitamin E-Defekte neurologische Symptome wie Gangstörungen, Hyporeflexie und sensorische Defizite hervorrufen (Cadet & Brannock, 1997). In Fibroblasten mit der Mutation c. 3182 T>C (Mut A) im *NPC1*-Gen sowie in Hepatozyten und Neuronen von NPC1- und NPC2-Knockout-Mäusen wurde eine Störung des Vitamin E Stoffwechsels beschrieben mit intrazellulärer Vitamin E Akkumulation und resultierender verminderter Bioverfügbarkeit dessen. Die derzeit vorherrschende Erklärung hierfür ist ein Transport von  $\alpha$ -Tocopherol durch die NPC-Proteine, wobei bei einem Defekt dieser Proteine Vitamin E in späten Endosomen und Lysosomen gefangen ist, was zu einer verminderten antioxidativen Funktion führt (Ulatowski et al., 2011; Yévenes et al., 2012). Eine Behandlung von NPC1<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Vitamin E als antioxidative Therapie führte zu einer geringen Verbesserung der Lokomotion (Bascuñan-Castillo et al., 2004). Überraschenderweise ergab sich kein positiver Effekt auf NPC1-defiziente Mäuse unter der antioxidativen Therapie mit Vitamin C (D. Smith et al., 2009), was an einer schlechten Passage von Vitamin C durch die Blut-Hirnschranke liegen könnte.

Eine weitere häufig verwendete Substanz als potenzielle antioxidative Therapie ist das liquorgängige N-Acetylcystein (NAC). Es wirkt hierbei als direkter Fänger von ROS sowie nach Deacetylierung als Vorläufer für das antioxidativ wirksame Glutathion und kann somit OS minimieren (Parasassi et al., 2010). Im NP-C1-Mausmodell konnten eine signifikante Reduktion des OS und ein Anstieg der Lebenserwartung nach NAC-Behandlung gezeigt werden (Fu et al., 2013). In NPC1-defizienten Fibroblasten wurde eine signifikante Reduktion der ROS-Werte nach Behandlung mit NAC mittels DCFDA-Assay beobachtet (Zampieri et al., 2009). Als weitere therapeutische Möglichkeit zur Behandlung des OS in NP-C kommen antioxidativ wirkende Flavonoide in Betracht wie Quercetin und Kaempferol, zu denen bisher keine Studien in NP-C vorliegen. Diese können sowohl ROS als auch RNS neutralisieren, wobei Kaempferol aufgrund der chemischen Struktur etwas schwächer wirksam ist als Quercetin (Heim et al., 2002; Kumar et al., 2016). Quercetin zeigte in mehreren in vivo und in vitro Studien eine neuroprotektive Wirkung. Dabei schützte die Behandlung der Neurone mit dem liquorgängigen Quercetin vor oxidativen Schäden und förderte neuronale Regeneration in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung (Sabogal-Guáqueta et al., 2015), Morbus Parkinson (Ay et al., 2017) und Morbus Huntington (Sandhir & Mehrotra, 2013). Es zeigten sich

ebenfalls Verbesserungen der mitochondrialen Dysfunktion durch Wiederherstellung des mitochondrialen Membranpotentials und Erhöhung der ATP-Synthese nach Therapie mit Quercetin (Khan et al., 2020). Dies würde ebenfalls in NP-C mit selbigen Störungen zu einer Verbesserung der zellulären Funktion führen. Darüber hinaus käme es infolgedessen zu einer indirekten Reduktion der ROS-Produktion durch das Flavonoid. Dies gilt insbesondere bei der hohen Relevanz der mitochondrialen Dysfunktionen in Bezug auf den aeroben Stoffwechsel und damit einhergehenden ROS-Steigerungen, wie auch hier in den NPC1-defizienten neuronalen Zellen nachgewiesen. Ähnliche Ergebnisse bzgl. der Neuroprotektion erzielten Studien u. a. zu der Parkinson Erkrankung im Rattenmodell, die mit Kaempferol behandelt wurden (Pan et al., 2020; Silva dos Santos et al., 2021).

Mittels DCFDA-Assay konnten jedoch mit den hoch dosierten Flavonoiden Quercetin und Kaempferol keine signifikanten Unterschiede der ROS-Werte in NPC1- oder NPC2-defizienten Zellen festgestellt werden. Allerdings waren Verringerungen der DCF positiven Zellen in der Mutation A zu verzeichnen, die auf ein direktes Abfangen der freien Radikale durch die Flavonoide hindeuten könnten. Bei ohnehin schon geringem ROS-Niveau ergab sich bei der NPC2-Variante keine Veränderung, was nochmals für den milden zellulären Phänotypen bezüglich des OS spricht. Der direkte antioxidative Effekt beider Substanzen war hingegen ebenfalls nicht bei den anderen beiden NPC1-defizienten Zelllinien Mutation B und Mutation C zu verzeichnen, obwohl diese einen hohen ROS-Ausgangswert zeigten. Die unterschiedliche Reaktion zwischen den *NPC1*-Mutationen auf die Flavonoide bleibt jedoch ungeklärt. Auffällig war allerdings bei fast allen Zelllinien, dass mit steigender Konzentration von Quercetin bzw. Kaempferol das ROS-Niveau sank, was für einen geringen konzentrationsabhängigen antioxidativen Effekt spricht. Neben der direkten Interaktion mit reaktiven Molekülen sollte eine antioxidative Behandlung auch eine Aktivierung der antioxidativen Abwehr hervorrufen als zusätzlich positiven Effekt auf die Minimierung des OS. Curcumin gilt als Aktivator des Transkriptionsfaktors Nrf-2 mit folgender Erhöhung der Katalase und SOD (Ashrafizadeh et al., 2020; W. Li et al., 2015) und zeigte in der Behandlung von *NPC1*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Verbesserung der neurologischen Symptome sowie das verlängerte Überleben der Mäuse (Lloyd-Evans et al., 2008). Allerdings wurden in dieser Studie weder der Nrf-2-Signalweg noch OS-Parameter betrachtet. Ebenfalls wurde bei Behandlungen von humanen Leber- und Lungenzellen bzw. Rattenneuronen mit Quercetin und Kaempferol eine Aktivierung des Nrf-2-Signalwegs nachgewiesen mit sekundärer Erhöhung des antioxidativen Abwehrsystems, insbesondere der Katalase und SOD2 (Arredondo et al., 2010; Kumar et al., 2016; Pan et al., 2020). Bei einem nahezu vollständigen Verlust der Katalase in den NPC1-defizienten NDZs erwarteten

wir somit eine erhöhte Expression insbesondere der Katalase, sowie von der SOD1 und SOD2 nach Behandlung der NPC-defizienten Zellen mit den hoch dosierten Flavonoiden. Für die Behandlung der NDZs mit 150  $\mu$ M Quercetin ergab sich v. a. in den homozygoten *NPC1*-Mutationen Mutation A und C eine geringe Steigerung ohne statistische Signifikanz in der SOD1- und SOD2-Expression. Hierbei waren der erhöhte SOD1-Proteingehalt bei Mutation C und die gesteigerte SOD2 auf Proteinebene bei Mutation A signifikant. Die Kaempferol-Behandlung der NPC-defizienten NDZs mit 100  $\mu$ M erzielte auf Proteinebene ähnliche Ergebnisse, wobei das SOD2-Protein bei der kombiniert heterozygoten Linie Mutation B sowie bei der Mutation A signifikant erhöht war. Allerdings konnten keine Veränderungen weder der SOD1 noch der SOD2 auf Transkriptionsebene beobachtet werden. Zusätzlich ergab die Messung der SOD-Aktivität keine Veränderung unter der Flavonoid-Behandlung. Unter der Annahme, die Regulation der antioxidativen Enzyme würde über den Nrf-2-Signalweg durch die Flavonoide gesteigert werden, kann eine Wiederherstellung der Katalase-Expression in den NPC1-defizienten Zelllinien vermutet werden. Dies konnte nicht bestätigt werden, wobei die Senkung der Katalase unter der Behandlung auf Proteinebene keiner biologischen Wertigkeit zugerechnet wird, sondern vielmehr der semiquantitativen Methode der Western Blot Auswertung zugeschrieben wird. Um die partielle SOD-Erhöhung genauer zu betrachten, erfolgte eine Analyse des Transkriptionsfaktors Nrf-2 sowie des durch diesen regulierten, antioxidativen Enzyms HMOX-1 auf Genexpressionsebene. Sowohl für Nrf-2 als auch für HMOX-1 konnte eine gesteigerte Expression nach Quercetin-Behandlung in NPC1-defizienten NDZs nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Kaempferol ergab hingegen keine eindeutige Veränderung des Transkriptionsfaktors Nrf-2 sowie der HMOX-1. Die Tatsache, dass v. a. die homozygoten NPC1-defizienten Zelllinie profitierten, bleibt jedoch ungeklärt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlung der NDZs mit den Flavonoiden Quercetin und Kaempferol zu einer milden Erhöhung der SODs in den NPC-defizienten NDZs führte, was über den Nrf-2-ARE-Signalweg ausgelöst werden könnte. Allerdings zeigen die fehlende Erhöhung der SOD-Aktivität sowie die nur geringe Minderung von ROS allenfalls geringe antioxidative Eigenschaften der Substanzen in den verwendeten Konzentrationen. Eine gesteigerte Beseitigung von ROS kann ggf. durch eine höhere Konzentration oder eine längere Inkubationszeit bei den hier vorliegenden relativ stabilen neuronalen Zellen erreicht werden. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig mit veränderten Parametern wie einer Erhöhung der Konzentration oder einer verlängerten Behandlungsdauer, um einen therapeutischen Nutzen hinreichend zu evaluieren. Eine additive Behandlung mit herkömmlichen Therapeutika wie Miglustat könnte die antioxidative Therapie unterstützen, wobei diese ihre Wirkung gegenseitig

ergänzen. Unter der Annahme, dass der Verlust der Katalase eine elementare Rolle in Bezug auf OS in NP-C1 spielt, könnte auch eine gezielte Aktivierung dieser oder die direkte Substitution von therapeutischem Nutzen sein.

## 5 Zusammenfassung

Morbus Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine seltene, hereditäre lysosomale Speichererkrankung. Einen elementaren Bestandteil in der Krankheitsentstehung und -progression von NP-C stellt die progressive Neurodegeneration dar. Diese wird unter anderem von oxidativem Stress (OS) hervorgerufen und führt zu den charakteristischen, neurologischen Symptomen der NP-C-Patienten. Hierbei sind die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen sowie die Entstehung des OS in NP-C bisher nicht vollständig geklärt.

OS entsteht durch eine Dysbalance in der Produktion und dem Abbau von reaktiven Molekülen und führt bei einem hohen Maß durch die Störung von essenziellen zellulären Funktionen zum Zelltod. Wie auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson oder der Alzheimer Erkrankung konnte ebenfalls für NP-C ein erhöhter Gehalt an reaktiven Molekülen nachgewiesen werden, die funktionsverändernde Modifikation von Makromolekülen hervorrufen. Um solchen Modifikationen zu entgehen, besitzt jede Zelle ein Abwehrsystem, dessen Funktion die Beseitigung von reaktiven Molekülen ist und entsprechend dem Maß an OS reguliert wird. So wurden bereits Veränderungen in der Funktion und Expression von antioxidativen Enzymen in verschiedenen NP-C-Modellen beschrieben. Allerdings erfolgte keine dieser Untersuchungen mit humanen neuronalen Zellen, die durch Mutationen im *NPC1*- oder *NPC2*-Gen zu der neurologischen Erkrankung NP-C führen. Basierend darauf wurden in der angefertigten Arbeit das Maß an OS sowie dessen Regulation über die antioxidativ wirkenden Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase untersucht.

Erstmals wurden für die OS Analysen neurale Zellen, abgeleitet von NP-C-Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen, verwendet. Für die Untersuchungen wurde durchflusszytometrisch der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs DCFDA bestimmt. Um das Ausmaß der zellulären reaktiven Stickstoffspezies (RNS) zu detektieren, erfolgten Western Blot Analysen unter Verwendung eines Nitro-Tyrosin Antikörpers, der durch RNS nitrierte Tyrosylreste in Proteinen nachweist. Die Betrachtung des zellulären antioxidativen Abwehrsystems erfolgte über eine indirekte Aktivitätsmessung der SOD mithilfe des Farbstoffs WST-1 sowie über die Ermittlung der Protein- und Genexpression der Schlüsselenzyme SOD1, SOD2 und Katalase.

Die Detektion von DCF bestätigte in *NPC1*-defizienten neuronalen Zellen einen erhöhten Gehalt an ROS als direkter OS-Parameter. Des Weiteren konnte ein erhöhtes RNS-Niveau über ein gesteigertes Maß an nitrierten Proteinen in NP-C1 nachgewiesen werden. So ergab sich aus beiden experimentellen Ansätzen ein erhöhtes Maß an OS in den humanen neuronalen *NPC1*-defizienten Zellen. Um die Regulation des OS im Hinblick auf die antioxidativen

Schlüsselenzyme näher zu inspizieren, erfolgte die Bestimmung der SOD-Aktivität, die in allen NPC1-defizienten Zelllinien vermindert war. Um zu ermitteln, ob die reduzierte Aktivität durch eine geringere Expression der SOD oder über post-translationale Modifikationen zu erklären ist, erfolgte eine genauere Betrachtung der SOD1 und SOD2. Dort zeigten sich keine Veränderungen der Expression auf Protein- oder Genebene. Da insbesondere für die SOD2 eine Nitrierung des Proteins im aktiven Zentrum beschrieben wurde und diese als wichtigste Unterform essenziell für den Erhalt der zellulären Funktionen einer aeroben Zelle ist, erfolgte die Ermittlung des nitrierten Gehalts an SOD1 und SOD2. Bei unverändertem nitriertem SOD1-Anteil ergab sich ein erhöhter nitrierter Anteil der SOD2, was eine mögliche Erklärung der verminderten SOD-Aktivität in den NPC1-defizienten neuronalen Zellen darstellt. Darüber hinaus konnten weitere Veränderungen des antioxidativen Abwehrsystems detektiert werden. Sowohl die Protein- als auch die mRNA-Expression der Katalase ergaben eine massive Reduktion des antioxidativen Proteins in neuronalen NPC1-defizienten Zellen.

In den ebenfalls untersuchten neuronalen NPC2-defizienten Zellen fanden sich keine Hinweise für ein erhöhtes Maß an OS. Sowohl die Bestimmung des ROS-Gehalts als auch die Detektion von nitrierten Proteinen ergaben keine Veränderungen verglichen mit der Kontrolle. Bei konstanter SOD-Aktivität fiel ebenfalls die Bestimmung der SOD1- und SOD2-Expression unauffällig aus. Im Gegensatz zu dem in NP-C1 detektierten Verlust der Katalase zeigten die NPC2-defizienten neuronalen Zellen keine Veränderung der Katalase-Expression.

Als therapeutische Konsequenz des erhöhten OS in NP-C1 wurde die Behandlung der neuronalen NPC-defizienten Zellen mit den Flavonoiden Quercetin und Kaempferol untersucht. Diese zeigten neben einer direkten antioxidativen Wirkung eine Erhöhung des antioxidativen Abwehrsystems über den Nrf-2-ARE-Signalweg. Jedoch minderten die Flavonoide das Maß an OS nur bedingt, wobei explizit die Expression der Katalase unbeeinflusst von der Behandlung in den neuronalen Zellen blieb.

Die Ergebnisse zeigten ein hohes Maß an OS in NPC1-defizienten neuronalen Zellen. Dabei stellen oxidative Modifizierungen, wie hier in der erhöhten Nitrierung von Proteinen gezeigt, ein enormes Problem für zelluläre Funktionen dar. Diese Modifikationen resultieren in der beobachteten Funktionsminderung von antioxidativen Enzymen wie der SOD, was wiederum die Dysbalance zwischen der Produktion und dem Abbau von reaktiven Molekülen verstärkt. Ein weiterer großer Faktor in der gestörten Regulation von OS in NP-C1 scheint die stark reduzierte Expression der Katalase in NPC1-defizienten Zellen zu sein. Eine mögliche Erklärung ist eine ROS-induzierte Methylierung der Promotorregion der Katalase mit konsekutivem Verlust der Expression der Katalase. Insbesondere im Hinblick auf den erhaltenen Katalasegehalt in NPC2-

---

defizienten NDZs, die keine Anzeichen für OS vorwiesen, erscheint die ROS-induzierte reduzierte Expression der Katalase ätiologisch plausibel. Da OS einen großen Beitrag zu neurodegenerativen Prozessen leistet, ist die Verwendung einer antioxidativen Therapie neben herkömmlichen Therapieoptionen wie Miglustat vielversprechend. Neben herkömmlichen antioxidativen Therapien ist die Substitution der Katalase, im Sinne einer Wiederherstellung des physiologischen Katalase-Niveaus, in NP-C1-Patienten zur Verhinderung der Progression der Neurodegeneration und Förderung der Neurogenese aussichtsvoll.



## 6 Thesen

1. Morbus Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine lysosomale Speichererkrankung, die durch Mutationen im *NPC1*- oder *NPC2*-Gen entstehen und mit einer progressiven Neurodegeneration einhergehen.
2. Die Klinik bietet ein heterogenes Bild mit viszeralen Symptomen wie eine Hepatosplenomegalie sowie neurologische Manifestationen, wie eine Ataxie, eine vertikale Blickparese und progressive kognitive Störungen. Das Erstmanifestationsalter variiert von perinatal bis adult.
3. Therapeutisch steht für den NP-C keine kurative Therapie zur Verfügung. Allerdings ist eine Substratreduktionstherapie mit Miglustat zugelassen und weitere Substanzen befinden sich in der klinischen Forschung. Einen potenziellen therapeutischen Ansatz stellen ebenfalls Antioxidantien wie Flavonoide dar.
4. Bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen spielen oxidativer Stress (OS) und Veränderungen im antioxidativen Abwehrsystem eine essenzielle Rolle.
5. OS entsteht durch eine Dysbalance in der Produktion und dem Abbau von reaktiven Molekülen und führt zu erheblichen Störungen des zellulären Metabolismus bis hin zum Zelltod.
6. Eine Vielzahl von Studien bestätigten OS im NP-C, wobei die meisten Untersuchungen mit Patienten-spezifischen Fibroblasten durchgeführt wurden. Analysen zum OS in humanen, neuronalen Zellen sind bisher nicht erfolgt.
7. Daher war das Ziel dieser Arbeit, verschiedene Merkmale von OS sowie dessen Regulation über das antioxidative Abwehrsystem in neural differenzierten Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die antioxidativen Flavonoide Quercetin und Kaempferol auf ihre potenzielle therapeutische Wirksamkeit überprüft.

8. Hierfür erfolgten durchflusszytometrische Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) über den DCFDA-Assay sowie eine kolorimetrische Bestimmung der SOD-Aktivität. Mithilfe von Western Blot Analysen wurden Proteinexpressionen von nitrierten Proteinen sowie der Enzyme SOD1, SOD2 und Katalase ermittelt, deren Expression ebenfalls mittels RT-q-PCR auf Transkriptionsebene untersucht wurde.
9. Ein erhöhter Gehalt an ROS sowie ein gesteigertes Niveau an reaktiven Stickstoffspezies (RNS) konnte für NPC1-defiziente neurale Zellen als Hinweis auf ein erhöhtes Maß an OS bestätigt werden.
10. Bei der Betrachtung des antioxidativen Abwehrsystems fiel eine verminderte SOD-Aktivität in allen NPC1-defizienten Zelllinien auf, ohne Veränderungen der SOD1- oder SOD2-Expression auf Protein- oder Genebene.
11. Bei unverändertem nitriertem SOD1-Anteil ergab sich ein erhöhter nitrierter Anteil der SOD2 in den NPC1-defizienten Zellen.
12. Auffällig war eine massive Reduktion der Katalase sowohl der Protein- als auch der mRNA-Expression in neuronalen NPC1-defizienten Zellen. =
13. NPC2-defiziente neurale Zellen hingegen zeigten keine Hinweise für ein erhöhtes Maß an OS oder Veränderungen des antioxidativen Abwehrsystems.
14. Die antioxidative Behandlung der neuronalen Zellen mit Quercetin und Kaempferol zeigte, neben einer geringen direkten antioxidativen Wirkung, eine Erhöhung des antioxidativen Abwehrsystems über den Nrf-2-ARE-Signalweg, jedoch ohne Beeinflussung der Katalase-Expression.
15. Die erzielten Ergebnisse weisen auf einen vielversprechenden Ansatz einer antioxidativen Therapie zur Verhinderung der Progression der Neurodegeneration der NP-C1-Patienten hin. Besonders aussichtsreich erscheint hier, neben einer direkten antioxidativen Therapie, die Substitution der Katalase zur Wiederherstellung des physiologischen Katalase-Niveaus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, I., Shukla, S., Singh, D., Chauhan, A. K., Kumar, V., Singh, B. K., Patel, D. K., Pandey, H. P., & Singh, C. (2014). CYP2E1-mediated oxidative stress regulates HO-1 and GST expression in maneb- and paraquat-treated rat polymorphonuclear leukocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 393(1–2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2062-y>
- Ahn, J. H., Shin, B. N., Song, M., Kim, H., Park, J. H., Lee, T. K., Park, C. W., Park, Y. E., Lee, J. C., Yong, J. H., Lee, C. H., Hwang, I. K., Won, M. H., & Lee, Y. L. (2019). Intermittent fasting increases the expressions of SODs and catalase in granule and polymorphic cells and enhances neuroblast dendrite complexity and maturation in the adult gerbil dentate gyrus. *Molecular Medicine Reports*, 19(3), 1721–1727. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9822>
- Ahsan, H. (2013). 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human Immunology*, 74(10), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.06.009>
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., & Patel, Y. (1995). 14-3-3 alpha and sigma are the phosphorylated forms of Raf activating 14-3-3 beta and zeta. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5706–5709. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.5706>
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357(3), 593–615. <https://doi.org/10.1042/bj3570593>
- Alvarez, A. R., Klein, A., Castro, J., Cancino, G. I., Amigo, J., Mosqueira, M., Vargas, L. M., Yévenes, L. F., Bronfman, F. C., & Zanlungo, S. (2008). Imatinib therapy blocks cerebellar apoptosis and improves neurological symptoms in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(10), 3617–3627. <https://doi.org/10.1096/fj.07-102715>
- An, T., Shi, P., Duan, W., Zhang, S., Yuan, P., Li, Z., Wu, D., Xu, Z., Li, C., & Guo, Y. (2014). Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Molecular Neurobiology*, 49(3), 1435–1448. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8623-3>
- Antunes, F., & Cadenas, E. (2000). Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Letters*, 475(2), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01638-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01638-0)
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arfin, S., Jha, N. K., Jha, S. K., Kesari, K. K., Ruokolainen, J., Roychoudhury, S., Rathi, B., & Kumar, D. (2021). Oxidative stress in cancer cell metabolism. *Antioxidants*, 10(5), 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox10050642>
- Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. A., Blasina, F., Antúnez, K., Jones, D. P., Go, Y. M., Liang, Y. L., & Dajas, F. (2010). After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(5), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.020>

- Asfandiyarova, N., Kolcheva, N., Ryazantsev, I., & Ryazantsev, V. (2006). Risk factors for stroke in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 3(1), 57–60. <https://doi.org/10.3132/dvdr.2006.009>
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Mohammadinejad, R., Farkhondeh, T., & Samarghandian, S. (2020). Curcumin Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection Against Oxidative Injury. *Current Molecular Medicine*, 20(2), 116–133. <https://doi.org/10.2174/1566524019666191016150757>
- Ay, M., Luo, J., Langley, M., Jin, H., Anantharam, V., Kanthasamy, A., & Kanthasamy, A. G. (2017). Molecular Mechanisms Underlying Protective Effects of Quercetin Against Mitochondrial Dysfunction and Progressive Dopaminergic Neurodegeneration in Cell Culture and MitoPark Transgenic Mouse Models of Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 141(5), 766–782. <https://doi.org/10.1111/jnc.14033>
- Balboa, E., Castro, J., Pinochet, M.-J., Cancino, G. I., Matías, N., José Sáez, P., Martínez, A., Álvarez, A. R., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C., & Zanlungo, S. (2017). MLN64 induces mitochondrial dysfunction associated with increased mitochondrial cholesterol content. *Redox Biology*, 12, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.024>
- Banerjee, K., Sinha, M., Pham, C. L. L., Jana, S., Chanda, D., Cappai, R., & Chakrabarti, S. (2010).  $\alpha$ -Synuclein induced membrane depolarization and loss of phosphorylation capacity of isolated rat brain mitochondria: Implications in Parkinson's disease. *FEBS Letters*, 584(8), 1571–1576. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.012>
- Bao, D., Wang, J., Pang, X., & Liu, H. (2017). Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. *Molecules*, 22(7), 1122. <https://doi.org/10.3390/molecules22071122>
- Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., Clark, B. J., Robert, D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21(3), 389–395. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>
- Bascuñan-Castillo, E. C., Erickson, R. P., Howison, C. M., Hunter, R. J., Heidenreich, R. H., Hicks, C., Trouard, T. P., & Gillies, R. J. (2004). Tamoxifen and vitamin E treatments delay symptoms in the mouse model of Niemann-Pick C. *Journal of Applied Genetics*, 45(4), 461–467.
- Baxter, L. L., Watkins-Chow, D. E., Johnson, N. L., Farhat, N. Y., Platt, F. M., Dale, R. K., Porter, F. D., Pavan, W. J., & Rodriguez-Gil, J. L. (2022). Correlation of age of onset and clinical severity in Niemann–Pick disease type C1 with lysosomal abnormalities and gene expression. *Scientific Reports*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06112-y>
- Beckman, J. S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology*, 9(5), 836–844. <https://doi.org/10.1021/tx9501445>
- Beheshti, F., Hosseini, M., Hashemzahi, M., Soukhtanloo, M., Khazaei, M., & Naser Shafei, M. (2019). The effects of PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone on hippocampal cytokines, brain-derived neurotrophic factor, memory impairment, and oxidative stress status in lipopolysaccharidetreated rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(8), 940–948. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.36165.8616>
- Bell, E. L., Klimova, T. A., Eisenbart, J., Moraes, C. T., Murphy, M. P., Budinger, G. R. S., & Chandel, N. S. (2007). The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *Journal of Cell*

- Biology*, 177(6), 1029–1036. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609074>
- Bellezza, I., Riuzzi, F., Chiappalupi, S., Arcuri, C., Giambanco, I., Sorci, G., & Donato, R. (2020). Reductive stress in striated muscle cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(18), 3547–3565. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03476-0>
- Bergamin, N., Dardis, A., Beltrami, A., Cesselli, D., Rigo, S., Zampieri, S., Domenis, R., Bembi, B., & Beltrami, C. A. (2013). A human neuronal model of Niemann Pick C disease developed from stem cells isolated from patient's skin. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-34>
- Berger, A. C., Vanderford, T. H., Gernert, K. M., Nichols, J. W., Faundez, V., & Corbett, A. H. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Npc2p Is a Functionally Conserved Homologue of the Human Niemann-Pick Disease Type C 2 Protein, hNPC2. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1851–1862. <https://doi.org/10.1128/ec.4.11.1851-1862.2005>
- Bland, J. (1978). Biochemical consequences of lipid peroxidation. *Journal of Chemical Education*, 55(3), 151–155. <https://doi.org/10.1021/ed055p151>
- Bleilevens, C., Doorschodt, B. M., Fechter, T., Grzanna, T., Theißen, A., Liehn, E. A., Breuer, T., Tolba, R. H., Rossaint, R., Stoppe, C., Boor, P., Hill, A., & Fabry, G. (2019). Influence of vitamin C on antioxidant capacity of in vitro perfused porcine kidneys. *Nutrients*, 11(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11081774>
- Blough, N. V., & Zafiriou, O. C. (1985). Reaction of Superoxide with Nitric Oxide to Form Peroxonitrite in Alkaline Aqueous Solution. *Inorganic Chemistry*, 24(22), 3502–3504. <https://doi.org/10.1021/ic00216a003>
- Bolton, S. C., Soran, V., Marfa, M. P., Imrie, J., Gissen, P., Jahnova, H., Sharma, R., Jones, S., Santra, S., Crushell, E., Stampfer, M., Coll, M. J., Dawson, C., Mathieson, T., Green, J., Dardis, A., Bembi, B., Patterson, M. C., Vanier, M. T., & Geberhiwot, T. (2022). Clinical disease characteristics of patients with Niemann-Pick Disease Type C: findings from the International Niemann-Pick Disease Registry (INPDR). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02200-4>
- Borgstahl, G. E. O., Parge, H. E., Hickey, M. J., Johnson, M. J., Boissinot, M., Hallewell, R. A., Lepock, J. R., Cabelli, D. E., & Tainer, J. A. (1996). Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*, 35(14), 4287–4297. <https://doi.org/10.1021/bi951892w>
- Bors, W., & Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Research*, 2(4–6), 289–294. <https://doi.org/10.3109/10715768709065294>
- Bose, A., & Beal, M. F. (2019). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in induced pluripotent stem cell models of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 49, 525–532. <https://doi.org/10.1111/ejn.14264>
- 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), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0409-4>
- Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 128(3), 617–630. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>

- Brady, R. O., Kanfer, J. F., Mock, M. B., & Fredrickson, D. S. (1966). The metabolism of shingomyelin, II. evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(2), 366–369. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.2.366>
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental Gerontology*, 45(7–8), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8(1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90104-L](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90104-L)
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8), 1221–1229. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10926916>
- Buchczyk, D. P., Grune, T., Sies, H., & Klotz, L. O. (2003). Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: Early recognition by 20S proteasome. *Biological Chemistry*, 384(2), 237–241. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.026>
- Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K. Y., Sack, M. N., Kastner, D. L., & Siegel, R. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 519–533. <https://doi.org/10.1084/jem.20102049>
- Busciglio, J., & Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in down's syndrome neurons in vitro. *Nature*, 378(6559), 776–779. <https://doi.org/10.1038/378776a0>
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 655–664. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00340-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00340-2)
- Cadet, J. L., & Brannock, C. (1997). Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry International*, 32(2), 117–131. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(97\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(97)00031-4)
- Calvieri, C., Tanzilli, G., Bartimoccia, S., Cangemi, R., Arrivi, A., Dominici, M., Cammisotto, V., Viceconte, N., Mangieri, E., Frati, G., & Violi, F. (2018). Interplay between oxidative stress and platelet activation in coronary thrombus of STEMI patients. *Antioxidants*, 7(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/antiox7070083>
- Carlioz, A., & Touati, D. (1986). Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *The EMBO Journal*, 5(3), 623–630. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04256.x>
- Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummmings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., Sturley, S. L., Ioannou, Y. A., Higgins, M. E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C. R., ... Tagle, D. A. (1997). Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis. *Science*, 277, 228–231. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.228>

- Cazzola, R., Rondanelli, M., Russo-Volpe, S., Ferrari, E., & Cestaro, B. (2004). Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *Journal of Lipid Research*, *45*(10), 1846–1851. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300509-JLR200>
- Chae, H. Z., Chung, S. J., & Rhee, S. G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(44), 27670–27678. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47038-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47038-x)
- Chandhok, G., Schmitt, N., Sauer, V., Aggarwal, A., Bhatt, M., & Schmidt, H. H. J. (2014). The effect of zinc and D-penicillamine in a stable human hepatoma ATP7B knockout cell line. *PLoS ONE*, *9*(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098809>
- Charman, M., Kennedy, B. E., Osborne, N., & Karten, B. (2010). MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *Journal of Lipid Research*, *51*, 1023–1034. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002345>
- Chatterjee, J., & Mustak, M. S. (2018). Neuroprotective effect of quercetin against radiation - induced endoplasmic reticulum stress in neurons. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, *32*(10), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jbt.22242>
- Chen, J., Zhang, Z., & Cai, L. (2014). Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2 : Current Status. *Diabetes & Metabolism Journal*, *38*, 337–345. <https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.5.337> pISSN 2233-6079 · eISSN 2233-6087 DIABETES
- Chen, Y., Azad, M. B., & Gibson, S. B. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death and Differentiation*, *16*(7), 1040–1052. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.49>
- Chua, S. L., Too, W. C. S., Yin, K. B., & Few, L. L. (2011). UBC and YWHAZ as suitable reference genes for accurate normalisation of gene expression using MCF7, HCT116 and HepG2 cell lines. *Cytotechnology*, *63*, 645–654. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9383-4>
- Chung, C., Puthanveetil, P., Ory, D. S., & Lieberman, A. P. (2016). Genetic and pharmacological evidence implicates cathepsins in Niemann-Pick C cerebellar degeneration. *Human Molecular Genetics*, *25*(7), 1434–1446. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw025>
- Chung, C. Y., Khurana, V., Auluck, P. K., Tardiff, D. F., Mazzulli, J. R., Soldner, F., Baru, V., Lou, Y., Freyzon, Y., Cho, S., Mungenast, A. E., Muffat, J., Mitalipova, M., Pluth, M. D., Jui, N. T., Schüle, B., Lippard, S. J., Tsai, L.-H., Krainc, D., ... Lindquist, S. (2013). Identification and Rescue of  $\alpha$ -Synuclein Toxicity in Parkinson Patient-Derived Neurons. *Science*, *342*(6161), 983–987. <https://doi.org/10.1126/science.1245296>
- Colell, A., García-Ruiz, C., Lluís, J. M., Coll, O., Mari, M., & Fernández-Checa, J. C. (2003). Cholesterol Impairs the Adenine Nucleotide Translocator-mediated Mitochondrial Permeability Transition through Altered Membrane Fluidity. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(36), 33928–33935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210943200>
- Collier, A., Rumley, A., Rumley, A. G., Paterson, J. R., Leach, J. P., Lowe, G. D. O., & Small, M. (1992). Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes*, *41*(8), 909–913. <https://doi.org/10.2337/diab.41.8.909>

- Cologna, S. M., Cluzeau, C. V. M., Yanjanin, N. M., Blank, P. S., Dail, M. K., Siebel, S., Toth, C. L., Wassif, C. A., Lieberman, A. P., & Porter, F. D. (2014). Human and Mouse Neuroinflammation Markers in Niemann-Pick Disease, type C1. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(1), 83–92. <https://doi.org/110.1007/s10545-013-9610-6>
- Cologna, S. M., Jiang, X. S., Backlund, P. S., Cluzeau, C. V. M., Dail, M. K., Yanjanin, N. M., Siebel, S., Toth, C. L., Jun, H. sik, Wassif, C. A., Yergey, A. L., & Porter, F. D. (2012). Quantitative Proteomic Analysis of Niemann-Pick Disease, Type C1 Cerebellum Identifies Protein Biomarkers and Provides Pathological Insight. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047845>
- Cologna, S. M., & Rosenhouse-Dantsker, A. (2019). Insights into the Molecular Mechanisms of Cholesterol Binding to the NPC1 and NPC2 Proteins. In *Direct Mechanisms in Cholesterol Modulation of Protein Function. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1135, pp. 139–160). [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0\\_8](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_8)
- Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. (2016). Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/2986796>
- Cotelle, N., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Pommery, J., Wallet, J. C., & Gaydou, E. M. (1996). Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02014-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02014-4)
- Coulson, D. T. R., Brockbank, S., Quinn, J. G., Murphy, S., Ravid, R., Irvine, G. B., & Johnston, J. A. (2008). Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue. *BMC Molecular Biology*, 9(46), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-46>
- Crocker, A. C. (1961). the Cerebral Defect in Tay-Sachs Disease and Niemann-Pick Disease. *Journal of Neurochemistry*, 7(1), 69–80. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1961.tb13499.x>
- Crocker, A. C., & Farber, S. (1958). Niemann-Pick disease: A review of eighteen patients. *Medicine*, 37(1), 1–95. <https://doi.org/10.1097/00005792-195802000-00001>
- Cross, A. H., Manning, P. T., Keeling, R. M., Schmidt, R. E., & Misko, T. P. (1998). Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 88(1–2), 45–56. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00078-2](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00078-2)
- Cuisset, J. M., Sukno, S., Trauffler, A., Latour, P., Dobbelaere, D., Michaud, L., & Vallée, L. (2016). Impact of miglustat on evolution of atypical presentation of late-infantile-onset Niemann-Pick disease type C with early cognitive impairment, behavioral dysfunction, epilepsy, ophthalmoplegia, and cerebellar involvement: A case report. *Journal of Medical Case Reports*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13256-016-1038-9>
- Cunha-Oliveira, T., Montezinho, L., Mendes, C., Firuzi, O., Saso, L., Oliveira, P. J., & Silva, F. S. G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2020/5021694>
- Dagda, R. K., Cherra, S. J., Kulich, S. M., Tandon, A., Park, D., & Chu, C. T. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13843–13855.



<https://doi.org/10.1074/jbc.M808515200>

- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24367–24374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002184200>
- De Rasmio, D., Ferretta, A., Russo, S., Ruggieri, M., Lasorella, P., Paolicelli, D., Trojano, M., & Signorile, A. (2020). PBMC of multiple sclerosis patients show deregulation of OPA1 processing associated with increased ROS and PHB2 protein levels. *Biomedicines*, 8(4), 85. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8040085>
- Deas, E., Cremades, N., Angelova, P. R., Ludtmann, M. H. R., Yao, Z., Chen, S., Horrocks, M. H., Banushi, B., Little, D., Devine, M. J., Gissen, P., Klenerman, D., Dobson, C. M., Wood, N. W., Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2016). Alpha-synuclein oligomers interact with metal ions to induce oxidative stress and neuronal death in Parkinson's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 24(7), 376–391. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6343>
- Demais, V., Barthélémy, A., Perraut, M., Ungerer, N., Keime, C., Reibel, S., & Pfrieder, F. W. (2016). Reversal of pathologic lipid accumulation in NPC1-deficient neurons by drug-promoted release of LAMP1-coated lamellar inclusions. *Journal of Neuroscience*, 36(30), 8012–8025. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0900-16.2016>
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of  $\alpha$ -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089–9100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
- Dominko, K., Dikic, D., & Hecimovic, S. (2020). Enhanced activity of superoxide dismutase is a common response to dietary and genetically induced increased cholesterol levels. *Nutritional Neuroscience*, 23(5), 398–410. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1511027>
- Du, M. -Q, Carmichael, P. L., & Phillips, D. H. (1994). Induction of activating mutations in the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene by oxygen free radicals. *Molecular Carcinogenesis*, 11(3), 170–175. <https://doi.org/10.1002/mc.2940110308>
- Elrick, M. J., Yu, T., Chung, C., & Lieberman, A. P. (2012). Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann – Pick type C disease. *Human Molecular Genetics*, 21(22), 4876–4887. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds324>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2009). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. In *Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Methods In Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 594, pp. 57–72). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4)
- Fang, L., Teuchert, M., Huber-Abel, F., Schattauer, D., Hendrich, C., Dorst, J., Zettlmeissel, H., Wlaschek, M., Scharffetter-Kochanek, K., Kapfer, T., Tumani, H., Ludolph, A. C., & Brettschneider, J. (2010). MMP-2 and MMP-9 are elevated in spinal cord and skin in a mouse model of ALS. *Journal of the Neurological Sciences*, 294(1–2), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.04.005>
- Fernandez-Checa, J. C., & Kaplowitz, N. (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: Transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.001>

- Ferrante, R. J., Browne, S. E., Shinobu, L. A., Bowling, A. C., Baik, M. J., MacGarvey, U., Kowall, N. W., Brown, R. H. J., & Beal, M. F. (1997). Evidence of Increased Oxidative Damage in Both Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 69(5), 2064–2074. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x>
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Floyd, R. A., & Carney, J. M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Annals of Neurology*, 32(1 S), S22–S27. <https://doi.org/10.1002/ana.410320706>
- Fridovich, I. (1997). Superoxide Anion Radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), Superoxide Dismutases, and Related Matters. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18515–18517. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.18515>
- Fu, R., Wassif, C. A., Yanjanin, N. M., Watkins-Chow, D. E., Baxter, L. L., Incao, A., Liscum, L., Sidhu, R., Firnkes, S., Graham, M., Ory, D. S., Porter, F. D., & Pavan, W. J. (2013). Efficacy of N-acetylcysteine in phenotypic suppression of mouse models of niemann-pick disease, type C1. *Human Molecular Genetics*, 22(17), 3508–3523. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt206>
- Fu, R., Yanjanin, N. M., Bianconi, S., Pavan, W. J., & Porter, F. D. (2010). Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C. *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(2–3), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.06.018>
- Furukawa, Y., & O'Halloran, T. V. (2006). Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(5–6), 847–867. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.847>
- Gan, L., & Johnson, J. A. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1208–1218. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.011>
- Gartner, J. C., Bergman, I., Malatack, J. J., Zitelli, B. J., Jaffe, R., Watkins, J. B., Shaw, B. W., Iwatsuki, S., & Starzi, T. E. (1986). Progression of Neurovisceral Storage Disease With Supranuclear Ophthalmoplegia Following Orthotopic Liver Transplantation. *Pediatrics*, 77(1), 104–106.
- Geberhiwot, T., Moro, A., Dardis, A., Ramaswami, U., Sirrs, S., Marfa, M. P., Vanier, M. T., Walterfang, M., Bolton, S., Dawson, C., Héron, B., Stampfer, M., Imrie, J., Hendriksz, C., Gissen, P., Crushell, E., Coll, M. J., Nadjar, Y., Klünemann, H., ... Patterson, M. (2018). Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/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), 8229–8236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708735200>
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8), 959–975.

3908(01)00019-3

- Girnun, G. D., Domann, F. E., Moore, S. A., & Robbins, M. E. C. (2002). Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Molecular Endocrinology*, *16*(12), 2793–2801. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0020>
- Giulian, D., Vaca, K., & Corpuz, M. (1993). Brain Glia Release Survival Factors with Opposing Actions upon Neuronal. *The Journal of Neuroscience*, *13*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-01-00029.1993>
- Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: Looking for complete identity. *Protein and Cell*, *1*(10), 888–897. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>
- Greer, W. L., Riddell, D. C., Byers, D. M., Welch, J. P., Girouard, G. S., Sparrow, S. M., Gillan, T. L., & Neumann, P. E. (1997). Linkage of Niemann-Pick Disease Type D to the Same Region of Human Chromosome 18 as Niemann-Pick Disease Type C. *The American Journal of Human Genetics*, *61*(1), 139–142. <https://doi.org/10.1086/513899>
- Griese, M., Brasch, F., Aldana, V. R., Cabrera, M. M., Goelnitz, U., Ikonen, E., Karam, B. J., Liebisch, G., Linder, M. D., Lohse, P., Meyer, W., Schmitz, G., Pamir, A., Ripper, J., Rolfs, A., Schams, A., & Lezana, F. J. (2010). Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis. *Clinical Genetics*, *77*(2), 119–130. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01325.x>
- Groeger, G., Doonan, F., Cotter, T. G., & Donovan, M. (2012). Reactive oxygen species regulate prosurvival ERK1/2 signaling and bFGF expression in gliosis within the retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *53*(10), 6645–6654. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10525>
- Guo, H., Lin, W., Zhang, X., Zhang, X., Hu, Z., Li, L., Duan, Z., Zhang, J., & Ren, F. (2017). Kaempferol induces hepatocellular carcinoma cell death via endoplasmic reticulum stress-CHOP-autophagy signaling pathway. *Oncotarget*, *8*(47), 82207–82216. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19200>
- Gureev, A. P., Sadovnikova, I. S., Starkova, N. N., Starkov, A. A., & Popov, V. N. (2020). P62-Nrf2-p62 Mitophagy Regulatory Loop as a Target for Preventive Therapy of Neurodegenerative Diseases. *Brain Sciences*, *10*(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/brainsci10110847>
- Haider, L., Fischer, M. T., Frischer, J. M., Bauer, J., Höftberger, R., Botond, G., Esterbauer, H., Binder, C. J., Witztum, J. L., & Lassmann, H. (2011). Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, *134*(7), 1914–1924. <https://doi.org/10.1093/brain/awr128>
- Harzer, K., Rolfs, A., Bauer, P., Zschesche, M., Mengel, E., Backes, J., Kustermann-Kuhn, B., Bruchelt, G., Van Diggelen, O. P., Mayrhofer, H., & Krägeloh-Mann, I. (2003). Niemann-Pick Disease Type A and B are Clinically but also Enzymatically Heterogeneous: Pitfall in the Laboratory Diagnosis of Sphingomyelinase Deficiency Associated with the Mutation Q292 K. *Neuropediatrics*, *34*(6), 301–306. <https://doi.org/10.1055/s-2003-44668>
- Hebbar, M., Prasada L, H., Bhowmik, A. Das, Trujillano, D., Shukla, A., Chakraborti, S., Kandaswamy, K. K., Rolfs, A., Kamath, N., Dalal, A., Bielas, S., & Girisha, K. M. (2016). Homozygous deletion of exons 2 and 3 of NPC2 associated with Niemann-Pick disease type C. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *170*(9), 2486–2489. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37794>

- Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., Stalpers, E. M., & Bast, A. (2002). Protection of Flavonoids Against Lipid Peroxidation : The Structure Activity Relationship Revisited. *Free Radical Research*, *36*(5), 575–581. <https://doi.org/10.1080/10715760290025951>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 572–584. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(02)00208-5)
- Heinzelmann, S., & Bauer, G. (2010). Multiple protective functions of catalase against intercellular apoptosis-inducing ROS signaling of human tumor cells. *Biological Chemistry*, *391*(6), 675–693. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.068>
- Hepel, M., & Andreescu, S. (2015). Oxidative stress and human health. *ACS Symposium Series*, *1200*, 1–33. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1200.ch001>
- Hitchler, M. J., Wikainapakul, K., Yu, L., Powers, K., Attatippaholkun, W., & Domann, F. E. (2006). Epigenetic regulation of manganese superoxide dismutase expression in human breast cancer cells. *Epigenetics*, *1*(4), 163–171. <https://doi.org/10.4161/epi.1.4.3401>
- Hogg, N., Darley-Usmar, V. M., Wilson, M. T., & Moncada, S. (2015). Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochemical Journal*, *281*(2), 419–424. <https://doi.org/10.1042/bj2810419>
- Hsu, Y.-S., Hwu, S.-F., Huang, S.-F., Lu, M.-Y., Chen, R.-L., Lin, K.-H., Peng, S., & Lin, K.-H. (1999). Niemann–Pick disease type C (a cellular cholesterol lipidosis) treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *24*(1), 103–107. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1701826>
- Huang, X., Warren, J. T., Buchanan, J., Gilbert, L. I., & Scott, M. P. (2007). Drosophila Niemann-Pick Type C-2 genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: a model of human neurodegenerative disease. *Development*, *134*(20), 3733–3742. <https://doi.org/10.1242/dev.004572>
- Huang, Y., He, T., & Domann, F. E. (1999). Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA and Cell Biology*, *18*(8), 643–652. <https://doi.org/10.1089/104454999315051>
- Hunter, F. E., Scott, A., Hoffsten, P. E., Gebicki, J. M., Weinstein, J., & Schneider, A. (1964). Studies on the Mechanism of Swelling, Lysis, and Disintegration of. *The Journal of Biological Chemistry*, *239*(2), 614–621. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51727-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51727-0)
- Inestrosa, N. C., Godoy, J. A., Quintanilla, R. A., Koenig, C. S., & Bronfman, M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents  $\beta$ -amyloid neurodegeneration: Role of Wnt signaling. *Experimental Cell Research*, *304*(1), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.09.032>
- Infante, R. E., Abi-Mosleh, L., Radhakrishnan, A., Dale, J. D., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2008). Purified NPC1 Protein I.Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(2), 1052–1063. <https://doi.org/10.1074/jbc.m707943200>
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Chen, J., Tsai, M., Martin, J. C., Smith, C. D., & Beckman, J. S. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *298*(2), 431–437. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90431-U](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90431-U)

- Iturriaga, C., Pineda, M., Fernández-Valero, E. M., Vanier, M. T., & Coll, M. J. (2006). Niemann-Pick C disease in Spain: Clinical spectrum and development of a disability scale. *Journal of the Neurological Sciences*, 249(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.05.054>
- Jembrek, M. J., Vlainsi, J., Vida, Č., & Suzana, S. (2018). Atomic force microscopy reveals new biophysical markers for monitoring subcellular changes in oxidative injury: Neuroprotective effects of quercetin at the nanoscale. *PLoS ONE*, 13(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200119>
- Jiang, J., Yu, S., Jiang, Z., Liang, C., Yu, W., Li, J., Du, X., Wang, H., Gao, X., & Wang, X. (2014). N-acetyl-serotonin protects HepG2 cells from oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/310504>
- Jiang, X., Sidhu, R., Porter, F. D., Yanjanin, N. M., Speak, A. O., te Vrugte, D. T., Platt, F. M., Fujiwara, H., Scherrer, D. E., Zhang, J., Dietzen, D. J., Schaffer, J. E., & Ory, D. S. (2011). A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *Journal of Lipid Research*, 52(7), 1435–1445. <https://doi.org/10.1194/jlr.d015735>
- Jiménez-Moreno, N., Stathakos, P., Caldwell, M., & Lane, J. (2017). Induced Pluripotent Stem Cell Neuronal Models for the Study of Autophagy Pathways in Human Neurodegenerative Disease. *Cells*, 6(3), 24. <https://doi.org/10.3390/cells6030024>
- Jones, P. A., & Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian development. *Science*, 293(5532), 1068–1070. <https://doi.org/10.1126/science.1063852>
- Kavetsky, L., Green, K. K., Boyle, B. R., Yousufzai, F. A. K., Padron, Z. M., Melli, S. E., Kuhnel, V. L., Jackson, H. M., Blanco, R. E., Howell, G. R., & Soto, I. (2019). Increased interactions and engulfment of dendrites by microglia precede Purkinje cell degeneration in a mouse model of Niemann Pick Type-C. *Scientific Reports*, 9(1), 14722. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51246-1>
- Kayatekin, C., Zitzewitz, J. A., & Matthews, C. R. (2008). Zinc Binding Modulates the Entire Folding Free Energy Surface of Human Cu,Zn Superoxide Dismutase. *Journal of Molecular Biology*, 384(2), 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.045>
- Kelly, D. A., Portmann, B., Mowat, A. P., Sherlock, S., & Lake, B. D. (1993). Niemann-Pick disease type C: Diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *The Journal of Pediatrics*, 123(2), 242–247. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)81695-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)81695-6)
- Kennedy, B. E., LeBlanc, V. G., Mailman, T. M., Fice, D., Burton, I., Karakach, T. K., & Karten, B. (2013). Pre-symptomatic activation of antioxidant responses and alterations in glucose and pyruvate metabolism in niemann-pick type C1-deficient murine brain. *PLoS ONE*, 8(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082685>
- Kennedy, B. E., Madreiter, C. T., Vishnu, N., Malli, R., Graier, W. F., & Karten, B. (2014). Adaptations of energy metabolism associated with increased levels of mitochondrial cholesterol in Niemann-Pick type C1-deficient cells. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16278–16289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559914>
- Khan, H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W. S., & Akkol, E. K. (2020). Neuroprotective effects of quercetin in alzheimer's disease. *Biomolecules*, 10(1), 59–79. <https://doi.org/10.3390/biom10010059>

- Kiaei, M., Kipiani, K., Chen, J., Calingasan, N. Y., & Beal, M. F. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist extends survival in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, *191*(2), 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.10.007>
- Kim, S. J., Lee, B. H., Lee, Y. S., & Kang, K. S. (2007). Defective cholesterol traffic and neuronal differentiation in neural stem cells of Niemann-Pick type C disease improved by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *360*(3), 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.116>
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (1984). Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(14 I), 4343–4347. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.14.4343>
- Kirkman, H. N., & Gaetani, G. F. (2007). Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
- Klein, A., Amigo, L., Retamal, M. J., Morales, M. G., Miquel, J. F., Rigotti, A., & Zanlungo, S. (2006). NPC2 Is Expressed in Human and Murine Liver and Secreted Into Bile: Potential Implications for Body Cholesterol Homeostasis. *Hepatology*, *43*(1), 126–133. <https://doi.org/10.1002/hep.20985>
- Klein, A., Maldonado, C., Vargas, L. M., Gonzalez, M., Robledo, F., Perez de Arce, K., Muñoz, F. J., Hetz, C., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2011). Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Neurobiology of Disease*, *41*(1), 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.008>
- Knirsch, L., & Clerch, L. B. (2001). Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry*, *40*(26), 7890–7895. <https://doi.org/10.1021/bi010197n>
- Ko, D. C., Binkley, J., Sidow, A., & Scott, M. P. (2003). The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(5), 2518–2525. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530027100>
- Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M., & Žák, A. (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biologica (Czech Republic)*, *60*(4), 153–167.
- Koppal, T., Subramaniam, R., Drake, J., Prasad, M. R., Dhillon, H., & Butterfield, D. A. (1998). Vitamin E protects against Alzheimer's amyloid peptide (25-35)-induced changes in neocortical synaptosomal membrane lipid structure and composition. *Brain Research*, *786*(1–2), 270–273. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01466-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01466-2)
- Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, *6*(5), 513–519. <https://doi.org/10.1038/74994>
- Kuijlaars, J., Oyelami, T., Diels, A., Rohrbacher, J., Versweyveld, S., Meneghello, G., Tueffer, M., Verstraelen, P., Detrez, J. R., Verschuuren, M., Vos, W. H. De, Meert, T., & Peeters, P. J. (2016). Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Scientific Reports*, *6*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep36529>
- Kumar, A. D. N., Bevara, G. B., Kaja, L. K., Badana, A. K., & Malla, R. R. (2016). Protective effect of 3-O-methyl quercetin and kaempferol from *Semecarpus anacardium* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- O 2 induced cytotoxicity in lung and liver cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 376(13), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1354-z>
- 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), 1213–1224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>
- Lash, L. H. (2006). Mitochondrial glutathione transport: Physiological, pathological and toxicological implications. *Chemico-Biological Interactions*, 163(1–2), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.03.001>
- Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., & Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9782–9787. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9782>
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochemical Journal*, 441(2), 523–540. <https://doi.org/10.1042/BJ20111451>
- Lee, S. E., Shin, N., Kook, M. G., Kong, D., Kim, N. G., Choi, S. W., & Kang, K. S. (2020). Human iNSC-derived brain organoid model of lysosomal storage disorder in Niemann–Pick disease type C. *Cell Death and Disease*, 11(1059). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03262-7>
- Li, H., Kantoff, P. W., Giovannucci, E., Leitzmann, M. F., Gaziano, J. M., Stampfer, M. J., & Ma, J. (2005). Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. *Cancer Research*, 65(6), 2498–2504. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3535>
- Li, W., Wu, M., Tang, L., Pan, Y., Liu, Z., Zeng, C., Wang, J., Wei, T., & Liang, G. (2015). Novel curcumin analogue 14p protects against myocardial ischemia reperfusion injury through Nrf2-activating anti-oxidative activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.12.001>
- Li, X., Kong, L., Li, J., He, H., & Zhou, Y. (2013). Kaempferol suppresses lipid accumulation in macrophages through the downregulation of cluster of differentiation 36 and the upregulation of scavenger receptor class B type I and ATP-binding cassette transporters A1 and G1. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 31, 331–338. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1204>
- Li, X., Lu, F., Trinh, M. N., Schmiede, P., Seemann, J., Wang, J., & Blobel, G. (2017). A 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), 9116–9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711716114>
- Liao, A. C., Craver, B. M., Tseng, B. P., Tran, K. K., Parihar, V. K., Acharya, M. M., & Limoli, C. L. (2013). Mitochondrial-targeted human catalase affords neuroprotection from proton irradiation. *Radiation Research*, 180(1), 1–6. <https://doi.org/10.1667/RR3339.1>
- Liao, W., Wang, Z., Fu, Z., Ma, H., Jiang, M., Xu, A., & Zhang, W. (2019). p62/SQSTM1 protects against cisplatin-induced oxidative stress in kidneys by mediating the cross talk between autophagy and the Keap1-Nrf2 signalling pathway. *Free Radical Research*, 53(7), 800–814. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1635251>

- Lieberman, A. P., Puertollano, R., Raben, N., Slaugenhaupt, S., Walkley, S. U., & Ballabio, A. (2012). Autophagy in lysosomal storage disorders. *Autophagy*, 8(5), 719–730. <https://doi.org/10.4161/auto.19469>
- Liedtke, M., Völkner, C., Hermann, A., & Frech, M. J. (2022). Impact of Organelle Transport Deficits on Mitophagy and Autophagy in Niemann – Pick Disease Type C. *Cells*, 11(3), 507–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells11030507>
- Liedtke, M., Völkner, C., Jürs, A. V. ., Peter, F., Rabenstein, M., Hermann, A., & Frech, M. J. (2021). Pathophysiological In Vitro Profile Of Neuronal Differentiated Cells Derived from Niemann-Pick Disease type C2 Patient-Specific iPSCs Carrying the NPC2 Mutations c.58G>T/c.140G>T. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4009. <https://doi.org/10.3390/ijms22084009>
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Lionaki, E., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2015). Mitochondria, autophagy and age-associated neurodegenerative diseases: New insights into a complex interplay. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(11), 1412–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.04.010>
- Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78, 18–25. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12101>
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A., & Platt, F. M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine*, 14(11), 1247–1255. <https://doi.org/10.1038/nm.1876>
- Lloyd, R. V, Hanna, P. M., & Mason, R. P. (1997). The Origin Of The Hydroxyl Radical Oxygen In The Fenton Reaction. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 885–888. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00432-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00432-7)
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(17), 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>
- Löffler, G. E., Petrides, P., & Heinrich, C. (2007). Biochemie und Pathobiochemie. In *Springer-Lehrbuch* (Vol. 8).
- Lopez-Gonzalez, R., Lu, Y., Gendron, T. F., Karydas, A., Tran, H., Yang, D., Petrucelli, L., Miller, B. L., Almeida, S., & Gao, F. (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron*, 92(2), 383–391. [https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.015.Poly\(GR\)](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.015.Poly(GR))
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., & Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in alzheimer's disease. *Neurology*, 45(8), 1594–1601. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.8.1594>
- Lowenthal, A. C., Cummings, J. F., Wenger, D. A., Thrall, M. A., Wood, P. A., & de Lahunta, A. (1990). Feline sphingolipidosis resembling Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathologica*, 81(2), 189–197. <https://doi.org/10.1007/BF00334507>



- Maarup, T. J., Chen, A. H., Porter, F. D., Farhat, N. Y., Ory, D. S., Sidhu, R., Jiang, X., & Dickson, P. I. (2015). Intrathecal 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in a single patient with Niemann-Pick C1. *Molecular Genetics and Metabolism*, *116*(1–2), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.07.001>
- MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., & Thompson, J. A. (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*, *37*(6), 1613–1622. <https://doi.org/10.1021/bi971894b>
- Macmillan-Crow, L. A., & Thompson, J. A. (1999). Tyrosine Modifications and Inactivation of Active Site Manganese Superoxide Dismutase Mutant ( Y34F ). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *366*(1), 82–88. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1202>
- Mann, H., McCoy, M. T., Subramaniam, J., Van Remmen, H., & Cadet, J. L. (1997). Overexpression of superoxide dismutase and catalase in immortalized neural cells: Toxic effects of hydrogen peroxide. *Brain Research*, *770*(1–2), 163–168. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00768-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00768-3)
- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., Enrich, C., Fernandez-Checa, J. C., & García-Ruiz, C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*, *4*(3), 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.006>
- Marí, M., Colell, A., Morales, A., Caballero, F., Moles, A., Fernández, A., Terrones, O., Basañez, G., Antonsson, B., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2008). Mechanism of Mitochondrial Glutathione-Dependent Hepatocellular Susceptibility to TNF Despite NF- $\kappa$ B Activation. *Gastroenterology*, *134*(5), 1507–1520. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.073>
- Marín, T., Contreras, P., Castro, J. F., Chamorro, D., Balboa, E., Bosch-Morató, M., Muñoz, F. J., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2014). Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases c-Abl/p73 activation in Niemann-Pick C mice. *Nutrients*, *6*(8), 3000–3017. <https://doi.org/10.3390/nu6083000>
- Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(24 I), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7634>
- Marnett, L. J., Riggins, J. N., & West, J. D. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *Journal of Clinical Investigation*, *111*(5), 583–593. <https://doi.org/10.1172/jci200318022>
- Matencio, A., Caldera, F., Cecone, C., López-nicolás, J. M., & Trotta, F. (2020). Cyclic oligosaccharides as active drugs, an updated review. *Pharmaceuticals*, *13*(10), 281–301. <https://doi.org/10.3390/ph13100281>
- Matsuo, M., Togawa, M., Hirabaru, K., Mochinaga, S., Narita, A., Adachi, M., Egashira, M., Irie, T., & Ohno, K. (2013). Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann-Pick Type C disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *108*(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.11.005>
- Maue, R. A., Burgess, R. W., Wang, B., Wooley, C. M., Seburn, K. L., Vanier, M. T., Rogers, M. A., Chang, C. C., Chang, T. Y., Harris, B. T., Graber, D. J., Penatti, C. A. A., Porter, D. M., Szwergold, B. S., Henderson, L. P., Totenhagen, J. W., Trouard, T. P., Borbon, I. A., & Erickson, R. P. (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), 730–750. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr505>
- McCord, J. M. (2000). The Evolution of Free Radicals and. *The American Journal of Medicine*, 108(8), 652–659. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00412-5)
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). GLUTATHIONE. *Annual Review Biochemistry*, 52, 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Mémet, S. (2006). NF- $\kappa$ B functions in the nervous system: From development to disease. *Biochemical Pharmacology*, 72(9), 1180–1195. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.003>
- Miao, L., & St. Clair, D. K. (2010). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in diseases. *Free Radic Biol Med*, 47(4), 344–356. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018>. Regulation
- Millat, G., Chikh, K., Naureckiene, S., Sleat, D. E., Fensom, A. H., Higaki, K., Elleder, M., Lobel, P., & Vanier, M. T. (2001). Niemann-pick disease type C: Spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *American Journal of Human Genetics*, 69(5), 1013–1021. <https://doi.org/10.1086/324068>
- Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A. H., Harzer, K., Wenger, D. A., Ohno, K., & Vanier, M. T. (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. *The American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1373–1385. <https://doi.org/10.1086/320606>
- Min, J. Y., Lim, S. O., & Jung, G. (2010). Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Letters*, 584(11), 2427–2432. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.048>
- Murakami, K., Ichinohe, Y., Koike, M., Sasaoka, N., Iemura, S. I., Natsume, T., & Kakizuka, A. (2013). VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels. *PLoS ONE*, 8(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056012>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Myhrstad, M. C. W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R., & Moskaug, J. Ø. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(5), 386–393. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00812-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00812-7)
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lacklan, 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), 2298–2301. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2298>
- Ni, S., Yu, Y., Zhang, Y., Wu, W., Lai, K., & Yao, K. (2013). Study of Oxidative Stress in Human Lens Epithelial Cells Exposed to 1.8 GHz Radiofrequency Fields. *PLoS ONE*, 8(8), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072370>
- Ochiai, A., Miyata, S., Iwase, M., Shimizu, M., Inoue, J., & Sato, R. (2016). Kaempferol stimulates gene expression of low-density lipoprotein receptor through activation of Sp1 in cultured hepatocytes. *Scientific Reports*, 6, 24940–24950. <https://doi.org/10.1038/srep24940>

- 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), 12473–12478. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405255101>
- Ohsaki, Y., Sugimoto, Y., Suzuki, M., Hosokawa, H., Yoshimori, T., Davies, J. P., Ioannou, Y. A., Vanier, M. T., Ohno, K., & Ninomiya, H. (2006). Cholesterol depletion facilitates ubiquitylation of NPC1 and its association with SKD1/Vps4. *Journal of Cell Science*, *119*(13), 2643–2653. <https://doi.org/10.1242/jcs.02993>
- Ohshima, H., Brouet, I., Friesen, M., & Bartsch, H. (1990). Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. *IARC Scientific Publications*, *28*(105), 443–448. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(90\)90173-k](https://doi.org/10.1016/0278-6915(90)90173-k)
- Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu,Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(42), 38388–38393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>
- Okamura, N., Kiuchi, S., Tamba, M., Kashima, T., Hiramoto, S., Baba, T., Dacheux, F., Dacheux, J. L., Sugita, Y., & Jin, Y. Z. (1999). A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1438*(3), 377–387. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00070-0)
- Ordonez, P. M., Roberts, E. A., Kidwell, C. U., Yuan, S. H., Plaisted, W. C., & Goldstein, L. S. B. (2012). Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann pick type C1. *Human Molecular Genetics*, *21*(12), 2651–2662. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddo090>
- Ory, D. S. (2000). Niemann-Pick type C: A disorder of cellular cholesterol trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1529*(1–3), 331–339. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00158-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00158-X)
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, *87*(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pan, X., Liu, X., Zhao, H., Wu, B., & Liu, G. (2020). Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effect of kaempferol on rotenone-induced Parkinson's disease model of rats and SH-S5Y5 cells by preventing loss of tyrosine hydroxylase. *Journal of Functional Foods*, *74*, 104140. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104140>
- Parasassi, T., Brunelli, R., Costa, G., Spirito, M. De, Krasnowska, E. K., Lundeberg, T., Pittaluga, E., & Ursini, F. (2010). Thiol Redox Transitions in Cell Signaling : a Lesson from N-Acetylcysteine. *The Scientific World JOURNAL*, *10*, 1192–1202. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.104>
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M., & Ghafourifar, P. (2009). Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *41*(10), 2015–2024. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.008>
- Parihar, V. K., Allen, B. D., Tran, K. K., Chmielewski, N. N., Craver, B. M., Martirosian, V., Morganti, J. M., Rosi, S., Vlkolinsky, R., Acharya, M. M., Nelson, G. A., Allen, A. R., & Limoli, C. L. (2015). Targeted overexpression of mitochondrial catalase prevents

- radiation-induced cognitive dysfunction. *Antioxidants and Redox Signaling*, 22(1), 78–91. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5929>
- Patterson, M. C., Mengel, E., Vanier, M. T., Moneuse, P., Rosenberg, D., & Pineda, M. (2020). Treatment outcomes following continuous miglustat therapy in patients with Niemann-Pick disease Type C: A final report of the NPC Registry. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01363-2>
- Pegoretti, V., Swanson, K. A., Bethea, J. R., Probert, L., Eisel, U. L. M., & Fischer, R. (2020). Inflammation and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Consequences for Therapy Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2020/7191080>
- Pentchev, P. G., Boothe, A. D., Kurth, H. S., Weintroub, H., Stivers, J., & Brady, R. O. (1984). A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 259(9), 5784–5791.
- Pentchev, P. G., Brady, R. O., Joan, E., Vanier, M. T., Carstea, E. D., Parker, C. C., Goldin, E., & Roff, C. F. (1994). The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1225, 235–243. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90001-9)
- Pentchev, P. G., Gal, A. E., Booth, A. D., Omodeo-Sale, F., Fouks, J., Neumeyer, B. A., Quirk, J. M., Dawson, G., & Brady, R. O. (1980). A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of shingomyelinase and Glucocerebrosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 619, 669–679. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90116-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(80)90116-2)
- Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt ( WST-1 ). *Clinica Chimica Acta*, 293, 157–166. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(99\)00246-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(99)00246-6)
- Peter, F., Rost, S., Rolfs, A., & Frech, M. J. (2017). Activation of PKC triggers rescue of NPC1 patient specific iPSC derived glial cells from gliosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0697-y>
- Peter, F., Trilck, M., Rabenstein, M., Rolfs, A., & Frech, M. J. (2017). 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, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.03.042>
- Pettazzoni, M., Froissart, R., Pagan, C., Vanier, M. T., Ruet, S., Latour, P., Guffon, N., Fouilhoux, A., Germain, D. P., Levade, T., Vianey-Saban, C., Piraud, M., & Cheillan, D. (2017). LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease. *PLoS ONE*, 12(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181700>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Phillips, M., Cataneo, R. N., Cheema, T., & Greenberg, J. (2004). Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 344(1–2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.02.025>
- Pipalia, N. H., Cosner, C. C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., & Farley, N. (2011).

- Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *PNAS*, *108*(14), 5620–5625. <https://doi.org/www.pnas.10.1073/pnas.1014890108>
- Porter, F. D., Scherrer, D. E., Lanier, M. H., Langmade, S. J., Molugu, V., Gale, S. E., Olzeski, D., Sidhu, R., Dietzen, D. J., Fu, R., Wassif, C. A., Yanjanin, N. M., Marso, S. P., House, J., Vite, C., Schaffer, J. E., & Ory, D. S. (2010). Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Science Translational Medicine*, *2*(56), 1–13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001417>
- Praggastis, M., Tortelli, B., Zhang, J., Fujiwara, H., Sidhu, R., Chacko, A., Chen, Z., Chung, C., Lieberman, A. P., Sikora, J., Davidson, C., Walkley, S. U., Pipalia, N. H., Maxfield, F. R., Schaffer, J. E., & Ory, D. S. (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), 8091–8106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4173-14.2015>
- Quan, X., Lim, S. O., & Jung, G. (2011). Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG Island in the Oct-1 promoter. *FEBS Letters*, *585*(21), 3436–3441. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.09.035>
- 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*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.06.007>
- Rabenstein, M., Peter, F., Rolfs, A., & Frech, M. J. (2018). Impact of Reduced Cerebellar EAAT Expression on Purkinje Cell Firing Pattern of NPC1-deficient Mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21805-z>
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(12), 4003–4008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307446101>
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., & Castro, L. (2002). Nitric Oxide in Mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, *33*(11), 1451–1464.
- Rapoport, S. I., Rao, J., & Igarashi, M. (2007). Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, *77*(5–6), 251–261. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.023>
- 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*, *14*(7), 1734–1749. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.045609>
- Reddy, J. V., Ganley, I. G., & Pfeffer, S. R. (2006). Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. *PLoS ONE*, *1*, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000019>
- Rhee, S. G., Yang, K.-S., Kang, S. W., Woo, H. A., & Chang, T.-S. (2005). Controlled Elimination of Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(5 & 6), 619–626. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4959.2010.00371.x>

- Ribas, G. S., Pires, R., Coelho, J. C., Rodrigues, D., Mescka, C. P., Vanzin, C. S., Biancini, G. B., Negretto, G., Wayhs, C. A. Y., Wajner, M., & Vargas, C. R. (2012). Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: A protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *30*(6), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.07.002>
- Rodriguez-Gil, J. L., Larson, D. M., Wassif, C. A., Yanjanin, N. M., Anderson, S. M., Kirby, M. R., Trivedi, N. S., Porter, F. D., & Pavan, W. J. (2013). A somatic cell defect is associated with the onset of neurological symptoms in a lysosomal storage disease Jorge. *Molecular Genetics and Metabolism*, *110*(1–2), 188–190. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.06.010>
- Rodríguez-Pascau, L., Toma, C., Macías-Vidal, J., Cozar, M., Cormand, B., Lykopoulou, L., Coll, M. J., Grinberg, D., & Vilageliu, L. (2012). Characterisation of two deletions involving NPC1 and flanking genes in Niemann-Pick Type C disease patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, *107*(4), 716–720. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.10.004>
- Roney, J. C., Li, S., Farfel-Becker, T., Huang, N., Sun, T., Xie, Y., Cheng, X. T., Lin, M. Y., Platt, F. M., & Sheng, Z. H. (2021). Lipid-mediated motor-adaptor sequestration impairs axonal lysosome delivery leading to autophagic stress and dystrophy in Niemann-Pick type C. *Developmental Cell*, *56*(10), 1452–1468. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.032>
- Rosenbaum, A. I., Zhang, G., Warren, J. D., & Maxfield, F. R. (2010). Endocytosis of beta-cyclodextrins is responsible for cholesterol reduction in Niemann-Pick type C mutant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(12), 5477–5482. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914309107>
- Rubino, V., Palatucci, A. T., La Rosa, G., Giovazzino, A., Aruta, F., Damiano, S., Carriero, F., Santillo, M., Iodice, R., Mondola, P., Ruggiero, G., & Terrazzano, G. (2021). Superoxide dismutase-1 intracellular content in T lymphocytes associates with increased regulatory T cell level in multiple sclerosis subjects undergoing immune-modulating treatment. *Antioxidants*, *10*(12), 1940. <https://doi.org/10.3390/antiox10121940>
- Rupérez, A. I., Gil, A., & Aguilera, C. M. (2014). Genetics of Oxidative Stress in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(2), 3118–3144. <https://doi.org/10.3390/ijms15023118>
- Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S., & Russo, G. L. (2012). The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*, *83*, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.010>
- Sabogal-Guáqueta, A. M., Muñoz-Manco, J. I., Ramírez-Pineda, J. R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E., & Cardona-Gómez, G. P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, *93*, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.027>
- Sadeghian, M., Mastrolia, V., Rezaei Haddad, A., Mosley, A., Mullali, G., Schiza, D., Sajic, M., Hargreaves, I., Heales, S., Duchon, M. R., & Smith, K. J. (2016). Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep33249>
- Salehi, I., Karamian, R., Komaki, A., Tahmasebi, L., Taheri, M., Nazari, M., Shahidi, S., &

- Sarihi, A. (2015). Effects of Vitamin E on lead-induced impairments in hippocampal synaptic plasticity. *Brain Research*, 1629, 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.007>
- Sandhir, R., & Mehrotra, A. (2013). Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: Implications in Huntington's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(3), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.018>
- Saran, M., Michel, C., Bors, W., & Czapski, G. (1990). Reaction of no with o2-. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radical Research Communications*, 10(4–5), 221–226. <https://doi.org/10.3109/10715769009149890>
- Schedin, S., Sindelar, P. J., Pentchev, P., Brunk, U., & Dallner, G. (1997). Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6245–6251. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6245>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schipper, H. M. (2004). Redox Neurology: Visions of an Emerging Subspecialty. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 33(1012), 342–354. <https://doi.org/10.1196/annals.1306.027>
- Schreck, R., Rieber, P., & Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO Journal*, 10(8), 2247–2258. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07761.x>
- 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), 48214–48233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406090200>
- Scott, C., & Ioannou, Y. A. (2004). The NPC1 protein: Structure implies function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.006>
- Shih, A. Y., Imbeault, S., Barakauskas, V., Erb, H., Jiang, L., Li, P., & Murphy, T. H. (2005). Induction of the Nrf2-driven Antioxidant Response Confers Neuroprotection during Mitochondrial Stress in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22925–22936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414635200>
- Shin, S. D., Shin, A., Mayagoitia, K., Siebold, L., Rubini, M., Wilson, C. G., Bellinger, D. L., & Soriano, S. (2019). Loss of amyloid precursor protein exacerbates early inflammation in Niemann-Pick disease type C. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1663-5>
- Sidhartha, D. R., & George, B. C. (2009). Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation. In *Roche Diagnostics*. <https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat015>
- Silva dos Santos, J., Gonçalves Cirino, J. P., de Oliveira Carvalho, P., & Ortega, M. M. (2021). The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 11(565700), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.565700>
- Singh, A. K., Kashyap, M. P., Tripathi, V. K., Singh, S., Garg, G., & Rizvi, S. I. (2017). Neuroprotection Through Rapamycin-Induced Activation of Autophagy and

- PI3K/Akt1/mTOR/CREB Signaling Against Amyloid- $\beta$ -Induced Oxidative Stress, Synaptic/Neurotransmission Dysfunction, and Neurodegeneration in Adult Rats. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 5815–5828. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0129-3>
- Singh, D., Kumar, V., & Singh, C. (2017). IFN- $\gamma$  regulates xanthine oxidase-mediated iNOS-independent oxidative stress in maneb- and paraquat-treated rat polymorphonuclear leukocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 427(1–2), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2905-9>
- Smith, D., Wallom, K. L., Williams, I. M., Jeyakumar, M., & Platt, F. M. (2009). Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiology of Disease*, 36(2), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.010>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., Klenk, D. C., & Company, P. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119, 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Solomon, D., Winkelman, A. C., Zee, D. S., Gray, L., & Büttner-Ennever, J. (2005). Niemann-Pick type C disease in two affected sisters: Ocular motor recordings and brain-stem neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1039, 436–445. <https://doi.org/10.1196/annals.1325.041>
- Spiegel, R., Raas-Rothschild, A., Reish, O., Regev, M., Meiner, V., Bargal, R., Sury, V., Meir, K., Nadjari, M., Hermann, G., Iancu, T. C., Shalev, S. A., & Zeigler, M. (2009). The clinical spectrum of fetal Niemann-Pick type C. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 149(3), 446–450. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32642>
- Steinberg, S. J. (1996). Co-cultivation of Niemann-Pick disease type C fibroblasts belonging to complementation groups  $\alpha$  and  $\beta$  stimulates LDL-derived cholesterol esterification. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 19(6), 769–774. <https://doi.org/10.1007/BF01799171>
- Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Klein, J. B., Merchant, M., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2006). Redox proteomics identification of oxidized proteins in Alzheimer's disease hippocampus and cerebellum: An approach to understand pathological and biochemical alterations in AD. *Neurobiology of Aging*, 27(11), 1564–1576. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.021>
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2006). Protein Oxidation and Lipid Peroxidation in Brain of Subjects Neurodegeneration from Redox Proteomics. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(11–12), 2021–2037. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.2021>
- Sun, X., Marks, D. L., Park, W. D., Wheatley, C. L., Puri, V., Brien, J. F. O., Kraft, D. L., Lundquist, P. A., Patterson, M. C., Pagano, R. E., & Snow, K. (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), 1361–1372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/320599>
- Sym, M., Basson, M., & Johnson, C. D. (2000). A model for Niemann-Pick type C disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 10, 527–530. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00468-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00468-1)



- Szeliga, M. (2020). Peroxiredoxins in neurodegenerative diseases. *Antioxidants*, 9(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9121203>
- Tam, O. H., Rozhkov, N. V, Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., Nygc, T., Consortium, A. L. S., Fagegaltier, D., Harris, B. T., Ostrow, L. W., Phatnani, H., Ravits, J., & Dubnau, J. (2019). Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell Reports*, 29(5), 1164–1177. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.066>.Postmortem
- Tan, A. S., & Berridge, M. V. (2000). Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt , WST-1 to produce a soluble formazan : a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. *Journal of Biochemistry and Methods*, 238, 59–68. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00156-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00156-3)
- Tang, Y., Li, H., & Liu, J. P. (2010). Niemann-pick disease type C: From molecule to clinic. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(1), 132–140. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05235.x>
- Testa, M. P., Alvarado, O., Wournell, A., Lee, J., Guilford, F. T., Henriksen, S. H., & Phillips, T. R. (2011). Screening Assay for Oxidative Stress in a Feline Astrocyte Cell Line , G355-5. *Journal of Visualized Experiments*, 53, 5–7. <https://doi.org/10.3791/2841>
- Torres, S., Matías, N., Baulies, A., Nuñez, S., Alarcon-Vila, C., Martinez, L., Nuño, N., Fernandez, A., Caballeria, J., Levade, T., Gonzalez-Franquesa, A., Garcia-Rovés, P., Balboa, E., Zanlungo, S., Fabrías, G., Casas, J., Enrich, C., Garcia-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2017). Mitochondrial GSH replenishment as a potential therapeutic approach for Niemann Pick type C disease. *Redox Biology*, 11, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.010>
- Trendelenburg, G., Vanier, M. T., Maza, S., Millat, G., Bohner, G., Munz, D. L., & Zschenderlein, R. (2006). Niemann–Pick type C disease in a 68-year-old patient. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 77, 996–997. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.085753>
- Trilck, M., Hübner, R., & Frech, M. J. (2016). Generation and Neuronal Differentiation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Niemann-Pick Type C1 Fibroblasts. *Methods in Molecular Biology*, 1353, 233–259. <https://doi.org/10.1007/7651>
- 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(144), 1–12. <https://doi.org/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, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.031>
- Trist, B. G., Davies, K. M., Cottam, V., Genoud, S., Ortega, R., Roudeau, S., Carmona, A., De Silva, K., Wasinger, V., Lewis, S. J. G., Sachdev, P., Smith, B., Troakes, C., Vance, C., Shaw, C., Al-Sarraj, S., Ball, H. J., Halliday, G. M., Hare, D. J., & Double, K. L. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis-like superoxide dismutase 1 proteinopathy is associated with neuronal loss in Parkinson’s disease brain. *Acta Neuropathologica*, 134(1), 113–127. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1726-6>

- Turko, I. V., Li, L., Aulak, K. S., Stuehr, D. J., Chang, J. Y., & Murad, F. (2003). Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart: Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 33972–33977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303734200>
- Ulatowski, L., Parker, R., Davidson, C., Yanjanin, N., Kelley, T. J., Corey, D., Atkinson, J., Porter, F., Arai, H., Walkley, S. U., & Manor, D. (2011). Altered vitamin E status in Niemann-Pick type C disease. *Journal of Lipid Research*, 52(7), 1400–1410. <https://doi.org/10.1194/jlr.M015560>
- Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P., & Mahajan, R. (2009). Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Valentine, J. S., & Hart, P. J. (2003). Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3617–3622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730423100>
- Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(16), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>
- Vanier, M. T. (2013). Niemann-Pick diseases. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 113). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00041-1>
- Vanier, M. T., Duthel, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Pentchev, P., & Carstea, E. D. (1996). Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 118–125. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8554047> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1914948>
- Vanier, M. T., Gissen, P., Bauer, P., Coll, M. J., Burlina, A., Hendriksz, C. J., Latour, P., Goizet, C., Welford, R. W. D., Marquardt, T., & Kolb, S. A. (2016). Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review. *Molecular Genetics and Metabolism*, 118(4), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.004>
- Vanier, M. T., & Millat, G. (2003). Niemann – Pick disease type C. *Clinical Genetics*, 64, 269–281. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2003.00147.x>
- Vanier, M. T., & Suzuki, K. (1998). Recent Advances in Elucidating Niemann-Pick C Disease. *Brain Pathology*, 8, 163–174. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00143.x>
- Vanier, M. T., Wenger, D. A., Comly, M. E., Rousson, R., Brady, R. O., & Pentchev, P. G. (1988). Niemann-Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification. *Clinical Genetics*, 33, 331–348.
- Vázquez, M. C., Balboa, E., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2012). Oxidative stress: A pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/205713>
- Vilaça, R., Barros, I., Matmati, N., Silva, E., Martins, T., Teixeira, V., Hannun, Y. A., & Costa, V. (2018). The ceramide activated protein phosphatase Sit4 impairs sphingolipid dynamics, mitochondrial function and lifespan in a yeast model of Niemann-Pick type C1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(1), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.010>
- Vilaça, R., Silva, E., Nadais, A., Teixeira, V., Matmati, N., Gaifem, J., Hannun, Y. A., Sá

- Miranda, M. C., & Costa, V. (2014). Sphingolipid signalling mediates mitochondrial dysfunctions and reduced chronological lifespan in the yeast model of Niemann-Pick type C1. *Molecular Microbiology*, *91*(3), 438–451. <https://doi.org/10.1111/mmi.12470>
- Völkner, C., Liedtke, M., Hermann, A., & Frech, M. J. (2021). Pluripotent stem cells for disease modeling and drug discovery in niemann-pick type c1. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms22020710>
- 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), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms222212184>
- Völkner, C., Pantoom, S., Liedtke, M., Lukas, J., Hermann, A., & Frech, M. J. (2022). Assessment of FDA-Approved Drugs as a Therapeutic Approach for Niemann-Pick Disease Type C1 Using Patient-Specific iPSC-Based Model Systems. *Cells*, *11*(3), 319–344. <https://doi.org/10.3390/cells11030319>
- Völkner, C., Peter, F., Liedtke, M., Krohn, S., Lindner, I., Murua Escobar, H., Cimmaruta, C., Lukas, J., Hermann, A., & Frech, M. J. (2019). Generation of the Niemann–Pick type C2 patient-derived iPSC line AKOSi001-A. *Stem Cell Research*, *41*(September), 101606. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101606>
- Voorink-Moret, M., Goorden, S. M. I., van Kuilenburg, A. B. P., Wijburg, F. A., Ghauharali-van der Vlugt, J. M. M., Beers-Stet, F. S., Zoetekouw, A., Kulik, W., Hollak, C. E. M., & Vaz, F. M. (2018). Rapid screening for lipid storage disorders using biochemical markers. Expert center data and review of the literature. *Molecular Genetics and Metabolism*, *123*(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.12.431>
- Walkley, S. U., & Suzuki, K. (2004). Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1685*(1–3), 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.011>
- Walterfang, M., Abel, L. A., Desmond, P., Fahey, M. C., Bowman, E. A., & Velakoulis, D. (2013). Cerebellar volume correlates with saccadic gain and ataxia in adult Niemann-Pick type C. *Molecular Genetics and Metabolism*, *108*(1), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.11.009>
- Walterfang, M., Patenaude, B., Abel, L. A., Klunenmann, H., Bowman, E. A., Fahey, M. C., Desmond, P., Kelso, W., & Velakoulis, D. (2013). Subcortical volumetric reductions in adult niemann-pick disease type C: A cross-sectional study. *American Journal of Neuroradiology*, *34*(7), 1334–1340. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3356>
- Walton, P. A., Brees, C., Lismont, C., Apanasets, O., & Fransen, M. (2017). The peroxisomal import receptor PEX5 functions as a stress sensor, retaining catalase in the cytosol in times of oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(10), 1833–1843. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.013>
- Wan, X. S., Devalaraja, M. N., & St. Clair, D. K. (1994). Molecular Structure and Organization of the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. *DNA and Cell Biology*, *13*(11), 1127–1136. <https://doi.org/10.1089/dna.1994.13.1127>
- Wang, M., 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),

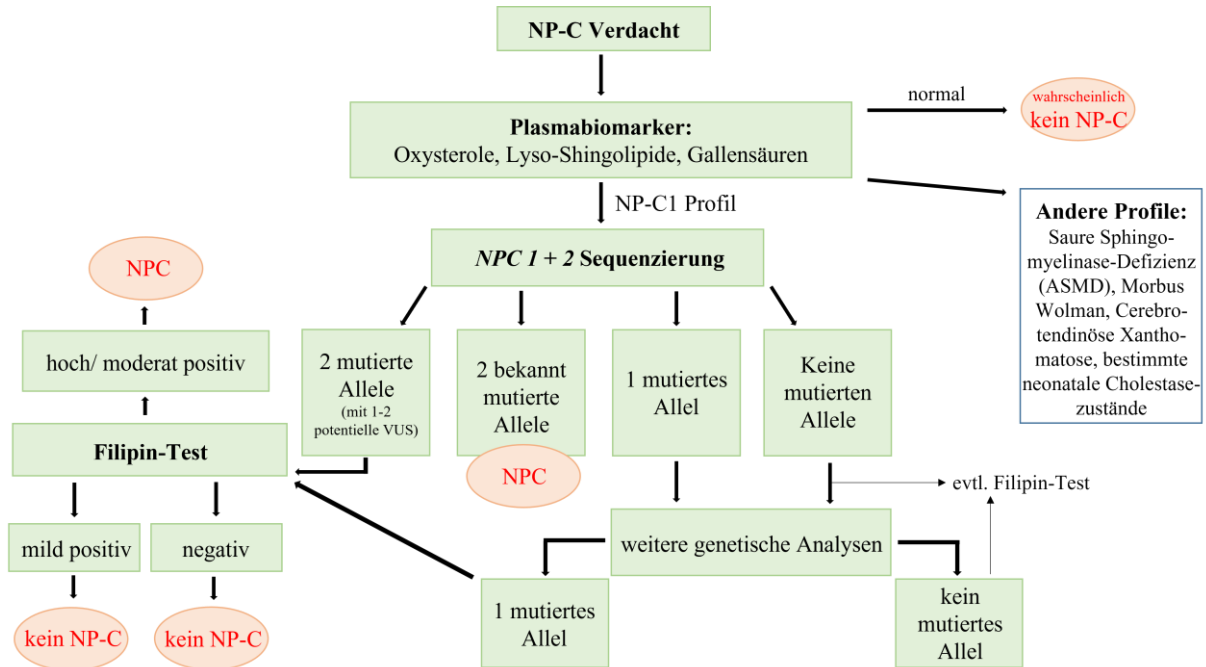
- 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.016>
- Wang, S., Irving, G., Jiang, L., Wang, H., Li, M., Wang, X., Han, W., Xu, Y., Yang, Y., Zeng, T., Song, F., Zhao, X., & Xie, K. (2017). Oxidative Stress Mediated Hippocampal Neuron Apoptosis Participated in Carbon Disulfide-Induced Rats Cognitive Dysfunction. *Neurochemical Research*, *42*(2), 583–594. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2113-8>
- Wang, Y. H., Twu, Y. C., Wang, C. K., Lin, F. Z., Lee, C. Y., & Liao, Y. J. (2018). Niemann-pick type C2 protein regulates free cholesterol accumulation and influences hepatic stellate cell proliferation and mitochondrial respiration function. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms19061678>
- Wassif, C. A., Cross, J. L., Iben, J., Sanchez-Pulido, L., Cougnoux, A., Platt, F. M., Ory, D. S., Ponting, C. P., Bailey-Wilson, J. E., Biesecker, L. G., & Porter, F. D. (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*, *18*(1), 41–48. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.25>
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Neufeld, E. B., Patel, S., Pentchev, P. G., & Strauss, J. F. (1999). Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 21861–21866. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21861>
- Whittemore, E. R., Loo, D. T., & Cotman, C. W. (1994). Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Neuropharmacology and Neurotoxicology*, *5*(12), 1485–1488. <https://doi.org/10.1097/00001756-199407000-00019>
- Woś, M., Szczepanowska, J., Piękła, S., Tylki-Szymańska, A., Zabłocki, K., & Bandorowicz-Piękła, J. (2016). Mitochondrial dysfunction in fibroblasts derived from patients with Niemann-Pick type C disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *593*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.012>
- Wraith, J. E., Baumgartner, M. R., Bembi, B., Covanis, A., Levade, T., Mengel, E., Pineda, M., Sedel, F., Topçu, M., Vanier, M. T., Widner, H., Wijburg, F. A., & Patterson, M. C. (2009). Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Molecular Genetics and Metabolism*, *98*(1–2), 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.06.008>
- 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), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.006>
- Wu, Y. P., Mizukami, H., Matsuda, J., Saito, Y., Proia, R. L., & Suzuki, K. (2005). Apoptosis accompanied by up-regulation of TNF- $\alpha$  death pathway genes in the brain of Niemann-Pick type C disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *84*(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.08.017>
- Xiao, G. G., Nel, A. E., & Loo, J. A. (2005). Nitrotyrosine-modified proteins and oxidative stress induced by diesel exhaust particles. *Electrophoresis*, *26*, 280–292. <https://doi.org/10.1002/elps.200406145>
- Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., & Murayama, K. (1998). Inactivation of Human Manganese-superoxide Dismutase by Peroxynitrite Is Caused by Exclusive Nitration of Tyrosine 34 to 3-Nitrotyrosine. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14085–14089. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14085>

- Yatin, S. M., Aksenova, M., Aksenov, M., Markesbery, W. R., Aulick, T., & Allan Butterfield, D. (1999). Temporal relations among amyloid  $\beta$ -peptide-induced free-radical oxidative stress, neuronal toxicity, and neuronal defensive responses. *Journal of Molecular Neuroscience*, *11*(3), 183–197. <https://doi.org/10.1385/JMN:11:3:183>
- Yévenes, L. F., Klein, A., Castro, J. F., Marín, T., Leal, N., Leighton, F., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2012). Lysosomal vitamin E accumulation in Niemann-Pick type C disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1822*(2), 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.009>
- Yilmaz, B. S., Baruteau, J., Rahim, A. A., & Gissen, P. (2020). Clinical and molecular features of early infantile niemann pick type c disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(14), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21145059>
- Yoo, H. Y., Chang, M. S., & Rho, H. M. (1999). Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid. *Gene*, *234*(1), 87–91. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00176-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00176-6)
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, *54*, 176–186. <https://doi.org/10.1201/b18539>
- Yu, W., Gong, J. S., Ko, M., Garver, W. S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2005). Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 11731–11739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412898200>
- Zagórski, T., Dudek, I., Berkan, L., Mazurek, M., Kedziora, J., & Chmielewski, H. (1991). Superoxide dismutase (SOD-1) activity in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, *25*(6), 725–730.
- Zampieri, S., Mellon, S. H., Butters, T. D., Nevyjel, M., Covey, D. F., Bembi, B., & Dardis, A. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: Protective effect of allopregnanolone. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(9B), 3786–3796. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00493.x>
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S. A., Petit, P. X., Mignotte, B., & Kroemer, G. (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 367–377. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.367>
- Zhao, F., Wu, T., Lau, A., Jiang, T., Huang, Z., Wang, X. J., Chen, W., Wong, P. K., & Zhang, D. D. (2009). Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(6), 867–879. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.029>
- Zhao, Y., Oberley, T. D., Chaiswing, L., Lin, S. M., Epstein, C. J., Huang, T. T., & St. Clair, D. (2002). Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene*, *21*(24), 3836–3846. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205477>
- Zhong, W., Oberley, L. W., Oberley, T. D., & St Clair, D. K. (1997). Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene*, *14*(4), 481–490. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200852>

## 8 Anhang

### 8.1 Ergänzende Materialien zu NP-C und OS

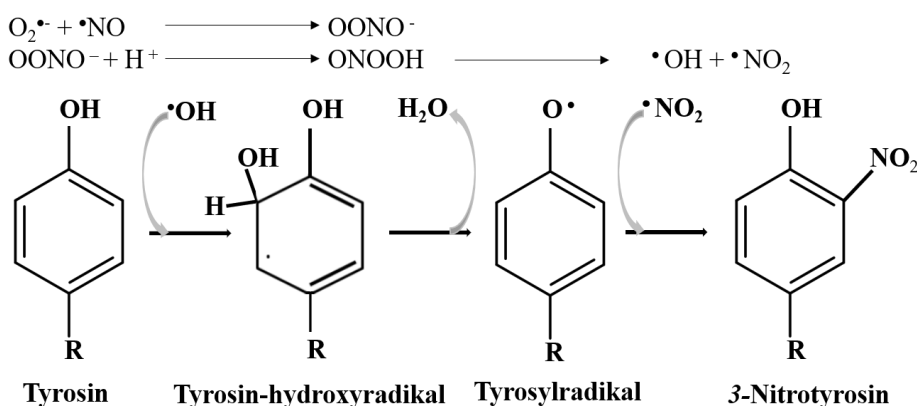
#### 8.1.1 Diagnostik des Morbus Niemann-Pick Typ C



**Abb. 34: Algorithmus der Labordiagnostik des NP-C**

Übersicht über die Labordiagnostik von der Testung der Biomarker über Gensequenzierung bis zum Filipin-Test. Bei dem Filipin-Test gilt als hoch/modert positiv eine Färbung von 80-100 % der Zellen und als mild positiv eine Färbung von 50-80 %. VUS = „variant of unknown significance“. Modifiziert nach Geberhiwot et al., 2018.

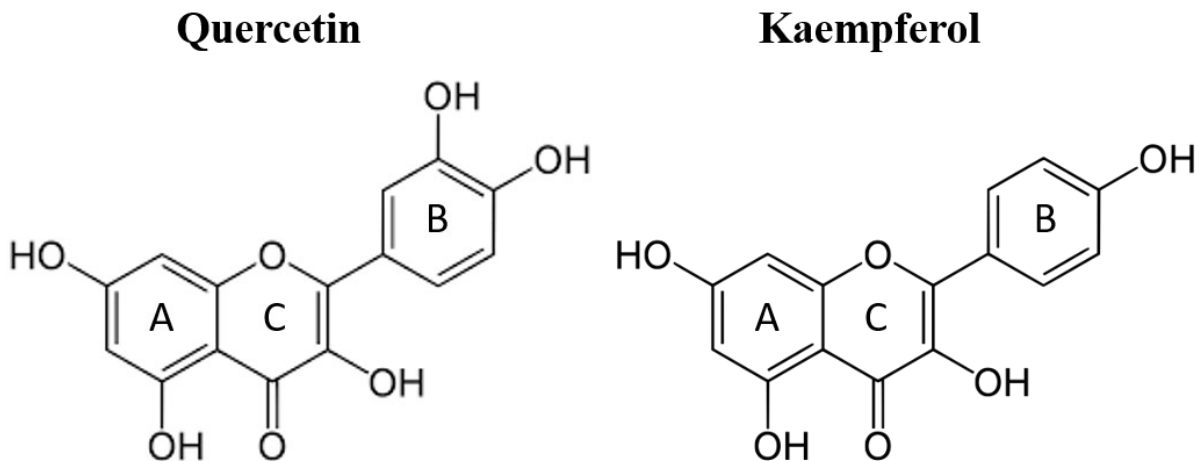
#### 8.1.2 Die Entstehung von 3-Nitrotyrosin über Peroxynitrit



**Abb. 35: Entstehung von 3-Nitrotyrosin über Peroxynitrit**

Das aus der Reaktion von  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und  $\bullet\text{NO}$  entstandene  $\text{OONO}^{\bullet-}$  zerfällt nach Protonierung zu  $\bullet\text{OH}$  und  $\bullet\text{NO}_2$ . Durch Angriff des  $\bullet\text{OH}$  entsteht aus Tyrosin das Tyrosin-hydroxyradikal, das durch Dehydratisierung zum Tyrosylradikal wird. Durch einen radikalischen Angriff von  $\bullet\text{NO}_2$  erfolgt eine Addition einer Nitrogruppe am dritten Kohlenstoffatom im aromatischen Ring, wodurch 3-Nitrotyrosin entsteht. Erstellt nach Radi (2004), Blough und Zafiriou (1985), Saran et al. (1990), Beckman (1996), Pacher, Beckman und Liaudet (2007), Ahsan (2013) und Hogg et al. (2015).

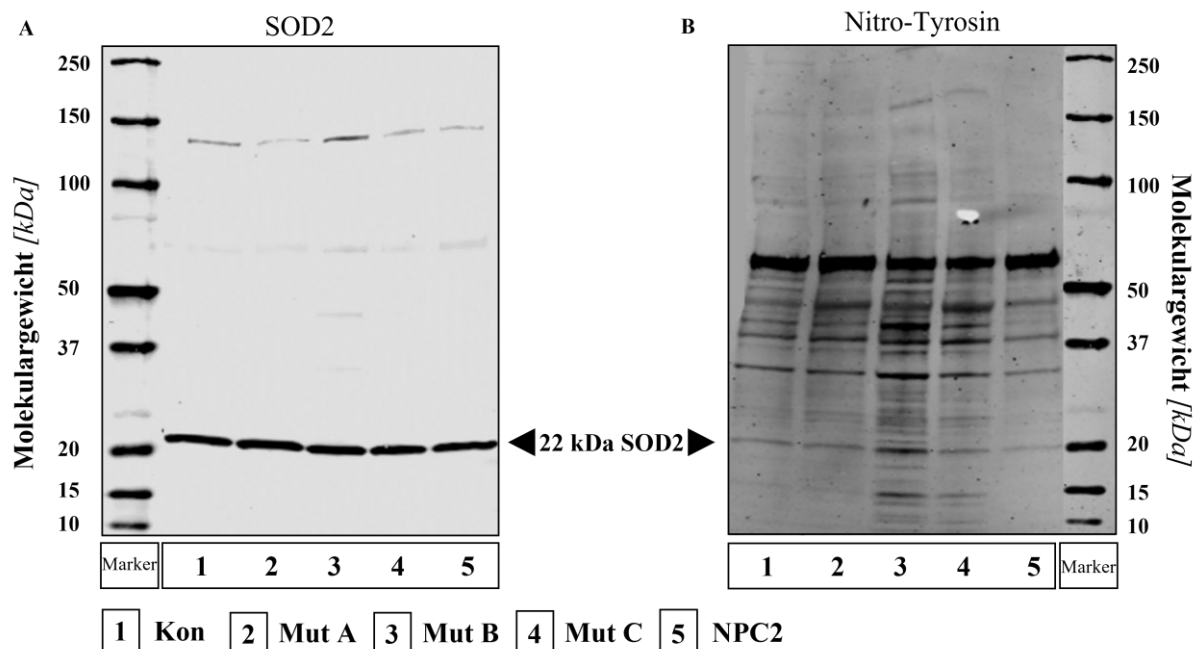
### 8.1.3 Strukturformeln der Flavonoide Quercetin und Kaempferol



**Abb. 36: Chemische Struktur von Quercetin und Kaempferol**

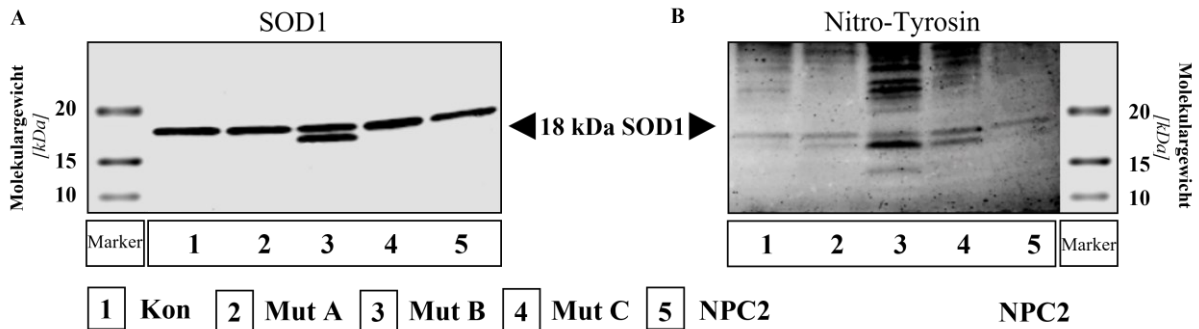
Abb. der Strukturformeln der Flavonoide Quercetin links (modifiziert nach Costa et al., 2016) und Kaempferol rechts (modifiziert nach Li et al., 2013).

### 8.1.4 Nachweis von nitrierter SOD2 und nitrierter SOD1 mittels Western Blot



**Abb. 37: Western Blot Analyse von nitrierter SOD2 in NDZs von NP-C1 und NP-C2**

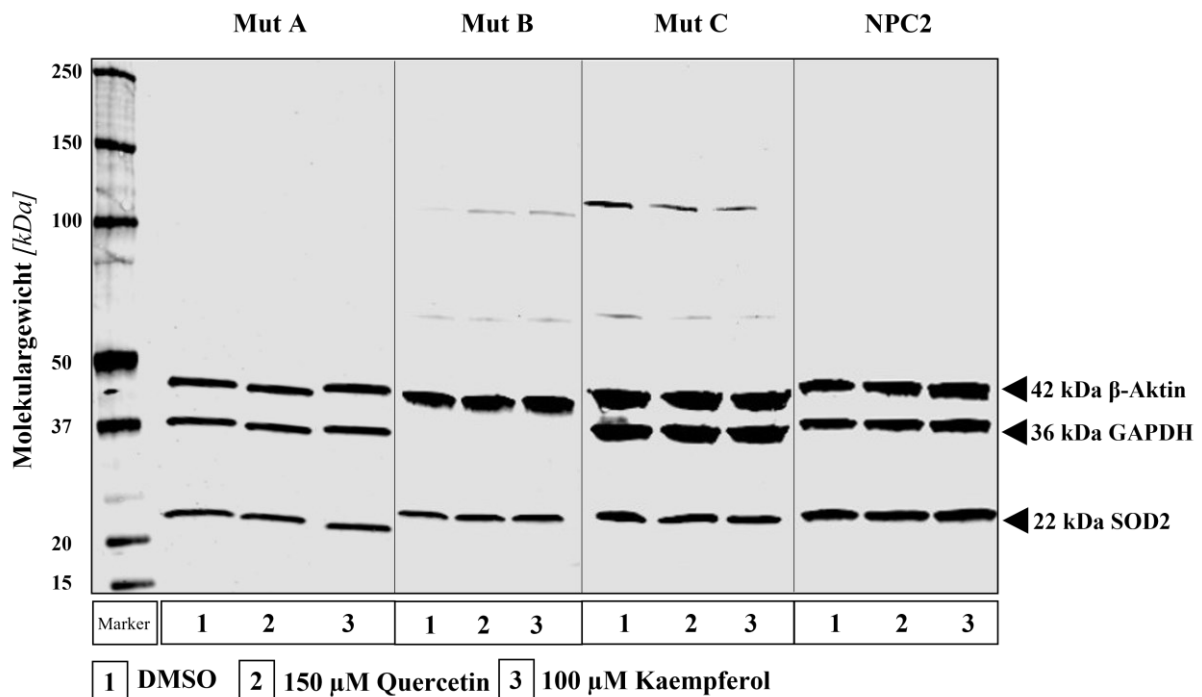
Repräsentative Darstellung der Bestimmung des Proteingehalts des nitrierten SOD2 (nSOD2) Anteils bei 22 kDa der NDZs. Von 1-5 sind die *NPC1*- bzw. *NPC2*-Mutationen der Zelllinien dargestellt. In A ist die Bestimmung der SOD2 bei 22 kDa zu sehen, wobei in B Nitro-Tyrosin zeigt. Hierbei wird angenommen, dass bei 22 kDa der nitrierte Anteil der SOD2 abgebildet wird.



**Abb. 38: Nitrierter Anteil der SOD1 in neuronalen Zellen von NP-C1 und NP-C2**

Repräsentative Darstellung eines Western Blots zur Detektion des nitrierten Anteils der SOD1 (nSOD1) bei 18 kDa der NDZs. Von 1-5 sind die *NPC1*- bzw. *NPC2*-Mutationen der Zelllinien dargestellt. In A ist die Bestimmung der SOD1 bei 18 kDa zu sehen, wobei B Nitro-Tyrosin zeigt. Hierbei wird angenommen, dass bei 18 kDa der nitrierte Anteil der SOD1 abgebildet wird.

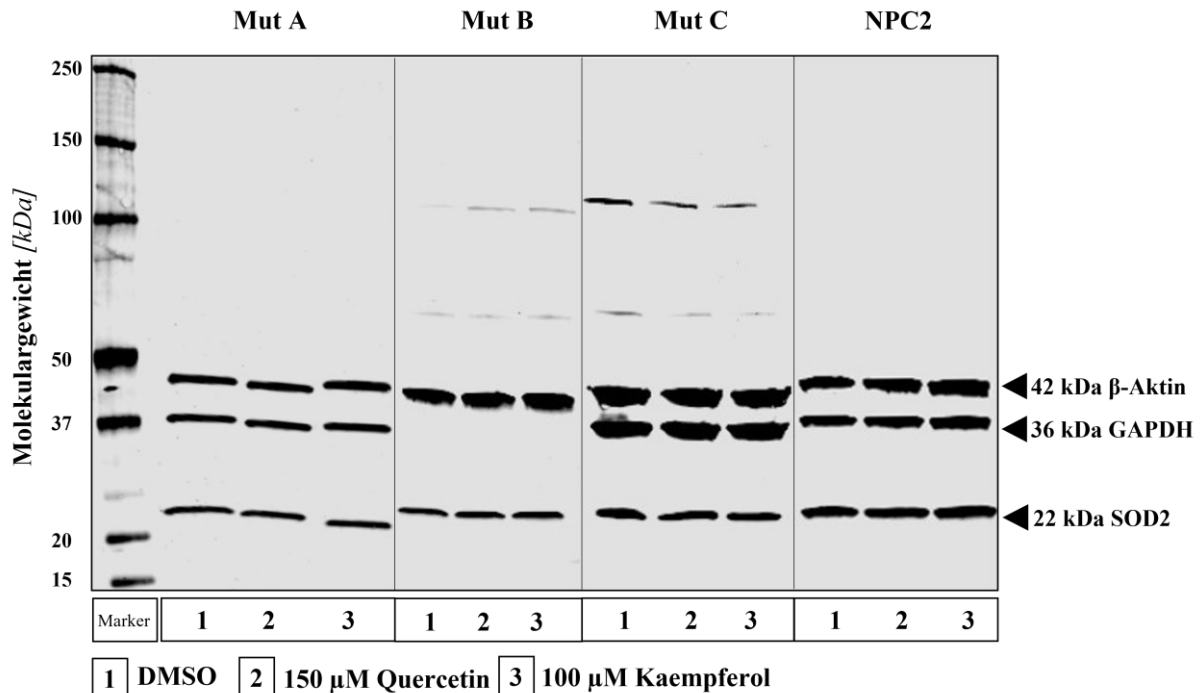
### 8.1.5 Western Blot Analysen der SOD1, SOD2 und Katalase unter Flavonoid-Behandlung



**Abb. 39: SOD1 Bestimmung der NDZs unter Flavonoid-Behandlung**

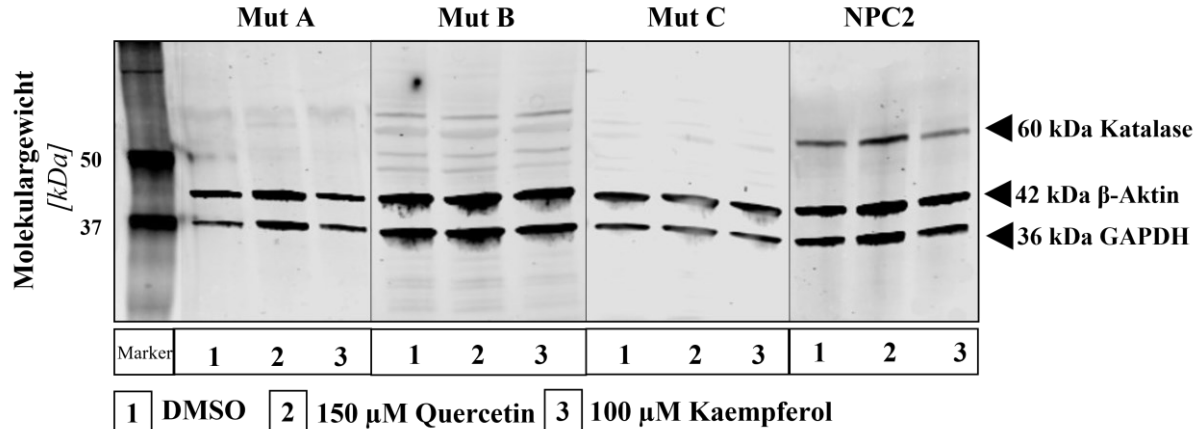
Repräsentative Darstellung eines Western Blots zur SOD1 Proteinbestimmung bei 18 kDa in NDZs unter Behandlung mit DMSO als Kontrolle (1), 150  $\mu$ M Quercetin (2) oder 100  $\mu$ M Kaempferol (3). Die Bezeichnung der Zelllinien ist im oberen Bereich der Abb. zu finden.





#### Abb. 40: SOD2 Proteinbestimmung mittels Western Blot unter Flavonoid-Behandlung

Repräsentative Darstellung der SOD2 Proteinbestimmung bei 22 kDa mittels Western Blot Analyse in NDZs unter Behandlung mit DMSO als Kontrolle (1), 150  $\mu$ M Quercetin (2) oder 100  $\mu$ M Kaempferol (3). Die Bezeichnung der Zelllinien ist im oberen Bereich der Abb. zu finden.



#### Abb. 41: Bestimmung des Proteingehalts der Katalase unter Flavonoid-Behandlung

Repräsentative Darstellung der Proteindetektion der Katalase bei 60 kDa mittels Western Blot Analyse in NDZs unter Behandlung mit DMSO als Kontrolle (1), 150  $\mu$ M Quercetin (2) oder 100  $\mu$ M Kaempferol (3). Die Bezeichnung der Zelllinien ist im oberen Bereich der Abb. zu finden.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BCA	Bichinonin-4-Carbonsäure
bzgl.	bezüglich

---

bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO Zellen	chinesische Hamsterovarzellen
Ct	Zykluszeit
DMEM	Dulbecco's Modifizierte Medien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ED	Encephalomyelitis disseminata
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
Fe	Eisen
FGF 2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
FSC	Vorwärtsstreuung
fw	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-Dichlorofluorescein Diacetat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O	Wasser
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
Lyso-SM	Lyso-Sphingomyelin
MLN64	metastatic lymph node 64
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NAC	N-Acetylcystein
NDZs	neural differenzierte Zellen
NF-κB	nuklearer Faktor-Kappa B
•NO	Stickstoffmonooxidradikal

•NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxidradikal
NO	Stickstoffmonoxid
NP-C	Morbus Niemann-Pick Typ C
NPZs	neurale Progenitorzellen
Nrf-2	der mit dem Kernfaktor Erythroid 2 verwandte Faktor 2
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanionen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxidanionenradikal
OH <sup>•</sup>	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
OS	oxidativer Stress
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PLO	Poly-L-Ornithin
PPAR <sub>γ</sub>	Peroxisom Proliferator aktivierter Rezeptor- $\gamma$
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
rv	reverse
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD	Superoxid-Dismutase
SSC	Seitwärtsstreuung
SSD	Sterol-sensitive Domäne
Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem

WST-1 Wasser lösliches Tetrazolium-1

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur des NPC1-Proteins .....	2
Abb. 2: Mechanismus des Cholesterol-Transportes mittels NPC-Proteine .....	3
Abb. 3: Darstellung des klinischen Phänotyps des Niemann–Pick Typ C.....	8
Abb. 4: Zelluläres antioxidatives Abwehrsystem und der Nrf-2-ARE-Signalweg.....	14
Abb. 5: Oxidativer Stress in NP-C .....	20
Abb. 6: Morphologie der NPZs und NDZs der verwendeten Zelllinien.....	26
Abb. 7: Kultivierung und Behandlungsschema der Zelllinien.....	27
Abb. 8: Beispiel eines Western Blots gegen nitrierte Proteine .....	30
Abb. 9: Prinzip des DCFDA-Assays.....	33
Abb. 10: Populationen innerhalb der NDZ-Mischkultur .....	40
Abb. 11: Durchflusszytometrische Analyse von DCFDA und PI der NDZs.....	41
Abb. 12: Diagrammdarstellungen der DCFDA-Analyse .....	43
Abb. 13: Erhöhter Anteil an DCF positiven Zellen in NPC1-defizienten NDZs.....	44
Abb. 14: Bestimmung der SOD-Aktivität der NDZs in NP-C.....	45
Abb. 15: Gesteigertes nitriertes Gesamtprotein in NPC-defizienten Zellen .....	47
Abb. 16: Variation des Bandenmusters des Nitrotyrosin Western Blot der NDZs.....	48
Abb. 17: Erhöhter nitrierter GAPDH-Anteil in NP-C1.....	49
Abb. 18: Unveränderter SOD1-Proteingehalt in NPC-defizienten Zellen.....	51
Abb. 19: Kein erhöhter Anteil an nitrierter SOD1 in NPC-defizienten NDZs .....	52
Abb. 20: Unveränderter SOD2-Proteingehalt in NPC-defizienten Zellen.....	53
Abb. 21: Nachweis von nitrierter SOD2 in NPC1-defizienten NDZs .....	54
Abb. 22: Verringerung der Katalase in NPC1-defizienten Zellen .....	55
Abb. 23: Geringere Katalase- bei unveränderter SOD-Genexpression in NPC1-defizienten NDZs.....	57
Abb. 24: ROS-Messung der NDZs nach Behandlung mit Flavonoiden .....	59
Abb. 25: Bestimmung SOD-Aktivität nach Behandlung mit Quercetin und Kaempferol.....	60
Abb. 26: SOD1-Proteinexpression nach Flavonoid-Behandlung in NPC-defizienten NDZs..	61
Abb. 27: SOD2-Proteinniveau nach Flavonoid-Behandlung der NPC-defizienten NDZs .....	62
Abb. 28: Unveränderte Katalase-Expression nach Behandlung der NDZs mit Flavonoiden ..	63
Abb. 29: Fehlender Einfluss der Flavonoide auf die SOD1 mRNA-Expression der NDZs ....	65
Abb. 30: Bestimmung der SOD2-Genexpression nach Flavonoid-Behandlung der NPC-defizienten NDZs .....	66

Abb. 31: Keine Beeinflussung der Katalase durch Flavonoide .....	67
Abb. 32: Expression von Nrf-2 nach Behandlung der NDZs mit Flavonoiden .....	68
Abb. 33: Beeinflussung der HMOX-1-Expression der NDZs durch Flavonoide .....	69
Abb. 34: Algorithmus der Labordiagnostik des NP-C .....	VIII
Abb. 35: Entstehung von 3-Nitrotyrosin über Peroxynitrit .....	VIII
Abb. 36: Chemische Struktur von Quercetin und Kaempferol .....	IX
Abb. 37: Western Blot Analyse von nitrierter SOD2 in NDZs von NP-C1 und NP-C2 .....	IX
Abb. 38: Nitrierter Anteil der SOD1 in neuronalen Zellen von NP-C1 und NP-C2 .....	X
Abb. 39: SOD1 Bestimmung der NDZs unter Flavonoid-Behandlung .....	X
Abb. 40: SOD2 Proteinbestimmung mittels Western Blot unter Flavonoid-Behandlung .....	XI
Abb. 41: Bestimmung des Proteingehalts der Katalase unter Flavonoid-Behandlung .....	XI

#### 8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Zelllinien .....	23
Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien .....	23
Tab. 3: Aussaat-Schema .....	25
Tab. 4: Verwendete Testsubstanzen .....	27
Tab. 5: Primerliste für die RT-qPCR .....	36
Tab. 6: Reaktionsschema der RT-qPCR Reaktion .....	37
Tab. 7: Zellkulturmedien und Zusätze .....	XV
Tab. 8: Chemikalien .....	XVII
Tab. 9: primäre Antikörper .....	XVIII
Tab. 10: sekundäre Antikörper .....	XIX
Tab. 11: Kits .....	XIX
Tab. 12: Puffer und Lösungen .....	XIX
Tab. 13: Verbrauchsmaterialien .....	XXI
Tab. 14: Geräte .....	XXII
Tab. 15: Software .....	XXV

#### 8.5 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der relativen Änderung des mRNA-Gehalts (Pfaffl, 2001) .....	37
---	----

#### 8.6 Zellkulturmedien und Zusätze

**Tab. 7: Zellkulturmedien und Zusätze**

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Accutase	Stemcell Technologies,	K029.2

	Köln, DE	
<b>B27 serumfreies Supplement</b> (50x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	17504044
<b>DMEM</b> (Dulbecco's Modified Eagle Me- dium) + GlutaMAX	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	31966-021
<b>DMEM</b> (Dulbecco's Modified Eagle Me- dium)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21063-029
<b>DMEM/F-12 (1:1)</b> (Dulbecco's Modified Eagle Me- dium F-12 Nutrient Mixture)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	21331-020
<b>EGF</b> (epidermal Wachstumsfaktor), human rekombinant, (gelöst in 10 mM Essigsäure in A.dest., 0,1 % HSA)	Peptotech, Hamburg, DE	AF-100-15
<b>FBS</b> (fetal bovine serum)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	10106-169
<b>FGF2</b> human rekombinant, (10 µg/ml, gelöst in PBS, 0,1 % HSA)	Ambio, Abingdon, GB	GSR-2001
<b>GlutaMAX</b> (100x)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	35050-038
<b>HBSS (1x)</b> (Hanks' Balanced Salt Solution)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	14170-088
<b>HSA</b> (Humanes Serum Albumin)	CSL Behring GmbH, Marburg, DE	E0044411F
<b>Laminin I (Maus) 1 mg/ml</b> <b>10 µg/ml in DMEM/F-12</b>	Trevigen, Gaithersburg, US	3400-010-01
<b>Penicillin/Streptomycin</b> <b>(10000 U/ml; 10000 µg/ml)</b>	Biochrom, Berlin, DE	A2213

## 8.7 Chemikalien

**Tab. 8: Chemikalien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
<b><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	M-7522
<b>Bromphenolblau</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	A512.1
<b>BSA</b> (Albumin Fraktion V)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	8076.4
<i>complete mini</i> Protease Inhibitor Cocktail Tabl.	Roche, Mannheim, DE	04693124001
<b>Dimethyl Sulphoxide (DMSO)</b> Hybri-MAX	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	D2650
<b>EDTA</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	E-5134
<b>Glycerol</b> (87 % [v/v])	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.04094
<b>Glycin</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	3908.3
<b>Natriumchlorid</b> (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3957.2
<b>Natriumhydroxid</b> (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	1.06469
<b>Natriumazid</b> (NaN <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1.06688
<b>Natrium-Deoxycholat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	D6750
<b>PBS Dulbecco</b> (PBS <sup>-/-</sup> )	Biochrom, Berlin, DE	L1825
<b>PhosStop</b> (Phosphatase Inhibitor)	Roche, Mannheim, DE	04906837001
<b>PLO (Poly-L-Ornithin)</b> 15 mg/ml gelöst in Aqua dest.	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	P3655-50MG

<b>Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards</b>	Bio Rad Laboratories GmbH, München, GER	161-0377
<b>Salzsäure – HCl</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	K025.1
<b>SDS (Natriumdodecylsulfat)</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	2326.2
<b>TRIS (Tris(hydroxymethyl)-ami- nomethan)</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	4855.2
<b>Tris HCl</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	9090.3
<b>Triton X-100</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	3051.3
<b>Tween 20</b>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	37470

## 8.8 Antikörper

Tab. 9: primäre Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Wirtsspezies</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Verdün- nung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog- nummer</b>
<b>Nitro- Tyrosin</b>	Maus	IgG2b mo- noklonal	1:1000	Abcam, Cambridge, GB	ab7048
<b>GAPDH</b>	Kaninchen	IgG monoklonal	1:10.000	Abcam, Cambridge, GB	ab181602
<b>SOD 1</b>	Kaninchen	IgG monoklonal	1:10.000	Abcam, Cambridge, GB	ab51254
<b>SOD 2</b>	Kaninchen	IgG monoklonal	1:1000	Cell Signaling Tech- nology, Danvers, US	13194S
<b>Katalase</b>	Kaninchen	IgG monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, US	12980S
<b>β- Aktin</b>	Maus	IgG monoklonal	1:10.000	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	A5441



Tab. 10: sekundäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
DyLight™ 680 Conjugated	Ziege polyklonal	Kaninchen IgG	1:20.000	Rockland Immunochemicals, Inc. Limerick, PA, US	611-144-002
DyLight™ 800 Conjugated Pre-Adsorbed	Ziege polyklonal	Maus IgG	1:10.000	Rockland Immunochemicals, Inc. Limerick, PA, US	610-145-121

## 8.9 Kits

Tab. 11: Kits

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
DCFDA Cellular ROS Detection Assay Kit	Abcam, Cambridge, GB	ab113851
Fast Start Essential DNS Green Master	Roche, Mannheim, DE	06402712001
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Inc., Waltham, US	23225
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE	205313
Quick-RNA™ Mini-Prep Kit	Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, DE	R1054, R1055
SOD determination kit	Sigma Aldrich, St. Louis, US	19160

## 8.10 Puffer und Lösungen

Tab. 12: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x SDS-Elektrophorese-	250 mM TRIS

<b>Puffer</b>	2 M Glycin 0,1% SDS
<b>1x SDS-Elektrophorese-Puffer</b>	1:9 Verdünnung von dem 10x SDS-Elektrophorese-Puffer: Aqua dest.
<b>10x SDS-Transferpuffer</b>	480 mM TRIS 390 mM Glycin 3,75% SDS
<b>1x SDS-Transferpuffer</b>	1:2:7 Verdünnung von dem 10x SDS-Transferpuffer: Me- thanol: Aqua dest.
<b>10x TBS</b>	200 mM TRIS 1,37 M NaCl → pH 7,5 einstellen
<b>1x TBS</b>	1:9 Verdünnung von dem 10x TBS: Aqua dest.
<b>1x TBS-Tween 20</b>	1:9 Verdünnung von dem 10x TBS: Aqua dest. 0,1% <i>Tween 20</i>
<b>5x Laemmli-Puffer</b>	125 mM TRIS 20% Glycerol 2% SDS 5% $\beta$ -Mercaptoethanol 10% Bromphenolblau
<b>RIPA-Puffer</b>	20 mM TRIS 137 mM NaCl 12 mM Natrium- Deoxycholat 2 mM EDTA 0,1% SDS 1% Triton X-100 10% Glycerol → 1 <i>complete mini</i> Protease Inhibitor-Tablette + 1 PhosStop Phosphatase Inhibitor-Tablette in 10 ml RIPA-Puffer lösen
<b>SOD Lyse-Puffer</b>	0.1M Tris/HCl, pH 7.4 1% Triton X-100 10% Glycerol 0,05% SDS

→ 1 *complete mini* Protease Inhibitor-Tablette  
 → 1 PhosStop Phosphatase Inhibitor-Tablette  
 in 10 ml SOD Lyse-Puffer lösen

## 8.11 Verbrauchsmaterialien

Tab. 13: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
CASY <sup>®</sup> Cups	Roche, Mannheim, DE	05651794001
CASY <sup>®</sup> ton	OLS OMNI Life Science, Bremen, DE	5651808
CELLSTAR <sup>®</sup> Suspensions- kultur- Mikroplatte, 96 Vertiefun- gen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	655185
Criterion <sup>™</sup> Precast Gel (4-15% TRIS-HCl)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE	345-0027
Gel Blotting Papier	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	0048.1
Hybond <sup>™</sup> -ECL <sup>™</sup> Nitro- cellulose- Membran	GE Healthcare, Freiburg im Breisgau, DE	RPN303D
Pipettenspitzen 10 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.1130
Pipettenspitzen 100 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.760
Pipettenspitzen 200 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.760.002
Pipettenspitzen 1000 µl	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	70.762
Reaktionsgefäß "SafeSeal" (1,5 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	72.706

<b>Reaktionsgefäß “SafeSeal”</b> (2,0 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, DE	72695004
<b>Rotilabo® Einmal-Wiege- schalen</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE	2159.1
<b>Rundbodenröhrchen Poly- styrol (14 ml)</b>	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, US	352051
<b>Serologische Pipetten 5ml</b>	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	606180
<b>Serologische Pipetten 10ml</b>	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	607180
<b>Serologische Pipetten 25ml</b>	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	760180
<b>Trans-Blot Turbo Nitrocel- lulose</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, Transfer Packs Mün- chen, DE	1704159
<b>Zellkulturplatten 6-Well</b>	SARSTEDT AG & Co Nümbrecht, DE	831839
<b>Zellkulturplatten 6-Well (Advanced TC)</b>	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, DE	657960
<b>Zellschaber</b>	Biochrom, Berlin, DE	P99003
<b>Zentrifugenröhrchen (15ml)</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	62554502
<b>Zentrifugenröhrchen (50ml)</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE	62547254

## 8.12 Geräte

Tab. 14: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
<b>Blotkammer TransBlot® SD Cell</b>	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
<b>CO2-Inkubator CB.150</b>	KONC Binder Labortechnik, Tuttlingen, DE

---

<b>Durchflusszytometer FACS Calibur</b>	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
<b>Eismaschine AF80</b>	Scotsman Ice Systems, Mailand, IT
<b>Elektrophoresekammer Criterion™ Cell</b>	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
<b>Feinwaage BL610</b>	Sartorius AG, Göttingen, DE
<b>Gefrierschrank (-20°C)</b>	Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, DE
<b>Gefrierschrank (-80 °C)</b>	National Lab, Möln, DE
<b>Geschirrspüler G7883</b>	Miele Professional, Gütersloh, DE
<b>Hitzesterilisator T6</b>	Heraeus, Hanau, DE
<b>IVF Workstation L224</b>	K Systems, Birkenrod, DK
<b>Kühlschrank Comfort</b>	Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, DE
<b>Magnetrührer Stuart Stir CB161</b>	Dunn Labor Technik, Asbach, DE
<b>Magnetstäbchen-Sortiment</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
<b>Microplate Reader Spark®</b>	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
<b>Mikroskop Nikon Eclipse TS100</b>	Nikon Instruments Inc., Melville US
<b>Minizentrifuge Sprout®</b>	Biozym Scientific GmbH, Hessisch, Oldendorf, DE
<b>Multipette plus®</b>	Eppendorf-GmbH, Wesseling-Berzdorf, DE
<b>pH-Meter S20-SevenEasy™</b>	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE

<b>Pipetten:</b>	Eppendorf AG,
0,1-2,5 µl	Wesseling-Berzdorf, DE
1-10 µl	
10-100 µl	
20-200µl	
100-1000 µl	
<b>Pipettierhilfe Pipetus®</b>	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
<b>Power Pac Universal/ Power Pac 200</b>	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
<b>Reinstwasseranlage Typ HP5 UF</b>	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niedererlberg, DE
<b>Rotor Gene Q</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Scanner Odyssey Infrared Imaging System</b>	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
<b>Schüttler KH2/500</b>	Noctua GmbH, Mössingen, DE
<b>Schüttler KM-2AKKU</b>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
<b>Schüttler WS5</b>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
<b>Nunc™ Safeflow 1.2 Sicherheitswerkbank</b>	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, DE
<b>Stickstofftank RS Series 1575</b>	Taylor Wharton, Wien, AT
<b>Thermomixer compact</b>	Eppendorf-GmbH, Wesseling-Berzdorf, DE
<b>Thermoshaker PST-60HL-4</b>	Lab4you GmbH, Berlin, DE
<b>Trockenschrank ED115</b>	Binder, Tuttlingen, DE
<b>Trans-Blot Turbo Transfer System</b>	Bio-Rad, München, DE
<b>Vakuumpumpe PM20405-86</b>	VWR,

	Darmstadt, DE
<b>VARIOKLAV® Dampfsterilisator Typ300</b>	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
<b>Vortex Genie 1 Touch Mixer</b>	Scientific Industries, New York, US
<b>Vortex MS1 Minishaker</b>	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, DE
<b>Wasserbad WB10</b>	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, DE
<b>Wasserbad WNB14 mit Schüttler SV 1422</b>	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, DE
<b>Zellzähler CASY® Model TT</b>	Roche, Mannheim, DE
<b>Zentrifuge 3K10</b>	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, DE
<b>Zentrifuge Microfuge 16</b>	Beckman Coulter™, Krefeld, DE
<b>Zentrifuge Z333 MK-2</b>	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, DE
<b>Zentrifuge Z383K</b>	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, DE

## 8.13 Software

Tab. 15: Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CellQuest Pro</b>	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
<b>FCSalyzer 0.9.18-alpha</b>	Sven Mostböck, Wien, AT
<b>GraphPad Prism 8.0.2</b>	GraphPad Software, San Diego, US
<b>Light Cycler Nano Software</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>Mendeley Desktop, Version 1.19.8</b>	Mendeley Ltd.,

---

	New York, US
<b>Microsoft Office</b>	Microsoft Corporation, Redmond, US
<b>NIS-Elements F2.20</b>	Nikon Instruments inc., New York, US
<b>Odyssey® Infrared Imaging System- Application Software Version 1.2.15</b>	LI-COR Biosciences, Lincoln, US
<b>Rotor-Gene Q Series Software version 2.3.1</b>	Qiagen, Hilden, DE
<b>SparkControl magellan Version 2.2</b>	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH

---



## 9 Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn PD Dr. Moritz Frech für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe zelluläre Neurophysiologie in der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“ anfertigen zu dürfen. Besonders möchte ich Ihm für die Betreuung und für seine fachliche Unterstützung, sein offenes Ohr bei Problemen und für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen danken.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Andreas Hermann danken, der mich als Institutsleiter insbesondere mit konstruktiven Vorschlägen stets unterstützte.

Zusätzlich bedanke ich mich bei allen lieben Kollegen und Kolleginnen der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“. Ganz besonders bei Christin Völkner, die mich in die theoretischen und praktischen Fertigkeiten einführte und auf jede Frage eine Antwort parat hatte. Sie munterte mich bei Niederlagen auf und feierte Erfolge mit mir. Gleichsam bedanke ich mich bei Maik Liedtke und Sebastian Rost für die freundschaftliche Betreuung im Labor sowie die Unterstützung in der Zellkultur. An dieser Stelle möchte ich mich außerdem bei Janine Petters, Katharina Huth, Dr. Jan Lukas sowie allen weiteren Mitarbeitenden für die tatkräftige Unterstützung, netten Gespräche und die Motivation bedanken.

Für das hilfsbereite Korrekturlesen und die konstruktive Kritik möchte ich mich bei PD Dr. Moritz Frech, Christin Völkner und Friederike Sievert bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern sowie meiner Schwester für ihr Vertrauen und die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums inklusive der Anfertigung dieser Promotionsarbeit. Ebenso danke ich Adrian Spranger für die Geduld, Motivation und Liebe sowie meinen Freunden für die moralische Unterstützung und den Rückhalt in dieser besonderen Zeit.

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Alexandra Veronika Jürs, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema: „Oxidativer Stress und Veränderungen im antioxidativen Abwehrsystem in neuronalen Zellen von Patienten-spezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen des Morbus Niemann-Pick Typ C“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet 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, 11.05.2022

Alexandra Veronika Jürs

## 11 Wissenschaftlicher Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Alexandra Veronika Jürs  
Geburtsdatum/ -ort: 16.09.1995 in Cuxhaven  
Nationalität: deutsch  
Anschrift: Viergewerkerstraße 1  
18057 Rostock  
+49 15737860141  
alexandra.juers@gmx.de

### Ausbildung

Seit 03/2022 Ärztin in Weiterbildung im Fachbereich Neurologie im Zentrum für Nervenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock  
Seit 10/2017 Promotion in der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“, Universitätsmedizin Rostock bei PD Dr. phil. nat. M. J. Frech  
10/2014 – 12/2021 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock (Ø 2,0)  
07/2006 – 07/2014 Gymnasium Otterndorf  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Ø 1,4)  
09/2002 – 06/2006 Grundschule Wanna

### Berufserfahrung

11/2020 – 10/2021 Praktisches Jahr  
1. Chirurgie: Unfall- und Viszeralchirurgie, Boddenklinik Ribnitz-Damgarten  
2. Innere Medizin: Kardiologie und Infektiologie, Universitätsklinik Innsbruck (Österreich)  
3. Wahlfach: Neurologie, Universitätsmedizin Rostock  
02/2020 – 03/2020 Famulatur in der internistischen und chirurgischen Rettungsstelle, Vites Klinikum im Friedrichshain, Berlin  
09/2019 Famulatur in der Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum Bremerhaven-Reinkenheide gGmbH

- 07/2019 – 12/2021 Geringfügige Beschäftigung als Koordinatorin und Entnehmerin, Gesellschaft für Transplantationsmedizin Mecklenburg-Vorpommern
- 02/2019 – 03/2019 Famulatur in der neurologischen & psychiatrischen Gemeinschaftspraxis im Königsbau, Leipzig
- 08/2018 – 09/2018 Famulatur in der Neurologie, Universitätsmedizin Rostock
- 07/2018 – 08/2018 Famulatur auf der Intensivstation, Universitätsmedizin Rostock
- 11/2017 – 09/2018 Studentische Hilfskraft in der Sektion für Translationale Neurodegeneration „Albrecht Kossel“, Universitätsmedizin Rostock
- 02/2017 – 03/2017 Famulatur in der Beerster Hausarztpraxis Dr. Kiencke & Dr. Luerßen, Bad Bederkesa

### Besuchte Konferenzen und Workshops

- 03/2021 14<sup>th</sup> Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society Göttingen  
Abstract: “Pathophysiological in vitro profile of neuronal differentiated cells derived from Niemann-Pick disease Type C2 patient-specific iPSCs carrying the NPC2 mutations c.58G>T/c.140G>T”
- 08/2019 Neurologische Summer School, Universitätsmedizin Göttingen
- 06/2019 Recent Advances in Rare Diseases Konferenz in Bogotá (Kolumbien)
- 05/2018 Recent Advances in Rare Diseases Konferenz in Neu-Delhi (Indien)

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Liedtke, M. \*, Völkner, C. \*, Jürs, A. V. \*, Peter, F., Rabenstein, M., Hermann, A., & Frech, M. J. (2021). Pathophysiological In Vitro Profile Of Neuronal Differentiated Cells Derived from Niemann-Pick Disease type C2 Patient-Specific iPSCs Carrying the NPC2 Mutations c.58G>T/c.140G>T. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4009. <https://doi.org/10.3390/ijms22084009>
- 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), 7667–7680.

Rostock, 11.05.2022

Alexandra Veronika Jürs