# Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institutsvorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann



# Funktionelle Charakterisierung von genetischen Variationen in den lysosomalen Ionenkanälen TPC2 und TRPML1

#### Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Magdalena Böck aus Augsburg 2021 Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Christian Grimm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Haass

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2022

# **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

# Funktionelle Charakterisierung von genetischen Variationen in den lysosomalen Ionenkanälen TPC2 und TRPML1

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.06.2022

Julia Böck



<u>Inhaltsverzeichnis</u> 7

# Inhaltsverzeichnis

Eidesst	tattliche Versicherung	4
Inhalts	verzeichnis	7
Zusamı	menfassung	9
Summa	ary	10
Abkürz	ungsverzeichnis	11
Abbildu	ungsverzeichnis	12
Publika	ationen	13
1.	Einleitung	14
1.1.	Das menschliche Genom	14
1.2.	Genetische Variationen	15
1.3.	Das Lysosom und seine Aufgaben	15
1.4.	Der Ionenkanal TPC2	16
1.5.	Polymorphismen im Ionenkanal TPC2	17
1.6.	Der Ionenkanal TRPML1	18
1.7.	Mutationen im Ionenkanal TRPML1 - Mukolipidose IV	19
1.8.	Vergleich TPC2 und TRPML1	20
2.	Ziel der Arbeit	21
3.	Materialien und Methoden	22
3.1.	Verwendete Zellen	22
3.2.	Zellkultur	22
3.3.	Molekularbiologische Arbeiten	23
3.3.	1.Plasmide	23
3.3.2	2.Sequenzierung der Spenderfibroblasten	23
3.4.	Analyse von Genomdatensätzen	23
3.5.	Endolysosomale Patch-Clamp-Technik	24
3.6.	Analyse der GWAS-Datenbankeinträge	25
3.7.	Konzentrationstoleranztest der TPC2-Agonisten	26
3.8.	Filipin-Färbung von unverestertem Cholesterin	26
3.9.	Lactosylceramid-Transport Assay	27
3.10.	Statistische Auswertungen	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Genetische Variation in TPC2	28
4.2.	Funktionelle Charakterisierung der TPC2 SNPs	31
4.3.	TPC2 SNPs in GWAS-Datenbanken	35
4.4.	Übersicht aller Patienten mit MCOLN1 Mutationen	39

Inhaltsverzeichnis 8

4.5.	Charakterisierung der Mutation TRPML1 <sup>T121M</sup>	40
4.6.	TPC2-Aktivierung in MLIV-Patientenfibroblasten	43
5.	Diskussion	46
Literatu	urverzeichnis	53
Anhan	g	64
Danksa	agung	65

Zusammenfassung 9

# Zusammenfassung

Durch Fortschritte im Bereich der Genomik kam es in den letzten drei Jahrzehnten zu einer erheblichen Senkung der Kosten von Genomsequenzierungen. Durch diese Entwicklung ist die Zahl der Menschen, deren Genom sequenziert worden ist, kontinuierlich angestiegen. Die dabei gewonnenen Daten können nun für die Erforschung der menschlichen DNA genutzt werden, etwa bei der Aufklärung von genetischen Erkrankungen oder zur Untersuchung der menschlichen genomischen Varianz.

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten aus öffentlich zugänglichen Genomdatenbanken genutzt, um die erste systematische Analyse von Polymorphismen im lysosomalen Ionenkanal TPC2 durchzuführen. Neben den beiden bereits in der Literatur beschriebenen Polymorphismen konnten dabei fünf weitere homozygote Varianten in verschiedenen Populationen gefunden werden, von denen zwei Varianten eine gesteigerte Kanalfunktion zeigten: TPC2K376R und TPC2G387D. Die Variante TPC2L564P trat mit einer hohen globalen Häufigkeit auf und es konnte anhand von Patch-Clamp-Messungen gezeigt werden, dass sie eine strukturelle Voraussetzung für die gesteigerte Kanalfunktion der TPC2-Variante TPC2<sup>M484L</sup> darstellt. Zusätzlich zur funktionellen Charakterisierung wurde eine mögliche (patho-)physiologische Relevanz der entdeckten Polymorphismen untersucht. Anhand der Auswertung verschiedener genomweiter Assoziationsstudien konnte gezeigt werden, dass die gefundenen Polymorphismen in TPC2 mit Diabetes Typ 2, Haarfarbe, Körpergröße und einer veränderten Knochendichte assoziiert sind. Somit liefert diese Arbeit wertvolle Erkenntnisse über die ethnische und geografische Verteilung von TPC2-Polymorphismen sowie deren Auswirkungen auf die Kanalaktivität, was relevant sein wird für die Erforschung von TPC2 als mögliche Zielstruktur für eine Vielzahl von Erkrankungen.

Neben den Polymorphismen in TPC2 wurden pathogene Variationen im Iysosomalen Ionenkanal TRPML1 untersucht, die als Ursache für die Iysosomale Speicherkrankheit Mukolipidose IV angesehen werden. Zunächst wurde eine Übersicht aller in der Literatur beschriebenen Patienten mit diesen Variationen erstellt und anschließend die neu entdeckte Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> funktionell charakterisiert. Es zeigte sich, dass diese Mutation zu einer fehlerhaften Lokalisation des Ionenkanals führte, jedoch gab es Hinweise auf eine Restaktivität des Kanals in der Iysosomalen Membran. In den anschließenden zellulären Assays konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von TPC2 mit dem Agonisten TPC2-A1-P zu einer Verbesserung des Cholesterinphänotyps in den Fibroblasten von unterschiedlichen Mukolipidose IV-Patienten führte. Daraus ergibt sich ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Mukolipidose IV-Patienten, unabhängig von den zugrundeliegenden Mutationen in TRPML1.

Summary 10

# **Summary**

Advances in the field of genomics have significantly reduced the cost of genome sequencing over the last three decades. Through this development, the number of people whose genome has been sequenced has steadily increased. The data obtained in the process can now be used for research into human DNA, for example in the elucidation of genetic diseases or the study of human genomic variance.

In this work, data from publicly available genome databases were used to conduct the first systematic analysis of polymorphisms in the lysosomal ion channel TPC2. In addition to the two polymorphisms already described in the literature, five further homozygous variants were found in different populations, two of which showed increased channel function: TPC2<sup>K376R</sup> and TPC2<sup>G387D</sup>. The variant TPC2<sup>L564P</sup> occurred with a high global frequency and patch clamp measurements showed that it is a structural prerequisite for the increased channel function of the TPC2 variant TPC2<sup>M484L</sup>. In addition to the functional characterisation, a possible (patho-) physiological relevance of the discovered polymorphisms was investigated. Based on the evaluation of various genome-wide association studies, it could be shown that the polymorphisms found in TPC2 are associated with type 2 diabetes, hair colour, body size and altered bone density. Thus, this work provides valuable insights into the ethnic and geographic distribution of TPC2 polymorphisms and their effects on channel activity, which will be relevant for the exploration of TPC2 as a potential target for a variety of diseases.

In addition to polymorphisms in TPC2, pathogenic variations in the lysosomal ion channel TRPML1 were investigated, which are the cause of the lysosomal storage disease mucolipidosis IV. First, an overview of all patient variations described in literature were compiled and subsequently the newly discovered mutation TRPML1<sup>T121M</sup> was functionally characterised. This mutation was shown to lead to a defective localisation of the ion channel, but there was evidence of residual channel activity in the lysosomal membrane. In the subsequent cellular assays, it was shown that activation of TPC2 with the agonist TPC2-A1-P leads to an improvement of the cholesterol phenotype in the fibroblasts of different mucolipidosis IV patients. Therefore, activating TPC2 might be a promising therapeutic approach for the treatment of mucolipidosis IV patients, independent of the underlying mutations in TRPML1.

# Abkürzungsverzeichnis

1000GP The 1000 Genomes Project

ATP Adenosintriphosphat

DMEM Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

EC<sub>50</sub> mittlere effektive Konzentration

FBS fetales Kälberserum

gnomAD Genome Aggregation Database
GWAS genomweite Assoziationsstudie
HEK293 humane embryonale Nierenzellen

LacCer Lactosylceramid

Ly-DR LysoTracker Deep Red

MLIV Mukolipidose IV

NAADP Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Kettenreaktion

PI(3,5)P<sub>2</sub> Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat

SGDP Simons Genome Diversity Project
SNP Single Nucleotid Polymorphismus

T2DKP Type 2 Diabetes Knowledge Portal

T2DM Typ 2 Diabetes mellitus

TPC2 Zwei-Poren-Kanal 2 bzw. Two-pore Channel 2

TRPML1 Transient receptor potential cation channel, mucolipin subfamily,

member 1

WT Wildtyp

YFP Gelb-fluoreszierendes Protein

Abbildungsverzeichnis 12

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Analyse der Sequenzierdaten des 1000GP	29
Abbildung 2: TPC2 im Laufe der Evolution	30
Abbildung 3: Position 564	31
Abbildung 4: Effekt von PI(3,5)P <sub>2</sub> auf die TPC2 SNPs	33
Abbildung 5: TPC2 SNPs in humanen Fibroblasten	35
Abbildung 6: GWAS-Analyse der TPC2 SNPs	38
Abbildung 7: Übersicht aller Patienten mit diagnostizierten Mutationen in MCOLN1	40
Abbildung 8: Charakterisierung der neuen Patientenmutation TRPML1 <sup>T121M</sup>	42
Abbildung 9: Effekt von TPC2-A1-P auf die Cholesterinakkumulation in	
Patientenfibroblasten	45

Die Abbildungen 1 bis 6 sind so, oder leicht verändert, in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift *PLoS Genet* publiziert worden [1] und unterliegen der *Creative Commons Attribution Lizenz*.

Publikationen 13

#### **Publikationen**

1. **Böck J\***, Krogsaeter E\*, Passon M, Chao YK, Sharma S, Grallert H, et al. *Human genome diversity data reveal that L564P is the predominant TPC2 variant and a prerequisite for the blond hair associated M484L gain-of-function effect.* **PLoS Genet.** 2021;17(1):e1009236.

- 2. Jaślan D, **Böck J**, Krogsaeter E, Grimm C. *Evolutionary Aspects of TRPMLs and TPCs*. **Int J Mol Sci.** 2020;21(11).
- 3. Scotto Rosato A\*, Einar Krogsaeter\*, Jaślan D, Abrahamian C, **Böck J**, Soldati C, et al. *Targeting TPC2 rescues lysosomal storage in mucolipidosis type IV, Niemann-Pick type C1 and Batten disease*. **Manuskript eingereicht bei EMBO Molecular Medicine**
- 4. Kriebs U\*, Bach A\*, Tsvilovskyy A\*, Jha A, Wirth A, **Böck J**, et al. *OCaR1*, a gatekeeper of lysosomal and granular Ca<sup>2+</sup> release in acinar cells preventing uncontrolled exocytosis and pancreatic tissue damage. **Manuskript in Bearbeitung**

\* geteile Autorenschaft

Die vorliegende Arbeit umfasst ausschließlich die Leistungen der Autorin und enthält keine durch Koautoren beigetragenen Ergebnisse. Ein Teil der Ergebnisse wurde im Januar 2021 in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift *PLoS Genet* publiziert [1]. Dies wurde entsprechend gekennzeichnet.

# 1. Einleitung

#### 1.1. Das menschliche Genom

Die Erbinformation eines jeden Individuums liegt in dessen Genom. Beim Menschen besteht das Genom aus einem DNA-Doppelstrang mit 3 Milliarden aneinander gereihter Basenpaare, der größtenteils im Zellkern vorliegt. Das Ziel des 1990 gestarteten internationalen Forschungsprojekts *Human Genome Project* war es, diese Basensequenz komplett zu entschlüsseln. Hierfür wurden die Genome von anonymen Spendern sequenziert und zu einem sogenannten Referenzgenom zusammengesetzt. 2003 wurde das Projekt als größtenteils abgeschlossen erklärt [2] und dank des enormen Fortschritts im Bereich der DNA-Sequenzierung konnten bis 2021 auch die schwer zugänglichen Bereiche des Genoms decodiert und somit die verbleibenden Lücken im Referenzgenom aufgefüllt werden [3].

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms legte den Grundstein für die Auswertung der darin enthaltenen vererbbaren Informationen. Sie führte dadurch nicht nur zu einem erheblichen Fortschritt in der Erforschung von protein-kodierenden Genen, Erbkrankheiten und molekular-pathophysiologischen Prozessen, sondern auch zu daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten. Da die Kosten für eine Genomsequenzierung in den letzten Jahren erheblich gesenkt werden konnten, zählt die Genomananalyse mittlerweile zum Standartprozedere in der klinischen Diagnostik, etwa bei der genetischen Charakterisierung von Krebserkrankungen oder der Diagnose seltener Erbkrankheiten [4-6].

Durch das gezielte Sammeln und Vergleichen von Sequenzierdaten können wertvolle Erkenntnisse über den Aufbau des menschlichen Genoms gewonnen werden. Verschiedene Projekte, wie *The 1000 Genomes Project* (1000GP) [7], *The Simons Genome Diversity Project* (SGDP) [8] oder *Genome Aggregation Database* (gnomAD) [9], haben das Ziel, diese Sequenzierdaten von mehreren hunderttausend Probanden zu sammeln und der Öffentlichkeit in freizugänglichen Datenbanken zur Verfügung zu stellen. Sie bilden dadurch die Basis verschiedener Forschungsprojekte in unterschiedlichen wissenschaftlichen Disziplinen, unter anderem zur Untersuchung genetischer Variationen in der menschlichen DNA.

#### 1.2. Genetische Variationen

Die genaue Basenpaarsequenz der DNA ist einzigartig für jeden Menschen, da im Durchschnitt alle 1300 Basenpaare eine Abweichung auftritt [10]. Die Grundlage dieser Variationen bilden dauerhafte, zufallsbedingte Veränderungen in der Basensequenz, sogenannte Mutationen. Diese können durch unterschiedliche Mechanismen entstehen, beispielsweise beim fehlerhaften Replizieren und Reparieren der DNA im normalen Zellzyklus oder durch die Schädigung der DNA durch exogene Faktoren wie energiereiche Strahlung oder bestimme Chemikalien [11]. Treten diese Mutationen mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 1 % in einer Population auf, werden sie im Allgemeinen als Polymorphismen bezeichnet. Handelt es sich bei diesen Polymorphismen um einen Unterschied von einzelnen Basenpaaren, spricht man von Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. Single Nucleotid Polymorphism, SNP).

Im menschlichen Genom sind bisher über eine Milliarde solcher SNPs entdeckt worden [12], die 90 % der Sequenzvarianten im menschlichen Genom darstellen [7, 13]. Um zu evaluieren, welche SNPs einen Einfluss auf die Funktion eines Gens haben, kann man sich sogenannter genomweiter Assoziationsstudien (engl. *genome-wide association study,* GWAS) bedienen. Das Ziel dieser Fall-Kontroll-Studien ist es, einen Phänotyp mit gemeinsam auftretenden Genomveränderungen zu verknüpfen. Auf diese Weise konnten bisher SNPs identifiziert werden, die Einfluss auf physische Erscheinungen wie Haarfarbe [14] und Größe [15] haben, oder die Anfälligkeit für Krankheiten [16, 17] und das Verstoffwechseln von Arzneistoffen beeinflussen [18-20]. In dieser Arbeit wurden die genetischen Variationen in zwei verschiedenen lysosomalen Ionenkanälen untersucht. Stellvertretend dafür lag ein besonderer Fokus auf den SNPs als häufigste Art der Sequenzvariation.

# 1.3. Das Lysosom und seine Aufgaben

Lysosomen sind Zellorganellen, die zum ersten Mal 1955 von Christian de Duve beschrieben worden sind [21]. Es handelt sich dabei um Membranvesikel, die verschiedene hydrolytische Enzyme, Enzymaktivatoren und Transportproteine in einem saurem pH-Milieu einschließen. Säugetierzellen besitzen zwischen 50 und 1000 solcher Organellen, die je nach Zelltyp und Nährstoffangebot einen Durchmesser von 0,1–1,5 µm haben [22, 23].

Lange Zeit wurde das Lysosom als statisches Organell betrachtet, welches hauptsächlich der Verdauung und dem Recycling von nicht mehr benötigtem Zellmaterial dient. Die lange angenommene Hauptaufgabe bestand in der Zerlegung von Makromolekülen (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren), um die Molekülbausteine anschließend der Zelle

für die Wiederverwendung in anabolischen Prozessen zur Verfügung zu stellen [24]. Neuere Erkenntnisse zeichnen jedoch das weitaus komplexere Bild einer dynamischen Schaltstelle in einem Netzwerk aus metabolischen Zellprozessen. Hier werden neben dem metabolischen Abbau verschiedene zelluläre Prozesse gesteuert [25, 26], auf veränderte Nährstoffbedingungen oder zellulären Stress reagiert [23, 27-30] und direkt mit anderen Zellorganellen kommuniziert [23, 31-34]. Dabei ist das Lysosom in ständiger Bewegung [23, 35] und in regelmäßigem Austausch mit anderen Organellen wie Endosomen, Phagosomen und Autophagosomen [34, 36]. Kommt es hierbei zu Fehlfunktionen, resultieren daraus die sogenannten lysosomalen Speicherkrankheiten. Unter diesem Sammelbegriff werden derzeit 70 klinisch heterogene Erkrankungen zusammengefasst, bei denen es, je nach zugrundeliegendem molekularen Proteindefekt, zu unterschiedlichen akkumulierten Metaboliten im lysosomalen Lumen kommt [37, 38].

In der lysosomalen Membran sitzen mehr als 100 Membranproteine, die unter anderem der Aufrechterhaltung des sauren pH-Milieus, der lysosomalen Ionenhomöostase und des Membranpotenzials dienen und somit essenziell für lysosomale Funktion und Regulation sind [22, 39, 40]. Bei den Membranproteinen kann es sich beispielsweise um strukturelle Glykoproteine, Enzyme oder Transportproteine, wie Transporter und Ionenkanäle, handeln [41]. Den Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit bilden zwei dieser lysosomalen Membranproteine, der Zwei-Poren-Kanal 2 (engl. *Two-pore Channel*, TPC2) und der Kanal *transient receptor potential cation channel, mucolipin subfamily, member 1* (TRPML1).

#### 1.4. Der Ionenkanal TPC2

Der Ionenkanal TPC2 ist, ebenso wie die beiden verwandten Kanäle TPC1 und TPC3, ein Mitglied der Superfamilie der spannungsgesteuerten Ionenkanäle. Alle drei Kanäle sind als Dimer aufgebaut, deren Einheiten aus zwei Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen bestehen, die über einen zytoplasmatischen Linker miteinander verbunden sind [42, 43]. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten wird angenommen, dass diese Kanäle die evolutionäre Vorstufe von spannungsgesteuerten Kalzium- und Natriumkanälen darstellen [44].

Bei TPC2 handelt sich um einen Ionenkanal in der Membran von späten Endosomen, Lysosomen und lysosom-verwandten Organellen, der einen einwärts gerichteten Ionenfluss vermittelt, also aus dem Lysosom in das Zytosol [45, 46]. Lange Zeit herrschte eine Kontroverse darüber, ob es sich dabei um einen Na<sup>+</sup>-Fluss handelt, der mittels des endogenen Agonisten Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphat (PI(3,5)P<sub>2</sub>) [47] aktiviert wird, oder um einen Ca<sup>2+</sup>-Fluss, dessen Aktivierung über den sekundären Botenstoff Nicotinsäureadenin-

dinukleotidphosphat (NAADP) [46, 48, 49] vermittelt wird. Kürzlich konnte anhand von zwei synthetischen Agonisten gezeigt werden, dass die Ionenselektivität des Kanals ligandenabhängig zu sein scheint und so möglicherweise über zwei unterschiedliche Aktivierungsmechanismen verschiedene physiologische Wirkungen vermittelt werden können [50]. Somit konnte eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Berichte in der Literatur gefunden werden. Doch nicht nur die Ionenselektivität des Kanals scheint vom Agonisten abhängig zu sein, auch ein Einfluss von extrinsischen Agonisten auf die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung wurde beobachtet [51]. Zudem konnte in dieser Arbeit [51] gezeigt werden, dass eine Reihe von trizyklischen Antidepressiva sowie der Arzneistoff Riluzol als Agonisten am Ionenkanal TPC2 wirken.

Obwohl die Aktivierung des Kanals noch nicht gänzlich geklärt ist, lassen die bisherigen Daten erkennen, dass TPC2 mit einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen in Verbindung steht. Einige dieser Zellvorgänge sind Erkennung des zellulären Nährstoffstatus [52], Autophagie [53], Pigmentierung [45], Zellmigration [54], Zelldifferenzierung [55, 56], Angiogenese [57, 58], Phagozytose [59], intrazellulärer Transport zum Lysosom [60, 61] sowie Exozytose in spezialisierten Zellen [53, 62]. Auch wenn bisher keine Erkrankung direkt mit einem Funktionsverlust des Kanals in Verbindung gebracht werden konnte, deuten mehrere Studien auf eine Rolle von TPC2 in der Pathogenese von verschiedenen Krankheiten hin, wie beispielsweise bei Fettlebererkrankung [61], Virusinfektionen [63-65], Morbus Parkinson [66, 67], Diabetes [67, 68] oder Krebs [67, 69]. Zudem wird die Adressierbarkeit des Kanals für eine mögliche Therapie von Alzheimer and Fettleibigkeit [49] diskutiert. Obwohl die genauen Aktivierungsmechanismen von TPC2 und die spezifischen Wirkmechanismen der von TPC2 vermittelten Signale noch nicht restlos entschlüsselt sind, bietet sich TPC2 aufgrund seiner zentralen Rolle in verschiedenen Zellprozessen und der vielfältigen physiologischen Aufgaben als potenzielle pharmakologische Zielstruktur für eine Vielzahl von Erkrankungen an.

# 1.5. Polymorphismen im Ionenkanal TPC2

Obwohl TPC2 eine vielversprechende pharmakologische Zielstruktur darstellt, gab es bisher keine systematischen Untersuchungen zu Variationen dieses Kanals beim Menschen und potenziell daraus resultierenden funktionellen oder (patho-)physiologischen Auswirkungen. Nur vereinzelte Varianten konnten bisher mit verschiedenen Phänotypen assoziiert werden. Zwei SNPs wurden in einer genomweiten Assoziationsstudie unter isländischen und niederländischen Probanden mit einer Variation in (Haar-)Pigmentierung in Verbindung gebracht. Diese beiden Punktmutationen, TPC2<sup>M484L</sup> und TPC2<sup>G734E</sup>, resultieren in einer erhöhten Wahr-

scheinlichkeit für eine blonde Haarfarbe [70]. Anhand von lysosomalen Patch-Clamp-Messungen konnte gezeigt werden, dass dies auf eine gesteigerte Kanalfunktion zurückzuführen ist, die jeweils über einen anderen Mechanismus vermittelt wird [71]. Während die Variation TPC2<sup>M484L</sup> zu einer Konformationsänderung innerhalb der Pore führt und daraus eine gesteigerte Aktivierung des Kanals durch den endogenen Agonisten PI(3,5)P2 resultiert, scheint bei TPC2G734E eine verminderte Sensitivität des Kanals für die Inaktivierung durch Adenosintriphosphat (ATP) verantwortlich zu sein. Die Variante TPC2<sup>G734E</sup> erreichte zusätzlich in zwei voneinander unabhängigen GWAS eine genomweite Signifikanz für eine Assoziation mit Knochendichte, einem Biomarker, der für die Diagnose von Osteoporose verwendet wird [72, 73]. Außerdem konnte eine Intron-Variante mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) in Verbindung gebracht werden [68]; die Patientenanzahl in dieser Studie lag allerdings nur bei 384. Eine erste Übersichtsarbeit über die Assoziationen von verschiedenen TPC2-Polymorphismen mit unterschiedlichen Krebsarten wurde erst kürzlich veröffentlicht [74]. In dieser Arbeit wurden ebenfalls die Genomdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken genutzt, um die Polymorphismen im TPC2-Protein genauer zu untersuchen.

#### 1.6. Der Ionenkanal TRPML1

Der Ionenkanal TRPML1 bildet zusammen mit den verwandten Kanälen TRPML2 und TRPML3 eine Untergruppe der TRP-Kanalfamilie. Er ist aus vier Untereinheiten mit jeweils sechs Transmembrandomänen aufgebaut [75] und lokalisiert überwiegend in der Membran von späten Endosomen und Lysosomen. Patch-Clamp-Experimente haben gezeigt, dass es sich um einen nicht-selektiven Ionenkanal handelt, der unter anderem permeabel ist für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, und Zn<sup>2+</sup>-Ionen [76]. Aktiviert wird der Kanal von PI(3,5)P<sub>2</sub> [77] und reaktiven Sauerstoffspezies, welche von Mitochondrien unter Stressbedingungen freigesetzt werden [78]. Zudem wurde eine Regulierung des Kanals durch Ca<sup>2+</sup> und pH beschrieben [79].

Über die Vermittlung des einwärts gerichteten Kationenstroms und verschiedene nachgeschaltete Signalwege reguliert der Kanal diverse zelluläre Funktionen: vesikulärer Transport [80], lysosomale Exozytose [53, 81], Phagozytose [59], Autophagie [53] und Homöostase von Metallionen wie Zink und Eisen [77, 82, 83]. Zudem spielt der Ionenkanal eine Rolle bei Knochenumbau [84], im Immunsystem sowie bei viralen und bakteriellen Infektionen [85, 86].

#### 1.7. Mutationen im Ionenkanal TRPML1 - Mukolipidose IV

Im Gegensatz zu den Variationen in TPC2 besitzen Mutationen in TRPML1 eine bekannte pathophysiologische Relevanz. Sie werden als Ursache für die seltene autosomal-rezessive lysosomale Speicherkrankheit Mukolipidose IV (MLIV) angesehen, von der weltweit schätzungsweise circa 2000 Patienten betroffen sind (Dr. Rebecca Oberman, ML4 Foundation, mündliche Kommunikation am 26.2.2021). Bisher wurden etwa 50 verschiedene pathogene Mutationen in TRPML1 in der Literatur beschrieben, die zu einem Funktionsverlust oder einer fehlerhaften Lokalisation des Kanals führen [87]. Die zwei am häufigsten auftretenden Mutationen, deren Ursprung in Osteuropa im 18. oder 19. Jahrhundert vermutet wird, sind hauptsächlich in Patienten mit aschkenasisch-jüdischem Hintergrund zu finden [88]. Ende 2019 wurde die erste deutsche MLIV-Patientin, aus der Ethnie der Jesiden stammend, mit der bisher unbekannten Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> im Universitätsklinikum Münster diagnostiziert. Die Krankheit wird meist im Kleinkindalter diagnostiziert und manifestiert sich zunächst überwiegend in psychomotorischen Entwicklungsverzögerungen und ophthalmologischen Anomalien wie Hornhauttrübung, Netzhautdegeneration und Strabismus. Die Patienten leiden zudem unter einer Achlorhydrie, verbunden mit einer Eisenmangelanämie, erhöhten Plasmagastrinspiegeln und gastrointestinalen Symptomen. Die Hauptmerkmale der MLIV-Gehirnpathologie sind Anomalien der weißen Substanz und ein hypoplastisches Corpus Callosum, wobei MRI-Scans hierbei auf eine progressive neurodegenerative Komponente hindeuten [89-91]. Der spätere Verlauf der Krankheit ist von immer stärkeren Sehbeeinträchtigungen geprägt und es kann zum Verlust von bereits erlangten psychomotorischen Fähigkeiten kommen [89, 92]. Auf zellulärer Ebene sind typischerweise membrangebundene fibrillo-granuläre und lamellare Strukturen im Zytoplasma erkennbar, die die angesammelten sauren Mukopolysaccharide und komplexen Lipide enthalten [93, 94]. Die beschriebenen Merkmale treten in sehr unterschiedlichen Ausprägungen bei den betroffenen Personen auf [89]. Aus diesem Grund erfolgt die Diagnosestellung nach gezielten molekulargenetischen Tests auf biallelische pathogene Mutationen im TRPML1-kodierenden Gen MCOLN1.

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Therapieoptionen für die betroffenen Patienten und die Behandlung besteht aktuell aus der Linderung der beschriebenen Symptome. Es konnte zwar gezeigt werden, dass mehrere niedermolekulare Liganden die endogene Aktivität des Kanals bei bestimmten Mutationen retten können, jedoch stellt dieser Ansatz nicht für alle MLIV-Patienten eine Behandlungsoption dar [95].

#### 1.8. Vergleich TPC2 und TRPML1

Die lysosomalen Ionenkanäle TPC2 und TPRML1 besitzen einige Gemeinsamkeiten. Bei beiden Kanälen handelt es sich um ubiquitär exprimierte, nicht-selektive Kationenkanäle, die einen Ca²+- und Na+-Fluss vermitteln und strukturell miteinander verwandt sind. Sie sind beide hauptsächlich in der Membran von Lysosomen zu finden, werden vom endogenen Agonisten PI(3,5)P<sub>2</sub> aktiviert und setzen Ca²+ aus dem Lysosom zur Steuerung zellulärer Funktionen frei. Dadurch fördern sie beide die lysosomale Exozytose, interagieren mit dem Autophagie-Komplex und führen bei Funktionsverlust zu Defekten im zellulären Transport [40, 53].

Obwohl die beiden Kanäle augenscheinlich einige Gemeinsamkeiten besitzen, funktionieren sie unabhängig voneinander [96] und die unterschiedlichen zellulären Aufgaben werden möglicherweise über den Interaktionskomplex und verschiedene nachfolgende Signalwege vermittelt [53]. Warum die menschliche Zelle, ebenso wie die meisten Vertreter der Metazoa, diese zwei evolutionär relativ alten Kanäle mit ähnlichem Profil exprimiert, ist bis dato noch nicht geklärt [97].

Die lysosomale Speicherkrankheit MLIV geht auf eine Fehlfunktion des Kanals TRPML1 zurück. Aufgrund der ähnlichen zellulären Lokalisation, der Aktivierung durch denselben Agonisten und der überschneidenden physiologischen Aufgaben der Kanäle ist es denkbar, dass eine exogene Aktivierung von TPC2 die Fehlfunktionen von TPRML1 kompensieren und dadurch möglicherweise eine Therapieoption für MLIV-Patienten darstellten könnte.

Ziel der Arbeit 21

#### 2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von genetischen Variationen in den endolysosomalen Ionenkanälen TPC2 und TRPML1. Dafür sollte im ersten Teil der Arbeit die erste systematische Analyse von Polymorphismen in TPC2 in verschiedenen Populationen durchgeführt werden. Es war bereits von früheren Arbeiten bekannt, dass die beiden SNPs TPC2<sup>M484L</sup> und TPC2<sup>G734E</sup> zu einer Funktionssteigerung des Kanals führen [70, 71]. Anhand von Genomsequenzierdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken sollte untersucht werden, ob, neben den beiden bereits beschriebenen, weitere TPC2 SNPs im menschlichen Genom auftreten. Zur Interpretation dieser Genomdaten sollten alle gefundenen Varianten mittels endolysosomalen Patch-Clamps funktionell charakterisiert und die physiologischen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus untersucht werden.

Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, zunächst anhand von Datenbanken und veröffentlichter Literatur eine Übersicht über die Anzahl und Verteilung der Patienten mit pathogenen Mutationen in TRPML1 zu gewinnen. Anschließend sollte die in einer deutschen Patientin erstmalig sequenzierte Variante TRPML1<sup>T121M</sup> mit verschiedenen zellulären Assays und endolysosomalen Patch-Clamp-Messungen funktionell charakterisiert werden. Abschließend sollte eine mögliche Anwendbarkeit der kürzlich publizierten TPC2-Agonisten [50, 51] zur Verbesserung des zellulären Phänotyps der Patientin, sowie anderer MLIV-Patienten, getestet werden.

#### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Verwendete Zellen

In dieser Arbeit wurden humane embryonale Nierenzellen (engl. *Human embryonic kidney*, HEK293), Hela-Zellen und primäre Fibroblasten verwendet. Die HEK293- und Hela-Zellen wurden kommerziell erworben (Leibniz Institut DSMZ, Braunschweig). Die Primärfibroblasten zur Untersuchung der TPC2 SNPs wurden von Prof. Dr. Carola Berking und Kollegen (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) von gesunden erwachsenen Probanden isoliert und für die Zellkultur vorbereitet. Für die Cholesterinakkumulationsversuche wurden folgende Fibroblasten verwendet: Wildtyp (WT, GM00969), MLIV-2527 (*MCOLN1*IVS3-2A>G/IVS3-2A>G; GM02527) und MLIV-2048 (*MCOLN1*IVS3-2A>G) 2A>G/Ex1-del7; GM02048) (alle Coriell Institut, Camden/USA), MLIV-F408Δ (*MCOLN1*F408Δ/IVS3-2A>G) [95] und MLIV-T121M (*MCOLN1*T121M/T121M; zur Verfügung gestellt von Prof. Marquardt, Universitätsklinikum Münster).

#### 3.2. Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank HERAsafe KSP 18 (Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA) durchgeführt und alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) geordert. HEK293- und Hela-Zellen wurden kultiviert in *Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) + *GlutaMAX*<sup>TM</sup> Medium (1 g/L D-Glucose, Thermo Fisher Scientific), versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Thermo Fisher Scientific), 100 U Penicillin/mL und 100 μg Streptomycin/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA). Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Turbofect (Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurden 1 μg Plasmid in 100 μL DMEM gegeben und anschließend 2 μL Turbofect addiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde die Mischung auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Die Fibroblasten für die Patch-Clamp-Experimente wurden kultiviert in DMEM + GlutaMAX<sup>TM</sup> Medium (4,5 g/L D-Glucose, Thermo Fisher Scientific), versetzt mit 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific), 100 U Penicillin/mL und 100 μg Streptomycin/mL (Sigma-Aldrich). Die Fibroblasten für die zellulären Assays wurden kultiviert in DMEM + GlutaMAX<sup>TM</sup> Medium (1 g/L D-Glucose, Thermo Fisher Scientific), versetzt mit 15 % FBS (Thermo Fisher Scientific), 100 U Penicillin/mL und 100 μg Streptomycin/mL (Sigma-Aldrich).

#### 3.3. Molekularbiologische Arbeiten

#### 3.3.1. Plasmide

Die kodierende humane TPC2- bzw. TRPML1-DNA-Sequenz wurde jeweils in einen pcDNA3.1(+)-Plasmid-Vektor mit C-terminalem gelb-fluoreszierendem Protein (engl. *yellow fluorescent protein*, YFP) kloniert und damit das humane TPC2- bzw. TRPML1-Protein in HEK293- und Hela-Zellen überexprimiert. Die verschiedenen Mutationen wurden jeweils mittels s*ite-directed mutagenesis* in die entsprechenden Plasmide eingebracht. Hierfür wurde das *QuikChange Il-Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara/USA) nach Herstellerangaben in Verbindung mit geeigneten Oligonukleotid-Primern (Metabion international, Planegg) verwendet. Eine Auflistung der verwendeten Primer ist im Anhang zu finden.

#### 3.3.2. Sequenzierung der Spenderfibroblasten

Um mögliche TPC2 SNPs in den Spenderfibroblasten detektieren zu können, wurde zunächst die genomische DNA der Zellen isoliert. Hierfür wurde das *PureLink Genomic DNA Kit* (Invitrogen, Waltham/USA) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden die zu untersuchenden DNA-Abschnitte mit einer Q5-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) und geeigneten Primern in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem 1,5 % Agarosegel (Carl Roth, Karlsruhe) aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden) aus dem Gel gelöst. Abschließend wurden der TPC2 Genotyp mittels Sanger-Sequenzierung (Eurofins, Planegg) bestimmt. Die für die PCR-Vervielfältigung verwendeten Primer sind im Anhang zu finden.

# 3.4. Analyse von Genomdatensätzen

Für die Analyse der SNPs wurden die Daten des 1000GP-Datensatzes und der Primatengenome über die Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* auf www.ncbi.nlm.nih.gov abgerufen, die Daten des *gnomAD*-Datensatzes wurden auf www.gnomad.broadinstitute.org eingesehen. Der Zugriff erfolgte zuletzt im Mai 2020. Mutationen ohne direkte Auswirkungen auf die Proteinsequenz, wie synonyme Mutationen und Mutationen im Intron, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die mittlere Allelhäufigkeit wurde wie folgt errechnet [1]: Zunächst wurde jedem Sequenzierergebnis ein numerischer Wert zugeordnet. Handelte es sich um einen WT, wurde der Wert 0 zugeordnet, bei einer heterozygoten Probe wurde der Wert 0,5 vergeben und bei einem homozygoten SNP der Wert 1. Aus den Werten der einzelnen Stichproben wurde anschließend die mittlere Allelhäufigkeit berechnet.

Für die evolutionäre Betrachtung des TPC2-Proteins wurden die Genomsequenzierdaten von fossilen Funden aus 19 verschiedenen Publikationen entnommen (siehe [1]). Dabei wurden nur Proben inkludiert, die eine Sequenzierhäufigkeit von mindestens fünf aufwiesen. Der phylogenetische Baum wurde mittels *Neighbor-Joining*-Algorithmus der *MEGA X Software* auf Basis der FASTA Sequenzen der *NCBI Gene Database* erstellt [1, 98]. Für die Zusammenfassung aller MLIV-Patienten wurde die *HGMD Professional Database* [87] und die *ClinVar-Database* [99] zuletzt im Juni 2021 nach Mutationen in *MCOLN1* durchsucht. In der Auswertung wurden alle Patienten mit Mutationen auf beiden Allelen inkludiert, auch wenn MLIV nicht direkt diagnostiziert wurde. Auch hier wurden synonyme und Intron-Mutationen ausgeschlossen.

### 3.5. Endolysosomale Patch-Clamp-Technik

Für die elektrophysiologische Charakterisierung wurde die Methodik des endolysosomalen Patch-Clamps angewendet [1, 100]. Die zu messenden Zellen wurden 60 bis 96 Stunden vor der Messung auf Poly-L-Lysin-(0,1 %)-beschichtete Glasdeckgläser ausgesät. Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte circa 36 Stunden vor der Messung, hierfür wurde das jeweilige Protein-YFP-Plasmid mit Turbofect (Thermo Fisher Scientific) nach Hersteller-protokoll verwendet. Die Zellen wurden über Nacht mit Vacuolin-1 (1 μM, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) behandelt und dadurch die Lysosomen auf eine Größe von bis zu 10 μm vergrößert. Nach der Freilegung des Lysosoms aus der Zelle mit einer Isolierpipette konnte die lysosomale Membran gepatcht werden.

Der verwendete zytosolische Puffer, in dem sich die Zellen zum Zeitpunkt der Messung befanden, enthielt 140 mM K-MSA, 5 mM KOH, 4 mM NaCl, 0,39 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA und 10 mM HEPES. Die Lösung wurde mittels KOH auf einen pH von 7,2 eingestellt. Falls nötig wurde eine Einstellung der Osmolarität mit D-Glucose bis zu einem Zielwert von 300 mosmol/L vorgenommen. Die lysosomale Lösung, mit der die Messpipette befüllt wurde, enthielt 140 mM Na-MSA, 5 mM K-MSA, 2 mM Ca-MSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES und 10 mM MES. Die Lösung wurde mittels NaOH auf einen pH von 4,6 eingestellt.

Für die Messpipetten wurden Kapillaren aus Borosilikatglas (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,75 mm, Sutter Instruments, Novato/USA) in einem 6-stufigen Protokoll

von einem P-97 Micropipetten-Puller (Sutter Instruments) gezogen und anschließend an einer MF-830 Microforge (Narishige, Tokyo/Japan) poliert. Sie wiesen bei der Messung einen Widerstand von 5-10 M $\Omega$  auf.

Für die Detektion der Ströme wurden der EPC-10 Patch-Clamp-Verstärker in Verbindung mit der *PATCHMASTER Software* (beides HEKA Elektronik, Lambrecht) verwendet. Die Daten wurden mit 40 kHz digitalisiert und mit einer Tiefpassfilterfrequenz von 2,8 kHz gefiltert. Schnelle und langsame kapazitive Transienten wurden durch die Kompensationsschaltung des EPC-10-Verstärkers aufgehoben. Für die Messungen wurden alle 5 Sekunden eine Spannungsrampe von -100 bis +100 mV über einen Zeitraum von 500 ms angelegt und der jeweilige Spannungsamplitudenwert bei -100 mV als Messwert genommen. Das Haltepotential der Messungen lag bei -60 mV für Messungen des TPC2-Kanals und bei 0 mV für Messungen des TRPML1-Kanals. Alle Auswertungen wurden mit der Software *OriginPro9* (OriginLab Corporation, Northampton/USA) durchgeführt.

### 3.6. Analyse der GWAS-Datenbankeinträge

Alle homozygoten TPC2 SNPs wurden auf mögliche Assoziationen mit Phänotypen untersucht [1]. Dafür wurden folgende Kennnummern verwendet: rs72928978 (TPC2<sup>V219I</sup>), rs3750965 (TPC2<sup>K376R</sup>), rs61746574 (TPC2<sup>G387D</sup>), rs35264875 (TPC2<sup>M484L</sup>), rs2376558 (TPC2<sup>L564P</sup>), rs78034812 (TPC2<sup>S681L</sup>) und rs3829241 (TPC2<sup>G734E</sup>). Alle eingetragenen Assoziationen der SNPs aus dem *GWAS-Catalog* [101] und dem *Type 2 Diabetes Knowledge Portal* (T2DKP) [102] wurden ausgewertet, der letzte Zugriff erfolgte im Mai 2020. Die gefundenen Merkmale wurden nach dem *p*-Wert sortiert, Mehrfachnennungen entfernt und Datensätze ohne Odds Ratio oder Effektgröße ausgeschlossen. Falls nötig, wurde die Odds Ratio in Effektgröße umgewandelt [103], um eine homogene Darstellung zu ermöglichen. Die fünf Phänotypen mit der höchsten Assoziation für jeden SNP wurden mit *GraphPad Prism 9.1* (GraphPad Software, San Diego/USA) in Forest-Plots dargestellt. Die verwendeten Daten wurden aus unterschiedlichen Konsortien entnommen (beispielsweise UK biobank eBMD, GIANT, GoT2D und DIAMANTE) und wiesen Stichprobengrößen von 1997 bis 898130 auf.

#### 3.7. Konzentrationstoleranztest der TPC2-Agonisten

MLIV-T121M Fibroblasten wurden in eine 96-Well-Platte (3000 Zellen pro Well) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 1 %, 10 %, 30 %, 50 % bzw. 100 % der vorgeschlagenen EC<sub>50</sub> der potenziellen Agonisten [51] für 24, 48 bzw. 72 Stunden inkubiert und anschließend die Überlebensrate mittels des CellTiter-Blue Reagenz bestimmt [104]. Dafür wurden die Zellen für 3 Stunden mit CellTiter-Blue (Promega, Mannheim) inkubiert und anschließend die Fluoreszenz (560nm<sub>Ex</sub>/600nm<sub>Em</sub>) mit einem Infinite M200 PRO Platten-Reader (Tecan, Männedorf/Schweiz) gemessen. Als interne Kontrolle wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet und als Leerprobe das Zellkulturmedium. Die Arzneistoffe Amitriptylin (#PHR1384), Chlorpromazin (#C0982) Clomipramin (#C7291) and Desipramin (#D3900) wurden von Sigma Aldrich geordert, Riluzol (#0768) von Tocris Bioscience (Bristol/UK).

#### 3.8. Filipin-Färbung von unverestertem Cholesterin

Die Zellen wurden mit dem fluoreszierenden cholesterinbindenden Polyen-Antibiotikum Filipin angefärbt, um die Cholesterinakkumulationen sichtbar zu machen [105]. Die zu untersuchenden Fibroblasten wurden zunächst auf Glasdeckgläser in 24-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag (Abb. 8) bzw. nach 72 Stunden Inkubation mit den verschiedenen Agonisten (30 µM in DMSO, Abb. 9) wurde die Filipin-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS, beides Thermo Fisher Scientific) für 15 Minuten fixiert. Nach 10minütiger Inkubation mit Ammoniumchlorid (5 mM) wurden die Zellen in einer feuchten, abgedunkelten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 0,05 mg/mL Filipin in PBS (alles Sigma-Aldrich) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und der Zellkern angefärbt. Hierfür wurden die Zellen für weitere 30 Minuten mit einer TO-PRO-3-Lösung (1:500 in PBS, Invitrogen) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser auf Objektträgern fixiert und mikroskopiert. Die Bilder wurden an einem Konfokalmikroskop LSM 880 (Zeiss, Jena) mit 40x Olobjektiv und einer Wellenlänge von 405 nm (Filipin) bzw. 633 nm (TO-PRO-3) aufgenommen. Die Quantifizierung der durchschnittlichen Filipinintensität pro Zelle erfolgte mit der ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda/USA).

#### 3.9. Lactosylceramid-Transport Assay

Die WT- und MLIV-T121M-Fibroblasten wurden in 200 μL Vollmedium auf Glasdeckgläser in 24-Well-Platten ausgesät und am darauffolgenden Tag wurde der Lactosylceramid (LacCer)-Transport Assay durchgeführt [106]. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei 37 °C mit 25 μM LacCer (BODIPY FL C5-Lactosylceramide, Invitrogen) in einem serumfreien Kulturmedium inkubiert. Nach einem zweifachen Waschschritt mit PBS wurden die Zellen für weitere zwei Stunden mit DMEM-Vollmedium inkubiert. Abschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und phenolrot-freies Medium für die Aufnahme der Bilder auf die Zellen gegeben. Die Bilder wurden in einer auf 37 °C vorgeheizten Kammer mit einem 40x Ölobjektiv bei Wellenlänge 488 nm an einem Konfokalmikroskop LSM 880 (Zeiss) aufgenommen. Die Quantifizierung der LacCer-Punkte pro Zelle erfolgte mit der *ImageJ Software* (National Institutes of Health).

### 3.10. Statistische Auswertungen

Für alle statistischen Analysen wurde die Software *GraphPad Prism 9.1* (GraphPad Software) verwendet. Statistische Tests wurden bei Versuchen mit n > 3 durchgeführt, für die eine Gauss'sche Normalverteilung angenommen wurde. Für die Einzelvergleiche zwischen WT (bzw. Referenz) und den jeweiligen genetischen Variationen wurden ungepaarte Student's T-Tests durchgeführt. Für die Vergleiche der TPC2-Agonisten mit den jeweiligen DMSO-Kontrollen wurden einfache ANOVAs mit anschließenden Dunnett's bzw. Bonferroni-Tests geprüft. Die Signifikanzniveaus der Ergebnisse wurden entsprechend gekennzeichnet (\* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001, \*\*\*\* p < .0001).

# 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Kapitel 1 bis 3 wurden bereits im Januar 2021 in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift *PLoS Genet* publiziert [1] und werden hier zur Beantwortung der übergeordneten Fragestellung erneut ausgeführt. Bei den Ergebnissen der Kapitel 4 bis 6 handelt es sich um bisher unveröffentlichte Daten.

#### 4.1. Genetische Variation in TPC2

Um das Auftreten und die globale Verteilung der genetischen Variationen in TPC2 zu untersuchen, wurden die Sequenzierergebnisse von 2504 Probanden aus 26 Populationen des 1000GP-Datensatzes ausgewertet. Die TPC2-Sequzenz (63 SNPs, Abb. 1a) zeigte eine deutlich höhere genetische Varianz im Vergleich zu den verwandten endolysosomalen Ionenkanälen TPC1 (33 SNPs), TPRML1 (34 SNPs), TRPML2 (34 SPNs) und TRPML3 (31 SNPs) [1]. Der Ionenkanal TPC3 wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da er im menschlichen Genom ein Pseudogen darstellt [107]. Unter den insgesamt 63 SNPs mit direkter Auswirkung auf die Proteinsequenz, konnten sieben als homozygote Varianten identifiziert werden: TPC2 $^{\text{V219I}}$ , TPC2 $^{\text{K376R}}$ , TPC2 $^{\text{G387D}}$ , TPC2 $^{\text{M484L}}$ , TPC2 $^{\text{L564P}}$ , TPC2 $^{\text{S681L}}$  und TPC2<sup>G734E</sup> (Abb. 1a und 1b). Diese homozygoten Varianten traten dabei in unterschiedlicher ethnischer oder geografischer Verteilung auf. Die SNPs TPC2V219I, TPC2M484L und TPC2G734E traten am häufigsten in europäischen, TPC2<sup>S681L</sup> überwiegend in ostasiatischen Populationen auf (Abb. 1c). Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Allelhäufigkeit der einzelnen Varianten fiel auf, dass die Variante TPC2<sup>L564P</sup> einen besonders hohen Wert zeigte. Sie wies eine durchschnittliche europäische Allelhäufigkeit von 0,987 auf (Abb. 1c) und zeigte auch in den meisten anderen Bevölkerungsgruppen eine hohe Verteilung (Abb. 1d). Die Analyse der Sequenzierergebnisse aus weiteren Datenbanken, wie z.B. der gnomAD und des SGDP, bestätigte die hohe genetische Varianz von TPC2 im Vergleich zu den anderen verwandten lysosomalen Ionenkanälen sowie die hohe globale Häufigkeit von TPC2<sup>L564P</sup> [1].

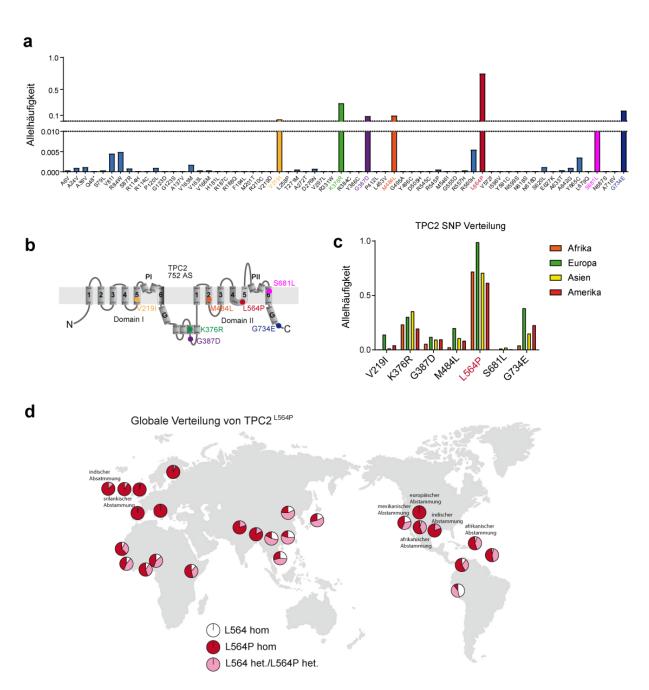


Abbildung 1: Analyse der Sequenzierdaten des 1000GP.

(a) Mittlere Allelhäufigkeit aller homozygoten (farbig markiert) und heterozygoten TPC2 SNPs, die zu einer Aminosäuresubstitution führen. (b) Positionen der homozygoten SNPs im Protein. (c) Mittlere Allelhäufigkeit aller homozygoten SNPs gruppiert nach Kontinent. (d) Globale Verteilung von TPC2<sup>L564P</sup>. Jeder Kreis symbolisiert eine Population. Weiß repräsentiert den Anteil an Individuen mit homozygoten TPC2<sup>L564P</sup>, rosa zeigt den Anteil an heterozygoten Individuen. Publizierte Abbildung [1].

Um weitere Informationen zur Variation von Position 564 zu sammeln, wurden im nächsten Schritt Sequenzierdaten von fossilen Funden untersucht. Hierfür wurden die Ergebnisse von 43 Fossilien ausgewertet, die dem modernen Homo Sapiens, den Denisova-Menschen oder den Neandertalern zugeordnet werden [1]. Auffällig war, dass auch in dieser Stichprobe die beiden Aminosäuren Lysin und Prolin an Position 564 im TPC2-Protein zu finden waren, Prolin

jedoch die häufigere Variante darstellte (Abb. 2a). Das Auftreten und die Verteilung der beiden Aminosäuren in den Fossilien des modernen Homo Sapiens der letzten 50.000 Jahre glich somit der Verteilung in der heutigen Bevölkerung (Abb. 1c). Da die Anzahl der fossilen Funde von Denisova-Menschen und Neandertalern begrenzt ist, konnten in diesen Populationen keine Schlussfolgerungen über die Verteilung der Aminosäure 564 gezogen werden. In der Proteinsequenz von verwandten Primatenarten schien die Aminosäure Prolin ebenfalls die dominierende Variante an Position 564 im TPC2-Protein zu sein (Abb. 2b).

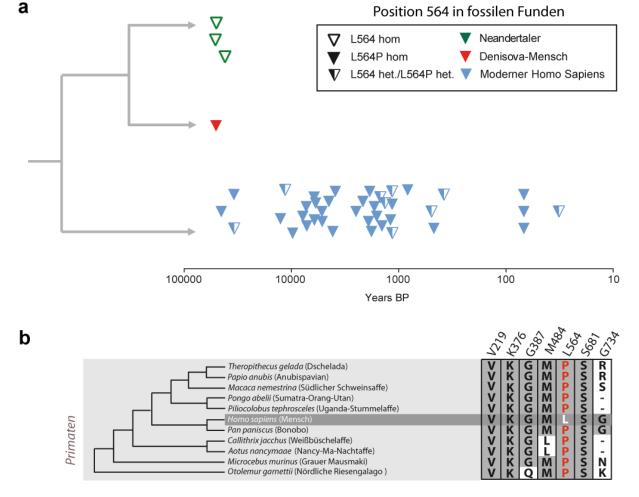


Abbildung 2: TPC2 im Laufe der Evolution.

(a) Sequenzierergebnisse von Position 564 in fossilen Funden. Jedes Dreieck symbolisiert eines von 43 sequenzierten fossilen Fundstücken. Ein ausgefülltes Dreieck repräsentiert eine homozygote TPC2<sup>L564P</sup> Probe, ein leeres Dreieck repräsentiert eine homozygote TPC2<sup>L564</sup> Probe, ein halbausgefülltes Dreieck symbolisiert einen heterozygoten Fund. Dargestellt sind Fundstücke, die dem modernen Homo Sapiens (blau), den Denisova-Menschen (rot) oder den Neandertalern (grün) zugeordnet werden. Der Zeitstrahl zeigt die experimentell ermittelte Datierung der Fundstücke aus der jeweiligen Publikation (siehe [1]). (b) Vergleich der Proteinsequenz des menschlichen Referenzgenoms mit der im Referenzgenom von verwandten Primatenarten. Publizierte Abbildung [1].

#### 4.2. Funktionelle Charakterisierung der TPC2 SNPs

Laut der kürzlich veröffentlichten Kryo-EM-Struktur des humanen TPC2 befindet sich Aminosäure 564 auf dem IIS4-S5 Linker, einer Schleife, die bei der Öffnung des Kanals eine Umstrukturierung erfährt [43]. Um mögliche funktionelle Auswirkungen einer Aminosäuresubstitution an dieser Stelle auf die Kanalfunktion zu überprüfen, wurden die beiden Konstrukte TPC2<sup>L564</sup> (= WT) und TPC2<sup>L564P</sup> mittels endolysosomaler Patch-Clamp-Methodik untersucht. Hierfür wurden beide Varianten mit Hilfe eines YFP-getaggten Plasmids in HEK293-Zellen überexprimiert und die Lysosomen über Nacht mit Vacuolin-1 vergrößert. Nach Freilegung des Lysosoms mit einer Isolierpipette konnte die lysosomale Membran gepatcht und die Ionenströme nach Aktivierung mit dem endogenen Agonisten PI(3,5)P2 gemessen werden. Im direkten Vergleich der Kanalleitfähigkeit konnte kein Unterschied zwischen TPC2<sup>L564</sup> und TPC2<sup>L564P</sup> festgestellt werden (Abb. 3a). Obwohl eine Variation an Position 564 somit keinen direkten Einfluss auf den Kanalfunktion zu haben scheint, zeigen die Genomdaten einen Einfluss auf das Vorhandensein weiterer Variationen. So war in Verbindung mit TPC2<sup>L564P</sup> die Anzahl und die Häufigkeit zusätzlicher SNPs deutlich erhöht, im Gegensatz zu TPC2<sup>L564</sup>, in dessen Verbindung nur die Variante TPC2<sup>S681L</sup> in vereinzelten Populationen gefunden werden konnte (Abb. 3b).

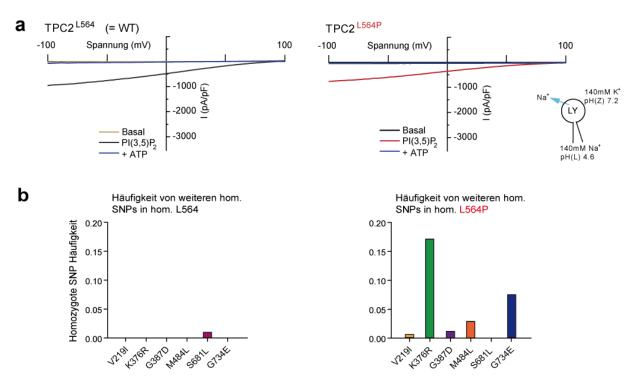


Abbildung 3: Position 564.

(a) Repräsentative Patch-Clamp-Messungen von PI(3,5)P<sub>2</sub>-induzierten Strömen (1 μM) und dem anschließenden Block mit ATP (1mM) in TPC2<sup>L564</sup>-YFP- bzw. TPC2<sup>L564P</sup>-YFP-überexprimierenden HEK293-Lysosomen. (b) Allelhäufigkeit von weiteren homozygoten SNPs in Verbindung mit TPC2<sup>L564</sup> bzw. TPC2<sup>L564P</sup>. Publizierte Abbildung [1].

In weiteren Patch-Clamp-Messungen wurde festgestellt, dass die Variante TPC2<sup>L564P</sup> eine Voraussetzung für die in der Literatur bereits beschriebene gesteigerte Kanalfunktion von TPC2<sup>M484L</sup> zu sein scheint. So waren die PI(3,5)P<sub>2</sub>-induzierten Ströme von TPC2<sup>M484L</sup> nur erhöht, wenn diese Variante in Verbindung mit TPC2<sup>L564P</sup> auftrat (Abb. 4a und 4j). Trat TPC2<sup>M484L</sup> in Verbindung mit TPC2<sup>L564</sup> auf, konnte kein signifikanter Unterschied zu den Strömen in den Zellen mit TPC2<sup>L564</sup> gemessen werden (Abb. 3a, 4b und 4j).

Um das Phänomen der Abhängigkeit der gesteigerten TPC2<sup>M484L</sup>-Kanalfunktion von der Aminosäure Prolin an Position 564 genauer zu untersuchen, wurde eine Reihe von Mutagenesen in diesem Bereich des Proteins durchgeführt. Zunächst wurden die beiden angrenzenden Aminosäuren von Position 564, K563 und M565, jeweils gegen ein Prolin ausgetauscht, wobei keine der beiden Varianten in einer erhöhten Aktivierung resultierte [1]. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch die Aminosäure Glycin, die ebenfalls einen leicht helix-brechenden Effekt aufweist, die gesteigerte Aktivierung von TPC2<sup>M484L</sup> vermitteln kann. Dazu wurde das Kontrakt TPC2<sup>M484L/L564G</sup> untersucht, jedoch zeigte auch diese Variante keine erhöhten Ionenströme (Abb. 4i und 4j). Aufgrund dieser Experimente kann geschlossen werden, dass das Vorhandensein von Aminosäure Prolin an Position 564 eine nötige Voraussetzung zu sein scheint, damit die gesteigerten Kanalfunktion von TPC2<sup>M484L</sup> vermittelt werden kann.

Neben dem SNP TPC2<sup>M484L</sup> zeigten zwei weitere Varianten erhöhte Ionenströme nach Aktivierung mit PI(3,5)P<sub>2</sub>: TPC2<sup>K376R</sup> und TPC2<sup>G387D</sup> (Abb. 4c, 4d und 4j). Die aktivierten Ionenströme der beiden anderen homozygot vorkommenden Varianten, TPC2<sup>V219I</sup> und TPC2<sup>S681L</sup> (Abb. 4e und 4g), zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Strömen der TPC2<sup>L564</sup>-Zellen (Abb. 3a). Jedoch zeigte TPC2<sup>S681L</sup> eine Tendenz zu einer erhöhten basalen Aktivität im Vergleich zur TPC2<sup>L564</sup>-Kontrolle (Abb. 4g und 4j). Da TPC2<sup>V219I</sup> überwiegend zusammen mit TPC2<sup>M484L</sup> auftritt (siehe nachfolgendes Kapitel), wurde auch diese Doppelmutation getestet. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss von TPC2<sup>V219I</sup> auf die gesteigerten Kanalfunktion von TPC2<sup>M484L</sup> festgestellt werden (Abb. 4a, 4f und 4j). Alle untersuchten Varianten zeigten eine vergleichbare Lokalisation im Lysosom und es konnten keine Unterschiede in der Expression der Konstrukte festgestellt werden [1].

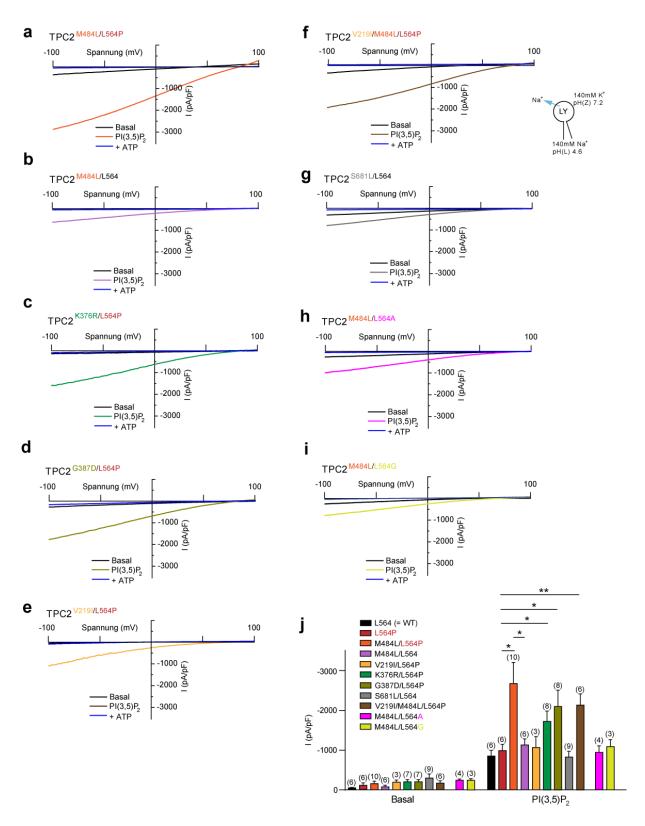


Abbildung 4: Effekt von PI(3,5)P2 auf die TPC2 SNPs.

(a-i) Repräsentative Messungen von PI(3,5)P<sub>2</sub>-induzierten Strömen (1  $\mu$ M) und dem anschließenden Block mit ATP (1 mM) in HEK293-Lysosomen, die verschiedene YFP-getaggte SNPs überexprimieren (j) Statistische Zusammenfassung der Patch-Clamp-Daten. Gezeigt werden die durchschnittlichen Stromdichten bei -100 mV (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Publizierte Abbildung [1]

Um die im Überexpressionssystem in HEK293-Zellen gemessenen Daten zu bestätigen, wurden die Patch-Clamp-Messungen in endogen exprimierenden Zellen wiederholt. Dafür wurden zunächst 136 humane Spender [71] genotypisiert und 9 geeignete Fibroblastenzelllinien für die anschließenden Messungen ausgewählt. Alle Spender waren europäischkaukasischer Herkunft und homozygot für TPC2<sup>L564P</sup> (Abb. 5a), womit die hohe durchschnittliche Allelhäufigkeit in dieser Population bestätigt werden konnte (Abb. 1b). Die Variante TPC2<sup>S681L</sup>, die hauptsächlich im ostasiatischen Raum auftrat, konnte in keinem Spender nachgewiesen werden. Drei der vier ausgewählten Spender mit TPC2<sup>M484L</sup> (Spender 1, 2, 5, 8) und der Spender mit TPC2G734E waren blond, was in Übereinstimmung mit der bisher veröffentlichten Literatur war, in der für diese beiden SNPs eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine blonde Haarfarbe beschrieben worden war [71, 108]. Zudem waren je ein Spender homozygot für TPC2K376R (Spender 4) und für TPC2G387D (Spender 7) sowie zwei Spender jeweils heterozygot für diese beiden SNPs (Spender 3 und 9, Abb. 5a). Es konnte unter den insgesamt 136 genotypisierten Spendern nicht eine Person ohne einen SNP in TPC2 identifiziert werden, die als WT-Kontrolle verwendet werden konnte. Dies bestätigte zusätzlich die hohe genetische Varianz dieses Ionenkanals.

Die endolysosomalen Patch-Clamp-Messungen zeigten signifikant höhere Ströme in den TPC2<sup>M484L</sup>-Fibroblasten im Vergleich zu Spender 3, der keine homozygoten SNPs enthielt und somit als Referenz verwendet wurde (Abb. 5b). In den Fibroblasten der Spender 4 und 7 konnten ebenfalls signifikant höhere Ströme im Vergleich zu Spender 3 gemessen werden, wobei diese jedoch geringer ausgeprägt waren als die Ströme in den TPC2<sup>M484L</sup>-Fibroblasten. Diese geringe Aktivitätserhöhung der Fibroblasten mit TPC2<sup>K376R</sup> und TPC2<sup>G387D</sup> ist in Übereinstimmung mit den Messdaten aus dem Überexpressionssystem in HEK293-Zellen. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Messergebnisse der endogen exprimierenden Zellen sowohl die Erkenntnisse aus dem Überexpressionssystem bestätigen als auch die hohe genetische Varianz dieses Ionenkanals untermauern, welche die Analyse der genomischen Datenbanken ergab.

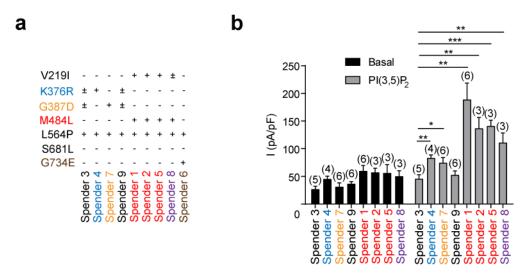


Abbildung 5: TPC2 SNPs in humanen Fibroblasten.

(a) Genotypisierungsergebnisse der ausgewählten Spenderfibroblasten. + symbolisiert einen homozygoten SNP,  $\pm$  einen heterozygoten Genotyp. (b) Statistische Zusammenfassung der lysosomalen Patch-Clamp-Daten von humanen Spenderfibroblasten, aktiviert mit PI(3,5)P<sub>2</sub> (10  $\mu$ M). Gezeigt werden die durchschnittlichen Stromdichten bei -100 mV (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Publizierte Abbildung [1].

#### 4.3. TPC2 SNPs in GWAS-Datenbanken

Nach der funktionellen Charakterisierung der TPC2 SNPs wurde eine mögliche (patho-) physiologische Relevanz untersucht. Dies wurde anhand der Assoziationen der einzelnen SNPs mit relevanten Phänotypen in publizierten GWAS evaluiert. Zunächst wurde der *GWAS-Catalog* ausgewertet, eine Datenbank, in der die Ergebnisse aus über 5000 Publikationen aus dem Bereich der Populationsgenetik kuratiert sind. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei GWAS-Studien spricht man generell von genomweiter Signifikanz ab einem *p*-Wert < 5 x 10<sup>-8</sup> [109]. Dementsprechend konnten in dieser Datenbank für drei homozygote SNPs, TPC2<sup>V219I</sup>, TPC2<sup>M484L</sup> und TPC2<sup>G734E</sup>, Publikationen mit genomweiter Signifikanz für ein bestimmtes Merkmal gefunden werden. Bei zwei SNPs, TPC2<sup>V219I</sup> und TPC2<sup>M484L</sup>, wurden Publikationen über eine Verbindung mit T2DM aufgeführt (Tab. 1).

Tabelle 1: TPC2 SNPs im GWAS-Catalog

SNP	Kennung	p-Wert	OR <sup>1</sup>	Merkmal	PM-ID <sup>2</sup>
V219I	rs72928978	6 x 10 <sup>-48</sup>	1,391	Braune vs. schwarze Haarfarbe	30531825
		2 x 10 <sup>-8</sup>	0,952	Typ 2 Diabetes mellitus (bereinigt um BMI)	29632382
		5 x 10 <sup>-7</sup>	0,952	Typ 2 Diabetes mellitus	29632382
K376R	rs3750965	3 x 10 <sup>-7</sup>	-	Haarfarbe	20585627
M484L	rs35264875	4 x 10 <sup>-30</sup>	2,49	Blonde vs. schwarze Haarfarbe	18488028
		2 x 10 <sup>-6</sup>	0,935	Typ 2 Diabetes mellitus	29632382
G734E	rs3829241	5 x 10 <sup>-188</sup>	1,269	Blonde vs. braune/Schwarze Haarfarbe	30531825
		3 x 10 <sup>-63</sup>	-	Knochenmineraldichte der Ferse	30595370
		8 x 10 <sup>-62</sup>	-	Knochenmineraldichte der Ferse	30598549
		9 x 10 <sup>-51</sup>	-	Knochenmineraldichte der Ferse	30048462
		5 x 10 <sup>-21</sup>	-	*Knochenmineraldichte der Ferse	28869591
		6 x 10 <sup>-13</sup>	-	Knochenmineraldichte der Ferse (Frauen)	28869591
		2 x 10 <sup>-9</sup>	-	Knochenmineraldichte der Ferse (Männer)	28869591

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Odds Ratio; <sup>2</sup> Pubmed-Identifikationsnummer der Quelle; Daten veröffentlicht in [1]

Um die Assoziation dieser und aller anderen SNPs mit T2DM genauer zu untersuchen, wurde als nächstes das T2DKP ausgewertet. In diesem Portal werden menschliche genetische Informationen gesammelt, die mit T2DM und verwandten Merkmalen in Verbindung stehen. Alle Assoziationen der TPC2 SNPs aus Tabelle 1 und dem T2DKP wurden ausgewertet und die fünf Phänotypen mit der höchsten Assoziation für jeden homozygoten SNP grafisch in Forest-Plots dargestellt (Abb. 6a-6g). Die dabei gezeigte Effektgröße beschreibt das erhöhte Risiko für einen bestimmten Phänotyp, das durch die genetische Variante vermittelt wird. Eine positive Effektgröße signalisiert eine direkte Assoziation zwischen SNP und Phänotyp, eine negative Effektgröße signalisiert eine indirekte Assoziation.

Aus den Einträgen der beiden Datenbanken konnte somit eine genomweite Signifikanz für die Assoziation der SNPs TPC2<sup>V219I</sup>, TPC2<sup>M484L</sup> und TPC2<sup>G734E</sup> mit Haarpigmentation entnommen werden (Abb. 6a, 6d und 6g). Zusätzlich zeigte TPC2<sup>G734E</sup> eine Assoziation mit veränderter mineralischer Knochendichte und TPC2<sup>V219I</sup> mit einem verminderten Risiko für T2DM. Es gab außerdem Hinweise in mehreren Studien bzw. Datensätzen für eine Assoziation von TPC2<sup>M484L</sup> mit einem verminderten Risiko für T2DM, jedoch wurde dabei keine genomweite Signifikanz erreicht ( $p = 9.64 \times 10^{-8}$  im Datensatz aus T2DKP und siehe Tabelle 1). Neben der erhöhten mineralischen Knochendichte, konnte für TPC2<sup>G734E</sup> eine genomweite Signifikanz für die polygene Eigenschaft Körpergröße gefunden werden, womit diese Variante im Gegensatz zu dem SNP TPC2<sup>K376R</sup> stand, der mit verminderter Knochenmineraldichte und erhöhter Körpergröße assoziiert wurde (Abb. 6b).

Bei der Interpretation der Daten von TPC2<sup>V219I</sup> ist zu beachten, dass bei einer Untersuchung zur Unabhängigkeit der SNPs aufgefallen ist, dass TPC2<sup>V219I</sup> in allen überprüfbaren sequenzierten Genomen ausschließlich in Verbindung mit TPC2<sup>M484L</sup> auftrat (Abb. 6h), was auch in den humanen Fibroblasten bestätigt werden konnte (Abb. 5a). Aufgrund der funktionellen Charakterisierung von TPC2<sup>V219I</sup> (Abb. 4e) stellt sich die Frage, ob die mit TPC2<sup>V219I</sup> assoziierten Phänotypen vielleicht auf das gemeinsame Auftreten mit TPC2<sup>M484L</sup> zurückzuführen sind. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die TPC2 SNPs mit unterschiedlichen Phänotypen in Assoziation gebracht werden konnten, unter anderem mit Haarfarbe, T2DM, Knochendichte und Körpergröße.

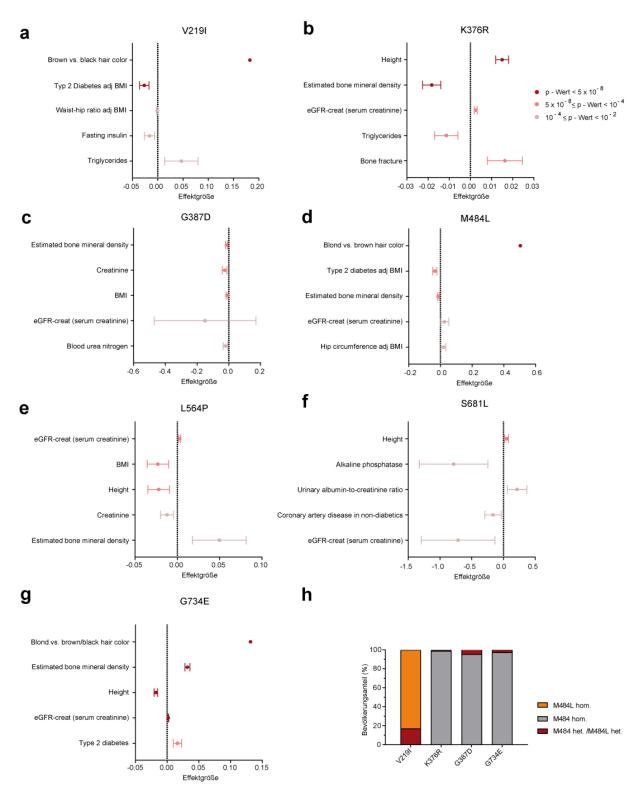


Abbildung 6: GWAS-Analyse der TPC2 SNPs.

(a-f) Die fünf Phänotypen mit der höchsten Assoziation aus *GWAS-Catalog* und T2DKP für jeden homozygot vorkommenden SNPs. Die Effektgröße ist dargestellt als Mittelwert mit 95 %-Konfidenzintervall. Die Farbe spiegelt die statistische Signifikanz wider, dunkelrot signalisiert eine genomweite Signifikanz. (h) Die TPC2 SNPs in Kombination mit TPC2<sup>M484L</sup>. Publizierte Abbildung [1].

#### 4.4. Übersicht aller Patienten mit MCOLN1 Mutationen

Mutationen im Ionenkanal TRPML1 werden als die Ursache für die autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit MLIV angesehen. Alle in der Literatur beschriebenen oder in Genom-Datenbanken gelisteten Patienten wurden in der folgenden Grafik (Abb. 7) zusammengefasst [87, 99]. Jedes Symbol repräsentiert ein Individuum, das entweder mit MLIV diagnostiziert wurde oder Mutationen auf beiden Allelen im Gen *MCOLN1* aufwies.

Die Krankheit wurde zum ersten Mal 1974 beschrieben [110] und in den darauffolgenden Jahren wurden überwiegend Patienten mit aschkenasisch-jüdischem Hintergrund diagnostiziert. Am häufigsten traten bei diesen Patienten die beiden Gründermutationen, die Spleißstellenmutation c.406-2A>G und die ~6 kb-Deletion c.511del6434 (auch AJ major bzw. AJ minor genannt), auf. In neueren Publikationen wurden überwiegend nicht-jüdische Patienten mit zahlreichen neuen Mutationen beschrieben [111-113]. Bei den meisten homozygoten Patienten wurde eine Blutsverwandtschaft der Eltern berichtet. Aufgrund der autosomal-rezessiven Vererbung dieser Krankheit kann es bei genetisch nah verwandten Paaren mit zahlreichen Kindern zu mehreren betroffenen Nachkommen in einer Familie kommen. Dieser Fall war bei verschiedenen arabischen und pakistanischen Familien beschrieben worden [91, 114, 115]. Es wurde auch von Patienten mit Mutationen auf beiden MCOLN1 Allelen berichtet, die nicht mit MLIV diagnostiziert worden sind. Beispielsweise wies ein französischer Patient die beiden Mutationen Q278\* und c.681-19A<C und einen typischen MLIV-Phänotyp auf, die Diagnose MLIV wurde jedoch nicht gestellt [116]. Insgesamt wurden bisher 72 Patienten mit 50 unterschiedlichen pathogenen Mutationen im MCOLN1 Gen in der Literatur beschrieben oder in Datenbanken hinterlegt.

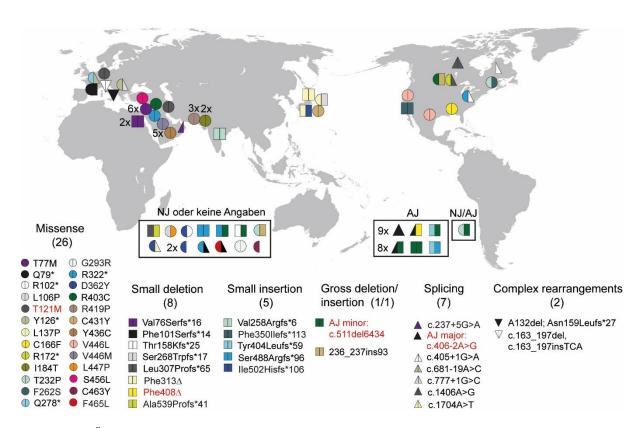


Abbildung 7: Übersicht aller Patienten mit diagnostizierten Mutationen in MCOLN1.

Symbole mit zwei identischen Seiten repräsentieren einen homozygoten Patienten, verschiedene Seiten einen heterozygoten Patienten. Symbole mit nur einer Seite zeigen Patienten, die mit MLIV diagnostiziert worden sind, für die jedoch keine Informationen zum anderen Allel verfügbar waren. Patienten mit aschkenasisch-jüdischem Hintergrund (AJ) wurden gesondert dargestellt und Patienten ohne Herkunftsangaben wurden als "nicht-jüdisch (NJ) oder keine Angaben" beschriftet. Rot hinterlegte Mutationen wurden im Zuge dieser Arbeit genauer untersucht.

# 4.5. Charakterisierung der Mutation TRPML1<sup>T121M</sup>

Im Dezember 2019 wurde im Universitätsklinikum Münster eine 19-jährige deutsche Patientin jesidisch-kurdischer Herkunft mit der Krankheit MLIV diagnostiziert. Die Patientin leidet unter einer stark nachlassenden Sehleistung und der Laborbefund zeichnet ein typisches MLIV-Bild: Eisenmangelanämie, verminderte Eisen- und Ferritinkonzentrationen im Blut, reduziertes Erythrozytenvolumen und reduzierte korpuskuläre Hämoglobinkonzentration [117]. Die Patientin weist jedoch eine sehr milde Form dieser Krankheit auf. Sie kann ohne Hilfsmittel laufen und mit der Außenwelt kommunizieren, was den meisten anderen MLIV-Patienten nicht möglich ist. Die Sequenzierung ihres Genoms ergab, dass die Patientin homozygot für die bis dahin unbekannte Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> ist. Um eine mögliche Erklärung für den milden Verlauf der Patientin zu finden, wurde eine funktionelle Charakterisierung der Mutation durchgeführt.

Zunächst wurde die subzelluläre Lokalisation des TRPML1<sup>T121M</sup>-Proteins im Vergleich zum TRPML1<sup>WT</sup>-Protein im Überexpressionssystem in Hela-Zellen betrachtet. Während für das

TRPML1<sup>WT</sup>-Protein eine Kolokalisation mit LysoTracker Deep Red (Ly-DR) in sauren Organellen beobachtet werden konnte, zeigte das Protein mit der Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> eine unspezifische Lokalisation im gesamten Zellkörper (Abb. 8a).

Die von der Patientin entnommenen Fibroblasten zeigten die zu erwartenden typischen Charakteristika von MLIV-Zellen: Autofluoreszenz (nicht gezeigt), mit Filipin färbbare endolysosomale Cholesterinakkumulationen (Abb. 8b) und einen gestörten LacCer-Transport (Abb. 8c). LacCer wird in gesunden Zellen über einen Clathrin-unabhänigen Mechanismus aufgenommen und zum Golgi-Apparat transportiert. Anstatt des vorwiegend perinuklearen Musters von LacCer in WT-Zellen [118] zeigten die Fibroblasten der Patientin punktförmige, über den gesamten Zellköper verteilte LacCer-Ansammlungen in den endolysosomalen Strukturen. Zusätzlich wurden Patch-Clamp-Messungen an den isolierten Lysosomen durchgeführt. Obwohl die Ly-DR-Färbung auf eine unspezifische Lokalisation des Proteins mit der Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> hindeutete, konnten endogene einwärtsgerichtete Ströme an der lysosomalen Membran nach Aktivierung des Kanals mit den beiden TRPML1-Agonisten EVP169 und ML-SA1 [105] detektiert werden. Die gemessenen Ströme waren allerdings deutlich niedriger als die Ströme in vergleichbaren TRPML1<sup>WT</sup>-Messungen (Abb. 8d).

Zusätzlich war es möglich, in TRPML1<sup>T121M</sup>-YFP-überexprimierenden HEK293-Zellen fluoreszierende, mit Vakoulin-1-vergrößerte Lysosomen zu isolieren (Abb. 8e). Dies deutete, zumindest für einen Teil des Proteins, auf eine korrekte Lokalisation in der lysosomalen Membran hin. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei TRPML1<sup>T121M</sup> um eine Mutation handelt, die zu einer Fehllokalisation des Ionenkanals führte, es jedoch Hinweise auf eine Restfunktion des Kanals in der lysosomalen Membran gab.

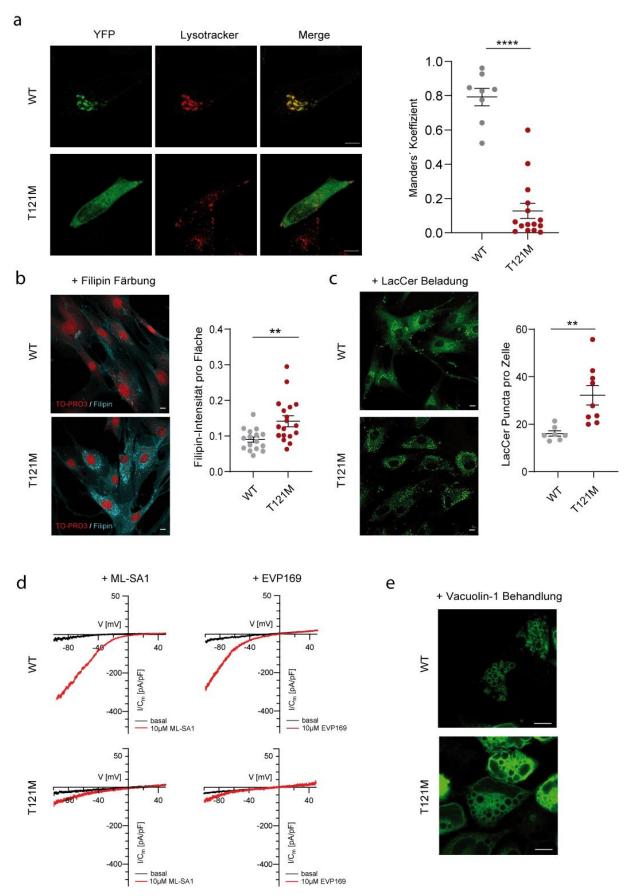


Abbildung 8: Charakterisierung der neuen Patientenmutation TRPML1<sup>T121M</sup>.

(a) Repräsentative Bilder der subzellulären Lokalisation des TRPML1<sup>WT</sup>- und des TRPML1<sup>T121M</sup>-Proteins. YFP-getaggte Plasmide überexprimiert in Hela-Zellen für 24 Stunden und anschließende Inkubation mit Ly-DR (Verdünnung 1:10.000, Invitrogen) für 30 min. Quantifizierung des Manders´ Koeffizienten für die Überlappung von LyTr-DR und YFP mit dem *Image J JACOP plugin*. Die Maßstabsleiste zeigt 10 μm. Für die zelluläre Lokalisation von TRPML1<sup>F408Δ</sup> siehe [95]. (b-c) Repräsentative Bilder und Statistik zu Filipin-Assay auf unveresterte Cholesterine und LacCer-Transport Assay in WT- und Patientenfibroblasten. (d) Repräsentative Patch-Clamp-Messungen von ML1-SA1- und EVP169-induzierten Strömen (10 μM) in Patienten- und WT-Kontrollfibroblasten. (e) TRPML1<sup>WT</sup>-YFP- und TRPML1<sup>T121M</sup>-YFP-Plasmid überexprimiert in HEK293-Zellen mit durch Vacoulin-1 vergrößerten Lysosomen. Alle Fehlerbalken werden als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben.

#### 4.6. TPC2-Aktivierung in MLIV-Patientenfibroblasten

Da auch eine exogene Aktivierung des TRPML1-Kanals der Patientin nur zu einer minimalen Steigerung der Ionenströme führte, eignet sich der Ionenkanal selbst nicht als direkte Zielstruktur für eine Therapie mit niedermolekularen Molekülen. Aus diesem Grund wurde ein neuer Ansatz getestet: Führt eine Aktivierung von TPC2 anstatt TRPML1 zu einer Verbesserung des zellulären Phänotyps von MLIV-Patienten?

Stellvertretend dafür wurde der Effekt von verschiedenen TPC2-Agonisten auf die mit Filipin gefärbten Cholesterinakkumulationen in den Lysosomen von MLIV-Patientenfibroblasten ermittelt. Verwendet wurde der kürzlich publizierte, selektive TPC2-Agonist TPC2-A1-P [50] sowie einige andere, bereits zugelassene Arzneistoffe, die in Patch-Clamp-Messungen eine Aktivierung von TPC2 zeigten [51]. Es handelte sich dabei um die trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin, Clomipramin und Desipramin, um das Neuroleptikum Chlorpromazin sowie um Riluzol, einen Arzneistoff, der in der Behandlung von Amyotropher Lateralsklerose zum Einsatz kommt. Da die mittleren effektiven Konzentrationen (EC $_{50}$ ) der Patch-Clamp-Messungen [51] zu toxisch für die Zellen über einen Inkubationszeitraum von mehreren Tagen waren, musste zunächst ein Konzentrationstoleranztest durchgeführt werden (Abb. 9a). Mit den neu ermittelten Konzentrationen wurden die Zellen dann für 72 Stunden inkubiert und anschließend der Effekt auf die endolysosomale Cholesterinakkumulation in den Zellen untersucht. Während TPC2-A1-P zu einer effektiven Senkung der Cholesterinansammlungen in den Patientenfibroblasten führte, konnten mit den anderen TPC2-Agonisten keine Auswirkungen auf den Cholesterinphänotyp festgestellt werden (Abb. 9b).

Um zu testen, ob auch Patientenfibroblasten mit anderen TRPML1-Mutationen eine Phänotypverbesserung nach TPC2-Aktvierung zeigen, wurde der Assay an weiteren Zellen wiederholt. Insgesamt wurde der Assay an den folgenden fünf Patientenzelllinien durchgeführt: MLIV-2527 und MLIV-2048 stammen von Patienten mit den Gründermutationen, die deshalb kein funktionsfähiges TRPML1-Protein exprimieren und einen typischen MLIV-Phänotyp zeigen. Die Zellen MLIV-F408Δ exprimieren einen korrekt im Lysosom lokalisierenden Kanal, bei dem die Aminosäure Phenylalanin an Position 408 fehlt, was zu einer Funktions-

beeinträchtigung des Kanals führt und daraus resultierend zu einem MLIV-Phänotyp mit vergleichsweise milder Ausprägung. Außerdem wurden die Fibroblasten MLIV-T121M der deutschen MLIV-Patientin und, zur Kontrolle, WT-Fibroblasten getestet. In allen Zellen, mit Ausnahme der WT-Zellen, konnte eine signifikante Reduzierung der Cholesterinakkumulation in den Lysosomen durch Inkubation mit TPC2-A1-P festgestellt werden (Abb. 9c). Eine TRPML1-Aktivierung mit MK6-83 und ML-SA1 führte nur bei MLIV-F408Δ zu einer Verbesserung des Phänotyps, was bisher veröffentlichte Ergebnisse bestätigte [95]. Aus diesem Grund scheint die Aktivierung von TPC2 mit dem Agonisten TPC2-A1-P ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Reduzierung von angehäuftem lysosomalem Speichermaterial zu sein und somit eine mögliche Therapieoption für die Behandlung von MLIV-Patienten, unabhängig von den zugrundeliegenden Mutationen in TRPML1.

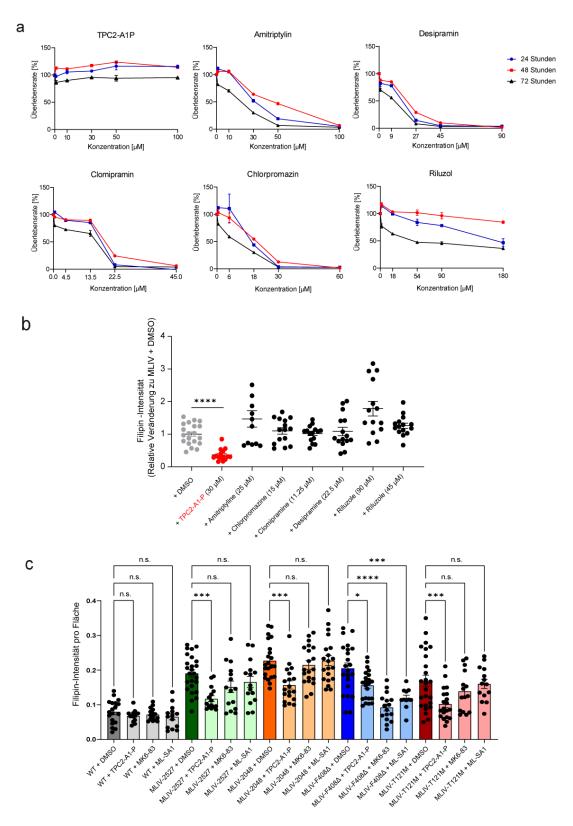


Abbildung 9: Effekt von TPC2-A1-P auf die Cholesterinakkumulation in Patientenfibroblasten.

(a) Konzentrationstoleranztest von TPC2-A1-P und anderen postulierten TPC2-Agonisten auf Patientenfibroblasten nach 24, 48 bzw. 72 Stunden. Die jeweils höchste Konzentration entspricht etwa der vorgeschlagenen EC $_{50}$ . Ermittelt wurde der Anteil der überlebenden Zellen mittels CellTiter-Blue. (b) Effekt von TPC2-Agonisten auf die Cholesterinakkumulation in Patientenfibroblasten nach 72h Inkubation, visualisiert durch Filipin. Nicht gekennzeichnete Tests waren nicht signifikant. (c) Effekt von TPC2-A1-P, MK6-83 und ML-SA1 (30  $\mu$ M, Inkubation für 72 Stunden) auf die Cholesterinakkumulation in WT und verschiedenen Patientenfibroblasten, visualisiert durch Filipin. Alle Fehlerbalken werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

#### 5. Diskussion

Die biomedizinische Forschung konzentriert sich zunehmend auf ein besseres Verständnis der funktionellen Auswirkungen von Genomvariationen auf die Gesundheit des Menschen. Dabei wird beispielsweise untersucht, welche Polymorphismen einen Einfluss auf die Reaktion gegenüber Umwelteinflüssen oder den Metabolismus und die Nebenwirkungen von Arzneistoffen besitzen [18-20, 119]. Außerdem wird versucht zu entschlüsseln, welche Mutationen im menschlichen Genom Hauptrisikofaktoren für bestimmte Erkrankungen darstellen [120] oder genetisch bedingten Krankheiten zu Grunde liegen.

Auch die Lysosomen sind in den letzten Jahren mehr und mehr in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt und gelten heute als potenzielle therapeutische Zielstruktur für eine Vielzahl von Erkrankungen. Um neue, auf das Lysosom abzielende Therapiestrategien entwickeln zu können, ist ein tiefgehendes Verständnis der Funktions- und Regulationsmechanismen des Lysosoms unumgänglich. Dazu gehört auch der Einfluss von genetischen Variationen auf die Funktionen der lysosomalen Ionenkanäle, die für eine korrekte Lysosomenfunktion unerlässlich sind.

Die vorliegende Arbeit stellt die erste systematische Analyse von Polymorphismen im lysosomalen Ionenkanal TPC2 dar. Es wurden Datensätze mit bis zu 140.000 Genomen aus verschiedenen Populationen ausgewertet, wobei gezeigt werden konnte, dass TPC2 eine höhere genetische Variabilität aufweist als verwandte lysosomale Ionenkanäle [1]. Neben den beiden bereits in der Literatur beschriebenen SNPs konnten fünf weitere homozygote Varianten in mindestens 1 % der Bevölkerung mit einer ausgeprägten ethnischen und geografischen Verteilung gefunden werden. Während für einige Varianten kein Einfluss auf die Kanalaktivität beobachtet werden konnte, zeigten die beiden Varianten TPC2K376R und TPC2<sup>G387D</sup> eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem endogenen Liganden PI(3,5)P<sub>2</sub>, was bereits zuvor für den SNP TPC2<sup>M484L</sup> beschrieben worden war [71]. Ein anderer SNP stach aufgrund seiner breiten globalen Verbreitung heraus: Die Variante TPC2<sup>L564P</sup> zeigte eine hohe durchschnittliche Allelhäufigkeit und war auf globaler Ebene die dominantere Isoform gegenüber der im Referenzgenom hinterlegten Variante TPC2<sup>L564</sup>. Auch in den 43 untersuchten fossilen Funden und in den Referenzgenomen von verwandten Primatenarten dominierte TPC2<sup>L564P</sup>. Diese Ergebnisse deuten auf eine evolutionär bewahrte hohe Verbreitung der Aminosäure Prolin an Position 564 im TCP2-Protein hin [1]. Zudem konnte festgestellt werden, dass in Verbindung mit TPC2<sup>L564P</sup> die Anzahl und die Häufigkeit anderer SNPs deutlich erhöht war, wohingegen in Verbindung mit TPC2<sup>L564</sup> nur die Variante TPC2<sup>S681L</sup> gefunden werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der SNP

TPC2<sup>L564P</sup> phylogenetisch älter ist als die anderen SNPs und diese auf dessen Basis entstanden sind.

Zwar zeigte TPC2<sup>L564P</sup> in endolysosomalen Patch-Clamp-Messungen keinen direkten Einfluss auf die Kanalfunktion, jedoch wurde festgestellt, dass TPC2<sup>L564P</sup> eine Voraussetzung für die gesteigerte Kanalfunktion von TPC2M484L darstellte, und somit essentiell ist für die erhöhte Wahrscheinlichkeit dieses SNPs für geringere Pigmentierung und blonder Haarfarbe [70]. Nur mit der Aminosäure Prolin an Position 564 zeigte TPC2<sup>M484L</sup> eine gesteigerte Sensitivität gegenüber PI(3,5)P<sub>2</sub>. War an Position 564 ein Leucin zu finden, trat dieser Effekt nicht auf. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liefert die Kryo-EM-Struktur des humanen TPC2-Kanals, die interessanterweise den SNP TPC2<sup>L564P</sup> enthält [43]. Aus dieser geht hervor, dass sich Position 564 auf einer Schleife vor der IIS4-S5-Linker-Helix befindet, und somit direkt zwischen der Aminosäure an Position 484 und der Kanalpore. Bei Kanalöffnung erfährt diese Schleife eine Umstrukturierung und die drei Aminosäuren vor der IIS4-S5-Linker-Helix (K563, P564 und M565) werden Teil der Linker-Helix. Diese strukturelle Neuordnung ermöglicht es dem IIS4-S5-Linker bei Kanalöffnung nach außen zu schwingen und somit Platz für die Porendilatation zu schaffen. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt ist, dass TPC2<sup>M484L</sup> die Wirkung der PI(3,5)P<sub>2</sub>-Aktivierung verstärkt, jedoch eine Signaltransduktion durch TPC2<sup>L564P</sup> erforderlich ist, um die Porenerweiterung zu bewirken. Die TPC2<sup>M484L</sup>assoziierte gesteigerte Kanalfunktion wird somit durch den TPC2<sup>L564P</sup>-kodierenden IIS4-S5-Linker übertragen und die Kanalpore bei Aktivierung mit PI(3,5)P<sub>2</sub> weiter erweitert [1]. Ein Ersatz des helix-initiierenden Prolins durch ein Leucin würde diese Linker-Helix-Verlängerung dramatisch beeinflussen und so die gesteigerte Kanalfunktion nicht vermitteln. Um dieses Modell zu bestätigen und den Mechanismus genauer zu untersuchen, wäre eine vergleichbare Kryo-EM von TPC2 mit TPC2<sup>L564</sup> erforderlich [1].

In der anschließenden Metaanalyse zur physiologischen Relevanz konnten die gefundenen SNPs von TPC2 mit unterschiedlichen Phänotypen in Assoziation gebracht werden, unter anderem mit Haarfarbe, T2DM, Konchendichte und Körpergröße [1]. Interessanterweise sind dies physiologische Funktionen, bei denen bereits zuvor die Rolle von TPC2 diskutiert worden war. Die Funktion von TPC2 in Osteoklasten und bei der Pigmentierung konnte bereits experimentell nachgewiesen werden [45, 56], wobei die dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die physiologische Relevanz des Ionenkanals TPC2 in diesen Zellen nun unterstreichen. Inwieweit die SNPs die anderen diskutierten physiologischen Funktionen von TPC2 oder andere, mit dem endolysosomalen System in Verbindung stehende, Krankheiten beeinflussen, bleibt zu untersuchen. So könnte eine gesteigerte Kanalfunktion einen Risikofaktor darstellen und beispielsweise die Anfälligkeit für Infektionen mit dem bakteriellen Cholera Toxin, dem Ebolavirus oder SARS-CoV-2 erhöhen [121, 122]. Da die TPC2-Aktivität mit der Glukose-Homöostase in Verbindung gebracht wird, könnte eine veränderte

TPC2-Aktivität auch mit der Entwicklung von Diabetes mellitus korrelieren [1]. Ein Einfluss der SNPs auf den Verlauf von Krebs- oder Fettlebererkankungen ist ebenfalls denkbar [69]. Angesichts ihrer direkten funktionellen Auswirkungen auf die Kanalaktivität sowie der Verbindung zwischen der Kanalfunktion und den verschiedenen Erkrankungen, sind solche Korrelationen nicht unwahrscheinlich [1].

Um diese und weitere Funktionsuntersuchungen von TPC2 durchzuführen, werden die neu entdeckten pharmakologischen Hilfsmittel nützlich sein. Zwei Forschergruppen haben unabhängig voneinander TPC2-Agonisten entwickelt, entweder durch Umwidmung von bereits zugelassenen Arzneistoffen [51] oder durch das Screening nach neuen hochwirksamen Agonisten [50]. Auch eine Vielzahl von TPC2-Antagonisten steht für weitere Experimente zur funktionellen und physiologischen Charakterisierung von TPC2 zur Verfügung [104, 123, 124]. Die Antagonisten werden vor allem in der Erforschung von Krankheiten Verwendung finden, in denen sich in der Vergangenheit NAADP-Antagonisten als vorteilhaft erwiesen haben, wie zum Beispiel Morbus Parkinson, Krebs oder Arrhythmien [67]. Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse die evolutionäre Entstehung einer Vielfalt von SNPs im TPC2-Protein mit unterschiedlichen funktionellen Auswirkungen, die für die Manifestation und das Fortschreiten von TPC2-assoziierten Krankheiten von Bedeutung sein könnten [1].

Neben dem Ionenkanal TPC2 gibt es hunderte weiterer Proteine in oder an der Iysosomalen Membran [39]. Für viele dieser Proteine sind der Einfluss auf das Lysosom, deren Stoffwechselwege oder die daraus resultierenden physiologischen Funktionen nur wenig erforscht. Ein Iysosomales Membranprotein, welches Gegenstand intensiver Forschung ist, ist der Iysosomale Ionenkanal TRPML1, dessen Fehlfunktion mit der seltenen Iysosomalen Speicherkrankheit MLIV in Verbindung steht. Die ersten beschriebenen Fälle dieser Krankheit waren Patienten aschkenasisch-jüdischen Ursprungs mit den beiden Gründermutationen, die entsprechend als AJ major and AJ minor bezeichnet werden. Da die Heterozygotenfrequenz der beiden Mutationen in dieser Bevölkerungsgruppe bei 1:100 liegt [125], wurde MLIV in die genetische Beratung für aschkenasisch-jüdische Paare mit Kinderwunsch aufgenommen. Bei der Erstellung der Patienten-Übersicht konnte festgestellt werden, dass der Anteil der jüdischstämmigen Patienten in der Literatur über die Zeit zurückgegangen ist, was vermutlich auch auf die genetische Beratung für die betroffenen Paare zurückzuführen ist.

Aufgrund der unspezifischen Symptome und der unterschiedlichen Ausprägungen in den verschiedenen Patienten wird die Krankheit oft als Zerebralparese oder isolierte Netzhautdystrophie fehldiagnostiziert [89]. Mit der Möglichkeit zur Molekulardiagnose durch die Entdeckung des krankheitsverursachenden Gens [126] und des leichteren Zugangs zu Genomsequenzierungen als Teil der molekulardiagnostischen Routine ist davon auszugehen, dass in Zukunft die betroffenen Patienten häufiger und früher diagnostiziert werden [127]. Dies wird es letztendlich auch Patienten mit milderen Symptomen, welche kein typisches MLIV-Bild

zeigen, ermöglichen, eine Diagnose zu erhalten [115]. Vor allem im Hinblick auf den progressiven Charakter der Krankheit ist eine frühzeitige Diagnose wichtig, um eine bestmögliche Behandlung der Patienten zu gewährleisten und eine genetische Beratung der betroffenen Familien zu ermöglichen.

Denn obwohl die ersten psychomotorischen Symptome von MLIV bereits meist gegen Ende des ersten Lebensjahrs zu beobachten sind, werden viele Patienten - vor allem solche mit milderem MLIV-Phänotyp - erst spät im Laufe ihres Lebens diagnostiziert. Für die in Kapitel 4.5. beschriebene jesidisch-kurdische Patientin mit der neuen Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> wurde die Diagnose MLIV im Alter von 19 Jahren gestellt. Sie war aufgrund ihrer nachlassenden Sehleistung an das Universitätsklinikum Münster verwiesen worden, wo die Krankheit per molekulardiagnostischen Tests nachgewiesen wurde. Da ihr dank ihres milden Verlaufs die Kommunikation mit ihren behandelnden Ärzten möglich ist, kann sie der Forschungsgemeinschaft wertvolle Einblicke in ihr körperliches Befinden und ihre durch die Krankheit verursachten Einschränkungen geben. Die Fibroblasten der Patientin zeigten die typischen Charakteristika von MLIV-Zellen, wie Autofluoreszenz, Cholesterinakkumulationen und LacCer-Transportdefekte. Überraschenderweise konnten kleine Restionenströme in den Patch-Clamp-Messungen an der lysosomalen Membran beobachtet werden, obwohl das TPRML1-Protein mit der Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> eine unspezifische Lokalisation im gesamten Zellkörper zeigte. Die gemessenen Ströme waren zwar deutlich niedriger als die Ströme in vergleichbaren WT-Messungen, bei einer kompletten Fehllokalisation des Proteins würde man jedoch überhaupt keine durch TRPML1-Agonisten aktivierbaren Ionenströme erwarten.

Um die funktionellen Auswirkungen der Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> einordnen zu können, bietet sich ein Blick auf die Tertiärstruktur des Kanals an. Im TRPML1-Protein liegt Aminosäure 121 auf einer für TRPML-Kanäle charakteristischen lysosomalen Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne [128]. Diese Schleife bildet eine dichtgepackte Ringstruktur, die aus einer elektronegativen Kanalporenschleife und einer flachen Umrandung an der Oberseite der luminalen Pore besteht. Drei andere beschriebene MLIV-verursachende Mutationen, L106P, C166F und T232P, befinden sich ebenfalls auf dieser Schleife und zeigen eine Störung der Tetramerenbildung und daraus resultierend eine diffuse Verteilung in der Zelle sowie geringe bzw. keine Ionenströme bei Patch-Clamp-Experimenten [79]. Damit geben sie die Charakteristiken der Mutation TRPML1<sup>T121M</sup> wieder. Es ist denkbar, dass ein Austausch der Aminosäure Threonin durch die größere, unpolare Aminosäure Methionin die intramolekularen Interaktionen stört und es daraus folgend zu einer reduzierten Kanalstabilität durch fehlerhafte Zusammensetzung des Tetramers kommt, was vermutlich der Grund für die Fehllokalisation des Kanals in der Zelle darstellt. Die vorliegenden Patch-Clamp-Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass zumindest ein Teil des Proteins korrekt in der lysosomalen Membran lokalisiert wird, durch den die verminderten Ionenströme vermittelt werden. Dies wird

auch durch die Tatsache gestützt, dass es möglich war, gelb fluoreszierende, mit Vakoulin-1-vergrößerte Lysosomen aus TRPML1<sup>T121M</sup>-YFP-überexprimierenden HEK293-Zellen zu isolieren. Dies war beispielsweise bei TRPML1<sup>L447P</sup>-YFP-überexprimierenden Zellen, einer anderen Variante, die ebenfalls zu einer Fehllokalisation des Proteins führt [95], nicht der Fall. Somit ist von einem Verbleib eines Anteils des TRPML1<sup>T121M</sup>-Proteins in der lysosomalen Membran auszugehen. Eine dadurch vermittelte Restfunktion des Kanals könnte eine Erklärung für den bemerkenswert milden Krankheitsverlauf dieser Patientin liefern.

Dass auch eine durchgeführte Genomsequenzierung nicht zwingend zu einer Diagnose mit MLIV führt, zeigt das Beispiel eines anderen Patienten. In der Literatur wurde von einem französischen Patienten berichtet, der Mutationen auf beiden MCOLN1 Allelen besitzt (Q278\* und c.681-19A<C) [116]. Beide Mutationen führen zu einem verfrühten Stopp-Codon und es konnte keine signifikante RNA-Expression des Kanals detektiert werden. Obwohl der Patient typische MLIV-Symptome wie Hornhauttrübung und psychomotorische Einschränkungen zeigt, wurden nur die Mukolipidosen I, II und III mittels verfügbaren enzymatischen Tests untersucht. Da kein Enzymmangel in den Blutleukozyten vorlag, wurden diese Erkrankungen ausgeschlossen. In der Publikation wird nicht erwähnt, ob eine Diagnose mit MLIV in Betracht gezogen oder ob der Plasmagastrinspiegel, ein eindeutiger Biomarker für MLIV, untersucht worden ist. Ob der Patient aus Unkenntnis über die seltene Krankheit MLIV nicht diagnostiziert oder ob die Krankheit aus anderen, nicht genannten Gründen, ausgeschlossen wurde, konnte auch nach Rücksprache mit den Autoren nicht geklärt werden. Der Patient wurde unter den beschriebenen Symptomen (Cerebellar ataxia, hyperreflexia, external opthalmoparesis, bilateral corneal clouding, and abnormal behaviour) in der Datenbank abgelegt und taucht dementsprechend nicht in den MLIV-Datenbanken auf [87]. Es ist anzunehmen, dass es viele weiterer solcher unterdiagnostizierten Fälle gibt und vor diesem Hintergrund schätzt die ML4 Foundation, trotz bisher nur 72 in der Literatur beschriebenen Personen, die Zahl der weltweiten MLIV-Patienten auf etwa 2000 (Dr. Rebecca Oberman, ML4 Foundation, mündliche Kommunikation am 26.2.2021).

Bis dato existiert keine Therapie für Patienten mit der Krankheit MLIV. Der naheliegendste mögliche Therapieansatzpunkt ist der Ionenkanal TRPML1 selbst, der als ein Hauptregulator des zellulären Transports gilt und dessen Aktivitätssteigerung möglicherweise zu einer verstärkten Exozytose des angehäuften lysosomalen Speichermaterials führt [53]. Es wurden bereits niedermolekulare Moleküle beschrieben, die die reduzierte Aktivität des Ionenkanals bei gewissen Punktmutationen kompensieren und somit eine Fehlfunktion ausgleichen können [95]. Führt jedoch eine Mutation zu einer fehlerhaften Lokalisation oder ist die generelle Expression des Kanals gestört, ist eine Behandlung mit TRPML1-Agonisten für diese Patienten nicht sinnvoll. Für die Behandlung von anderen lysosomalen Speicherkrankheiten wurden bereits verschiedene Enzymersatz- und Chaperontherapien zur Anwendung am

Menschen zugelassen [129, 130]. Da MLIV jedoch nicht auf ein defektes lysosomales Enzym zurückzuführen ist, sondern auf eine Fehlfunktion des Ionenkanals TRPML1, sind diese Behandlungen für MLIV-Patienten nicht zielführend; umgekehrt jedoch könnte die Eigenschaft von TRPML1 lysosomale Exozytose und Autophagie zu fördern für verschiedenste lysosomale Speicherkrankheiten therapeutisch ausgenutzt werden.

Auf der Suche nach neuen therapeutischen Strategien für MLIV lag es nahe, statt der direkten Aktivierung von TRPML1 den Kompensationseffekt des verwandten Ionenkanals TPC2 zu testen. Die Kanäle weisen gemeinsame Merkmale auf: Es handelt sich bei beiden um nichtselektive Ionenkanäle, jeweils permeabel für Kalzium und Natrium, mit ähnlicher zellulärer Lokalisation sowie Aufgaben und einer jeweiligen Aktivierung durch den endogenen Liganden PI(3,5)P<sub>2</sub>. Aus diesem Grunde wurde überprüft, ob eine Aktivierung von TPC2 die Fehlfunktion von TRPML1 in MLIV-Patientenzellen kompensieren kann und dadurch positive Auswirkungen auf den zellulären Phänotyp hat. Ein typisches Merkmal von MLIV-Zellen ist eine Störung des Lipidtransports vom Lysosom zum Golgi Apparat [118]. Um die veränderte zelluläre Cholesterinhomöostase zu untersuchen [105], wurde zur Visualisierung das fluoreszierende cholesterinbindende Polyen-Antibiotikum Filipin benutzt. In Abb. 9c konnte gezeigt, werden, dass eine Aktivierung von TPC2 mit TPC2-A1-P zu einer Reduktion der charakteristischen endolysosomalen Cholersterinakkumulationen in allen MLIV-Patientenfibroblasten führte, unabhängig von den zugrundeliegenden Mutationen. Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Rettungseffekt auf das lysosomale Speichermaterial ist die Steigerung der lysosomalen Exozytose durch die Aktivierung mit TPC2-A1-P [50]. Weitere Untersuchungen des Mechanismus sowie ein möglicher Effekt von TPC-A1-P auf andere MLIV-Charakteristika, wie zum Beispiel den LacCer-Transport, bleibt in zusätzlichen zellulären Assays zu untersuchen.

Der Filipin-Assay wurde auch mit den anderen postulieren TPC2-Agnosten durchgeführt. Die in Patch-Clamp-Experimenten ermittelten  $EC_{50}$  von Amitriptylin, Clomipramin und Desipramin, Chlorpromazin, und Riluzol [51] waren jedoch bereits nach wenigen Stunden zu toxisch für die Zellen, was vermutlich auf Off-Target-Effekte zurückzuführen ist. Es handelt sich bei diesen Agonisten um bereits zugelassene Arzneistoffe, deren klinisch verwendete Konzentrationen teilweise deutlich unter den experimentell ermittelten  $EC_{50}$  für TPC2 lagen. So findet beispielsweise Riluzol Verwendung in der Klinik in Konzentrationen von 30 nM bis 4.11  $\mu$ M [131], die ermittelte  $EC_{50}$  für TPC2 lag bei 181  $\mu$ M. Wurden die Konzentrationen dieser Arzneistoffe so reduziert, dass sie von den Zellen über 72 Stunden toleriert worden sind, konnte kein Effekt auf die lysosomale Cholesterinakkumulation in MLIV-Patientenfibroblasten festgestellt werden. Somit konnte nur mit dem Agonisten TPC2-A1-P ein positiver Effekt auf die Cholesterinakkumulation in den Fibroblasten beobachtet werden. In einem nächsten Schritt ist zu überprüfen, ob sich diese Ergebnisse auch in den von MLIV besonders betroffen

Zellen wie Neuronen oder Zellen des zentralen Nervensystems wiederholen lassen und ob invivo Auswirkungen auf das MLIV-Mausmodel zu beobachten sind. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von TPC2 mit dem Agonisten TPC2-A1-P ein neues vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Reduzierung von lysosomalem Speichermaterial und somit möglichweise für Behandlung von MLIV darstellt.

Die Anwendung des TPC2-Agonisten für andere Erkrankungen, die auf einen Defekt des lysosomalen Transportsystems zurückzuführen sind, ist ebenfalls denkbar. Dazu zählen neben weiteren lysosomalen Speicherkrankheiten auch verschiedene neurodegenerative Erkrankungen [129, 132]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Steigerung der lysosomalen Exozytose bei Multiplem Sulfatase-Mangel, bei Mukopolysaccharidose IIIA oder bei Morbus Parkinson positive Auswirkungen auf den Abbau von angesammeltem Zellmaterial hat [133, 134]. Es wäre interessant, den Agonisten in diesen Zellmodellen zu testen, jedoch sind weitere Untersuchungen zur Aufklärung der genauen Aktivierungsmechanismen des Kanals und der Auswirkungen des Agonisten auf die verschiedenen lysosomalen Funktionen nötig.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sich die beiden Ionenkanäle TPC2 und TRPML1 als zukunftsträchtige therapeutische Angriffspunkte für eine Vielzahl von im Moment noch unbehandelbaren Krankheiten präsentieren. Aufgrund ihrer zentralen Lage in der Membran des Lysosoms und der damit einhergehenden Beteiligung an vielen zellulären Prozessen sind sie nicht nur für die Behandlung von MLIV interessant, sondern auch für andere Erkrankungen mit lysosomal-autophagosomaler Beteiligung. Dazu zählen beispielweise Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Erkrankungen wie Krebs und Autoimmunerkrankungen, bei denen das Lysosom wichtige physiologische Funktionen erfüllt [34, 129, 135, 136].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im menschlichen Genom zahlreiche genetische Variationen in den beiden Ionenkanälen auftreten. Es ist bekannt, dass selbst einfache Veränderungen an der Proteinsequenz komplexe funktionelle Folgen haben können. Dennoch wurden in den bisher veröffentlichten Publikationen zur Untersuchung des Ionenkanals TPC2 sehr unterschiedliche polymorphe Varianten verwendet [71]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die entdeckten genetischen Variationen einen erheblichen Einfluss auf die physiologische Funktion der beiden Ionenkanäle und somit Auswirkungen auf die Funktionalität des gesamten Lysosoms haben können. Dies sollte bei der zukünftigen Erforschung der Kanäle und der Entwicklung von Therapien mit lysosomalem Ansatzpunkt bedacht werden.

#### Literaturverzeichnis

[1] Böck J, Krogsaeter E, Passon M, Chao YK, Sharma S, Grallert H, et al. *Human genome diversity data reveal that L564P is the predominant TPC2 variant and a prerequisite for the blond hair associated M484L gain-of-function effect.* PLoS Genet. 2021;**17**(1):e1009236.

- [2] National Human Genome Research Institute. International Consortium Completes Human Genome Project [Internetseite]. 14. April 2003 [abgerufen am 17.11.2021]. Verfügbar auf: <a href="https://www.genome.gov/11006929/2003-release-international-consortium-completes-hgp">www.genome.gov/11006929/2003-release-international-consortium-completes-hgp</a>.
- [3] Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bzikadze AV, Mikheenko A, et al. *The complete sequence of a human genome*. bioRxiv. 2021:2021.05.26.445798.
- [4] National Human Genome Research Institute. The Cost of Sequencing a Human Genome [Internetseite]. 1. November 2021 [abgerufen am 17.11.2021]. Verfügbar auf: www.genome.gov/sequencingcosts.
- [5] Boyd SD. *Diagnostic Applications of High-Throughput DNA Sequencing*. Annu Rev Pathol. 2013;**8**:381-410.
- [6] Schwarze K, Buchanan J, Fermont JM, Dreau H, Tilley MW, Taylor JM, et al. The complete costs of genome sequencing: a microcosting study in cancer and rare diseases from a single center in t\*he United Kingdom. Genetics in Medicine. 2020;**22**(1):85-94.
- [7] Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. *A global reference for human genetic variation*. Nature. 2015;**526**(7571):68-74.
- [8] Mallick S, Li H, Lipson M, Mathieson I, Gymrek M, Racimo F, et al. *The Simons Genome Diversity Project: 300 genomes from 142 diverse populations*. Nature. 2016;**538**(7624):201-6.
- [9] Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. *The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans*. Nature. 2020;**581**(7809):434-43.
- [10] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature. 2001;**409**(6822):860-921.
- [11] Seplyarskiy VB, Sunyaev S. *The origin of human mutation in light of genomic data*. Nat Rev Genet. 2021;**22**(10):672-86.
- [12] National Human Genome Research Institute. RELEASE: NCBI dbSNP Build 155 [Internetseite]. 16. Juni 2021 [abgerufen am 17.11.2021]. Verfügbar auf: www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\_summary.cgi?view+summary=view+summary&build\_id=155.
- [13] Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. *A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation*. Genome Res. 1998;**8**(12):1229-31.

[14] Hysi PG, Valdes AM, Liu F, Furlotte NA, Evans DM, Bataille V, et al. *Genome-wide association meta-analysis of individuals of European ancestry identifies new loci explaining a substantial fraction of hair color variation and heritability*. Nat Genet. 2018;**50**(5):652-6.

- [15] Yengo L, Sidorenko J, Kemper KE, Zheng Z, Wood AR, Weedon MN, et al. *Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry.* Hum Mol Genet. 2018;**27**(20):3641-9.
- [16] Fellay J, Shianna KV, Ge D, Colombo S, Ledergerber B, Weale M, et al. *A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1.* Science. 2007;**317**(5840):944-7.
- [17] Abou-Khalil B, Auce P, Avbersek A, Bahlo M, Balding DJ, Bast T, et al. *Genome-wide mega-analysis identifies 16 loci and highlights diverse biological mechanisms in the common epilepsies*. Nat Commun. 2018;**9**(1):5269.
- [18] Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. *Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact.* Drug Metab Rev. 2009;**41**(2):89-295.
- [19] Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, Takahashi A, Kubo M, Shirakata Y, et al. Genome-wide association study identifies HLA-A\*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. Hum Mol Genet. 2011;**20**(5):1034-41.
- [20] van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. *The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement*. Pharmacogenetics. 2001;**11**(4):287-91.
- [21] De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. *Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue*. Biochem J. 1955;**60**(4):604-17.
- [22] Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. Annu Rev Physiol. 2015;77:57-80.
- [23] Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;**21**(2):101-18.
- [24] Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;**14**(5):283-96.
- [25] Matz KM, Guzman RM, Goodman AG. *The Role of Nucleic Acid Sensing in Controlling Microbial and Autoimmune Disorders*. Int Rev Cell Mol Biol. 2019;**345**:35-136.
- [26] Reddy A, Caler EV, Andrews NW. *Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes*. Cell. 2001;**106**(2):157-69.

[27] Cuajungco MP, Kiselyov K. *The mucolipin-1 (TRPML1) ion channel, transmembrane-163 (TMEM163) protein, and lysosomal zinc handling.* Front Biosci (Landmark Ed). 2017;**22**:1330-43.

- [28] Saxton RA, Sabatini DM. *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease*. Cell. 2017;**168**(6):960-76.
- [29] Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. Cell. 2010;**141**(2):290-303.
- [30] Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, et al. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. Nat Cell Biol. 2011;**13**(4):453-60.
- [31] Hao F, Kondo K, Itoh T, Ikari S, Nada S, Okada M, et al. *Rheb localized on the Golgi membrane activates lysosome-localized mTORC1 at the Golgi–lysosome contact site*. J Cell Sci. 2018;**131**(3):jcs208017.
- [32] Wong YC, Ysselstein D, Krainc D. *Mitochondria–lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis*. Nature. 2018;**554**(7692):382-6.
- [33] Kumar N, Leonzino M, Hancock-Cerutti W, Horenkamp FA, Li P, Lees JA, et al. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. J Cell Biol. 2018;**217**(10):3625-39.
- [34] Lawrence RE, Zoncu R. *The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control.* Nat Cell Biol. 2019;**21**(2):133-42.
- [35] Li X, Rydzewski N, Hider A, Zhang X, Yang J, Wang W, et al. *A molecular mechanism to regulate lysosome motility for lysosome positioning and tubulation*. Nat Cell Biol. 2016;**18**(4):404-17.
- [36] Huotari J, Helenius A. *Endosome maturation*. EMBO J. 2011;**30**(17):3481-500.
- [37] Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. Annu Rev Med. 2015;**66**(1):471-86.
- [38] Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tifft CJ. Lysosomal storage diseases. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):27.
- [39] Schwake M, Schröder B, Saftig P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. Traffic. 2013;**14**(7):739-48.
- [40] Li P, Gu M, Xu H. Lysosomal Ion Channels as Decoders of Cellular Signals. Trends Biochem Sci. 2018.
- [41] Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P. *The proteome of lysosomes*. Proteomics. 2010;**10**(22):4053-76.

[42] She J, Guo J, Chen Q, Zeng W, Jiang Y, Bai X-c. Structural insights into the voltage and phospholipid activation of the mammalian TPC1 channel. Nature. 2018;556:130.

- [43] She J, Zeng W, Guo J, Chen Q, Bai X-c, Jiang Y. Structural mechanisms of phospholipid activation of the human TPC2 channel. eLife. 2019;8:e45222.
- [44] Rahman T, Cai X, Brailoiu GC, Abood ME, Brailoiu E, Patel S. *Two-pore channels provide insight into the evolution of voltage-gated Ca2+ and Na+channels*. Sci Signal. 2014;**7**(352):ra109.
- [45] Ambrosio AL, Boyle JA, Aradi AE, Christian KA, Di Pietro SM. *TPC2 controls pigmentation by regulating melanosome pH and size*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016;**113**(20):5622-7.
- [46] Calcraft PJ, Ruas M, Pan Z, Cheng X, Arredouani A, Hao X, et al. *NAADP* mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. Nature. 2009;**459**(7246):596-600.
- [47] Wang X, Zhang X, Dong XP, Samie M, Li X, Cheng X, et al. *TPC proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes*. Cell. 2012;**151**(2):372-83.
- [48] Zong X, Schieder M, Cuny H, Fenske S, Gruner C, Rötzer K, et al. *The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca(2+)-release from lysosomal stores.* Pflugers Arch. 2009;**458**(5):891-9.
- [49] Patel S. Function and dysfunction of two-pore channels. Sci Signal. 2015;**8**(384):re7.
- [50] Gerndt S, Chen CC, Chao YK, Yuan Y, Burgstaller S, Scotto Rosato A, et al. *Agonist-mediated switching of ion selectivity in TPC2 differentially promotes lysosomal function.* Elife. 2020;**9**:e54712.
- [51] Zhang X, Chen W, Li P, Calvo R, Southall N, Hu X, et al. *Agonist-specific voltage-dependent gating of lysosomal two-pore Na(+) channels*. Elife. 2019;**8**:e51423.
- [52] Cang C, Zhou Y, Navarro B, Seo YJ, Aranda K, Shi L, et al. *mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na(+) channels to adapt to metabolic state*. Cell. 2013;**152**(4):778-90.
- [53] Rosato AS, Tang R, Grimm C. *Two-pore and TRPML cation channels:* Regulators of phagocytosis, autophagy and lysosomal exocytosis. Pharmacol Ther. 2021;**220**:107713.
- [54] Nguyen ON, Grimm C, Schneider LS, Chao YK, Atzberger C, Bartel K, et al. Two-Pore Channel Function Is Crucial for the Migration of Invasive Cancer Cells. Cancer Res. 2017;**77**(6):1427-38.

[55] Jin X, Zhang Y, Alharbi A, Hanbashi A, Alhoshani A, Parrington J. *Targeting Two-Pore Channels: Current Progress and Future Challenges*. Trends Pharmacol Sci. 2020;**41**(8):582-94.

- [56] Notomi T, Kuno M, Hiyama A, Nozaki T, Ohura K, Ezura Y, et al. *Role of lysosomal channel protein TPC2 in osteoclast differentiation and bone remodeling under normal and low-magnesium conditions*. J Biol Chem. 2017;**292**(51):20998-1010.
- [57] Favia A, Desideri M, Gambara G, D'Alessio A, Ruas M, Esposito B, et al. *VEGF-induced neoangiogenesis is mediated by NAADP and two-pore channel-2-dependent Ca2+ signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;**111**(44):E4706-15.
- [58] Li Y, Schön C, Chen C-C, Yang Z, Liegl R, Murenu E, et al. *TPC2 promotes choroidal angiogenesis and inflammation in a mouse model of neovascular age-related macular degeneration*. Life Sci Alliance. 2021;**4**(8):e202101047.
- [59] Davis LC, Morgan AJ, Galione A. *NAADP-regulated two-pore channels drive phagocytosis through endo-lysosomal Ca(2+) nanodomains, calcineurin and dynamin.* EMBO J. 2020;**39**(14):e104058.
- [60] Grimm C, Chen CC, Wahl-Schott C, Biel M. *Two-Pore Channels: Catalyzers of Endolysosomal Transport and Function*. Front Pharmacol. 2017;**8**:45.
- [61] Grimm C, Holdt LM, Chen CC, Hassan S, Müller C, Jörs S, et al. *High susceptibility to fatty liver disease in two-pore channel 2-deficient mice.* Nat Commun. 2014;**5**:4699.
- [62] Arredouani A, Ruas M, Collins SC, Parkesh R, Clough F, Pillinger T, et al. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) and Endolysosomal Two-pore Channels Modulate Membrane Excitability and Stimulus-Secretion Coupling in Mouse Pancreatic β Cells. J Biol Chem. 2015;290(35):21376-92.
- [63] Gunaratne GS, Yang Y, Li F, Walseth TF, Marchant JS. *NAADP-dependent Ca(2+) signaling regulates Middle East respiratory syndrome-coronavirus pseudovirus translocation through the endolysosomal system*. Cell Calcium. 2018;**75**:30-41.
- [64] Sakurai Y, Kolokoltsov AA, Chen C-C, Tidwell MW, Bauta WE, Klugbauer N, et al. Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. Science 2015;**347**(6225):995-8.
- [65] Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. Nat Commun. 2020;**11**(1):1620.
- [66] Hockey LN, Kilpatrick BS, Eden ER, Lin-Moshier Y, Brailoiu GC, Brailoiu E, et al. *Dysregulation of lysosomal morphology by pathogenic LRRK2 is corrected by TPC2 inhibition*. J Cell Sci. 2015;**128**(2):232-8.

[67] Patel S, Kilpatrick BS. *Two-pore channels and disease*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2018;**1865**(11 Pt B):1678-86.

- [68] Fan Y, Li X, Zhang Y, Fan X, Zhang N, Zheng H, et al. *Genetic Variants of TPCN2 Associated with Type 2 Diabetes Risk in the Chinese Population*. PloS one. 2016;**11**(2):e0149614.
- [69] Alharbi AF, Parrington J. Endolysosomal Ca(2+) Signaling in Cancer: The Role of TPC2, From Tumorigenesis to Metastasis. Front Cell Dev Biol. 2019;**7**:302.
- [70] Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Jakobsdottir M, et al. *Nat Genet*. 2008;**40**(7):835-7.
- [71] Chao YK, Schludi V, Chen CC, Butz E, Nguyen ONP, Muller M, et al. *TPC2* polymorphisms associated with a hair pigmentation phenotype in humans result in gain of channel function by independent mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017;**114**(41):E8595-602.
- [72] Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youlten SE, et al. *Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis*. Nat Genet. 2017;**49**(10):1468-75.
- [73] Morris JA, Kemp JP, Youlten SE, Laurent L, Logan JG, Chai RC, et al. *An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice*. Nat Genet. 2019;**51**(2):258-66.
- [74] Alharbi AF, Parrington J. The role of genetic polymorphisms in endolysosomal ion channels TPC2 and P2RX4 in cancer pathogenesis, prognosis, and diagnosis: a genetic association in the UK Biobank. NPJ Genom Med. 2021;6(1):58.
- [75] Schmiege P, Fine M, Blobel G, Li X. *Human TRPML1 channel structures in open and closed conformations*. Nature. 2017;**550**(7676):366-70.
- [76] Dong XP, Cheng X, Mills E, Delling M, Wang F, Kurz T, et al. *The type IV mucolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel.* Nature. 2008;**455**(7215):992-6.
- [77] Dong XP, Shen D, Wang X, Dawson T, Li X, Zhang Q, et al. *Pl(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome*. Nat Commun. 2010;1(4):38.
- [78] Zhang X, Cheng X, Yu L, Yang J, Calvo R, Patnaik S, et al. *MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy*. Nat Commun. 2016;**7**:12109.
- [79] Li M, Zhang WK, Benvin NM, Zhou X, Su D, Li H, et al. *Structural basis of dual Ca2+/pH regulation of the endolysosomal TRPML1 channel*. Nat Struct Mol Biol. 2017;**24**(3):205-13.

[80] Venkatachalam K, Wong C-O, Zhu MX. *The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function*. Cell Calcium. 2015;**58**(1):48-56.

- [81] Sahoo N, Gu M, Zhang X, Raval N, Yang J, Bekier M, et al. *Gastric Acid Secretion from Parietal Cells Is Mediated by a Ca(2+) Efflux Channel in the Tubulovesicle*. Dev Cell. 2017;**41**(3):262-73.e6.
- [82] Cuajungco MP, Basilio LC, Silva J, Hart T, Tringali J, Chen C-C, et al. *Cellular zinc levels are modulated by TRPML1-TMEM163 interaction*. Traffic. 2014;**15**(11):1247-65.
- [83] Minckley TF, Zhang C, Fudge DH, Dischler AM, LeJeune KD, Xu H, et al. Subnanomolar sensitive GZnP3 reveals TRPML1-mediated neuronal Zn(2+) signals. Nat Commun. 2019;**10**(1):4806.
- [84] Erkhembaatar M, Gu DR, Lee SH, Yang YM, Park S, Muallem S, et al. Lysosomal Ca(2+) Signaling is Essential for Osteoclastogenesis and Bone Remodeling. J Bone Miner Res. 2017;32(2):385-96.
- [85] Spix B, Chao YK, Abrahamian C, Chen CC, Grimm C. *TRPML Cation Channels in Inflammation and Immunity*. Front Immunol. 2020;**11**:225.
- [86] Chao YK, Chang SY, Grimm C. *Endo-Lysosomal Cation Channels and Infectious Diseases*. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020. p. 1-18.
- [87] Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, et al. *Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update*. Hum Mutat. 2003;**21**(6):577-81.
- [88] Raas-Rothschild A, Bargal R, DellaPergola S, Zeigler M, Bach G. *Mucolipidosis type IV: the origin of the disease in the Ashkenazi Jewish population*. Eur J Hum Genet. 1999;**7**(4):496-8.
- [89] Misko A GY, Goldin E, et al., *Mucolipidosis IV*. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington; 2005, Update: 11. Februar 2021.
- [90] Schiffmann R, Mayfield J, Swift C, Nestrasil I. Quantitative neuroimaging in mucolipidosis type IV. Mol Genet Metab. 2014;**111**(2):147-51.
- [91] Jezela-Stanek A, Ciara E, Stepien KM. Neuropathophysiology, Genetic Profile, and Clinical Manifestation of Mucolipidosis IV-A Review and Case Series. Int J Mol Sci. 2020;**21**(12):4564.
- [92] Misko A, Wood L, Kiselyov K, Slaugenhaupt S, Grishchuk Y. *Progress in elucidating pathophysiology of mucolipidosis IV.* Neuroscience Letters. 2021;**755**:135944.
- [93] Kenyon KR, Maumenee IH, Green WR, Libert J, Hiatt RL. *Mucolipidosis IV: Histopathology of Conjunctiva, Cornea, and Skin.* Arch Ophthalmol. 1979;**97**(6):1106-11.

- [94] Bach G. Mucolipidosis type IV. Mol Genet Metab. 2001;73(3):197-203.
- [95] Chen C-C, Keller M, Hess M, Schiffmann R, Urban N, Wolfgardt A, et al. *A small molecule restores function to TRPML1 mutant isoforms responsible for mucolipidosis type IV.* Nat Commun. 2014;**5**(1):4681.
- [96] Yamaguchi S, Jha A, Li Q, Soyombo AA, Dickinson GD, Churamani D, et al. Transient receptor potential mucolipin 1 (TRPML1) and two-pore channels are functionally independent organellar ion channels. J Biol Chem. 2011;**286**(26):22934-42.
- [97] Jaślan D, Böck J, Krogsaeter E, Grimm C. *Evolutionary Aspects of TRPMLs and TPCs*. Int J Mol Sci. 2020;**21**(11).
- [98] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. Mol Biol Evol. 2018;**35**(6):1547-9.
- [99] Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. Nucleic Acids Res. 2018;**46**(D1):D1062-7.
- [100] Chen C-C, Cang C, Fenske S, Butz E, Chao Y-K, Biel M, et al. *Patch-clamp technique to characterize ion channels in enlarged individual endolysosomes*. Nat Protoc. 2017;**12**(8):1639-58.
- [101] Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. *The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019.* Nucleic Acids Res. 2019;**47**(D1):D1005-12.
- [102] Type 2 Diabetes Knowledge Portal [Internet]. Common Metabolic Diseases Knowledge Portal project. 2020 [abgerufen am 18 März 2020]. Verfügbar auf: https://t2d.hugeamp.org/.
- [103] Chinn S. A simple method for converting an odds ratio to effect size for use in meta-analysis. Stat Med. 2000;**19**(22):3127-31.
- [104] Netcharoensirisuk P, Abrahamian C, Tang R, Chen C-C, Rosato AS, Beyers W, et al. Flavonoids increase melanin production and reduce proliferation, migration and invasion of melanoma cells by blocking endolysosomal/melanosomal TPC2. Sci Rep. 2021;11(1):8515.
- [105] Shen D, Wang X, Li X, Zhang X, Yao Z, Dibble S, et al. *Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release*. Nat Commun. 2012;**3**(1):731.
- [106] Pryor PR, Reimann F, Gribble FM, Luzio JP. *Mucolipin-1 is a lysosomal membrane protein required for intracellular lactosylceramide traffic.* Traffic. 2006;**7**(10):1388-98.

[107] Cai X, Patel S. Degeneration of an intracellular ion channel in the primate lineage by relaxation of selective constraints. Mol Biol Evol. 2010;27(10):2352-9.

- [108] Gudbjartsson DF, Helgason H, Gudjonsson SA, Zink F, Oddson A, Gylfason A, et al. *Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population*. Nat Genet. 2015:**47**(5):435-44.
- [109] Risch N, Merikangas K. *The future of genetic studies of complex human diseases*. Science. 1996;**273**(5281):1516-7.
- [110] Berman ER, Livni N, Shapira E, Merin S, Levij IS. Congenital corneal clouding with abnormal systemic storage bodies: A new variant of mucolipidosis. J Pediatr. 1974;84(4):519-26.
- [111] Hayashi T, Hosono K, Kubo A, Kurata K, Katagiri S, Mizobuchi K, et al. Long-term observation of a Japanese mucolipidosis IV patient with a novel homozygous p.F313del variant of MCOLN1. Am J Med Genet A. 2020;**182**(6):1500-5.
- [112] Tüysüz B, Goldin E, Metin B, Korkmaz B, Yalçinkaya C. *Mucolipidosis type IV* in a Turkish boy associated with a novel MCOLN1 mutation. Brain Dev. 2009;**31**(9):702-5.
- [113] Chaer L, Harissi-Dagher M, Soucy J-F, Ellezam B, Hamel P. *Mucolipidosis type IV in a child*. Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus. 2018;**22**(6):469-71.
- [114] AlBakheet A, Qari A, Colak D, Rasheed A, Kaya N, Al-Sayed M. *A novel mutation in a large family causes a unique phenotype of Mucolipidosis IV*. Gene. 2013;**526**(2):464-6.
- [115] Hengel H, Buchert R, Sturm M, Haack TB, Schelling Y, Mahajnah M, et al. *First-line exome sequencing in Palestinian and Israeli Arabs with neurological disorders is efficient and facilitates disease gene discovery.* Eur J Hum Genet. 2020;**28**(8):1034-43.
- [116] Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. *Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing*. Nat Commun. 2017;**8**(1):15824.
- [117] Marquardt T. Laborbefund der MLIV-Patientin vom 26.09.2019. Universitätsklinikum Münster: Stoffwechselambulanz; 16. Dezember 2019.
- [118] Chen C-S, Bach G, Pagano RE. Abnormal transport along the lysosomal pathway in Mucolipidosis, type IV disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;**95**(11):6373-8.
- [119] Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, et al. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. Cell. 2011;**145**(3):398-409.

[120] Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, et al. *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. Neuron. 2004;**44**(4):601-7.

- [121] Grolmusz VK, Bozsik A, Papp J, Patócs A. Germline Genetic Variants of Viral Entry and Innate Immunity May Influence Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection: Toward a Polygenic Risk Score for Risk Stratification. Front Immunol. 2021;12:653489.
- [122] Anastassopoulou C, Gkizarioti Z, Patrinos GP, Tsakris A. *Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity.* Hum Genomics. 2020;**14**(1):40.
- [123] Müller M, Gerndt S, Chao YK, Zisis T, Nguyen ONP, Gerwien A, et al. *Gene editing and synthetically accessible inhibitors reveal role for TPC2 in HCC cell proliferation and tumor growth.* Cell Chem Biol. 2021;**28**(8):1119-31.e27.
- [124] Penny CJ, Vassileva K, Jha A, Yuan Y, Chee X, Yates E, et al. *Mining of Ebola virus entry inhibitors identifies approved drugs as two-pore channel pore blockers*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2019;**1866**(7):1151-61.
- [125] Bargal R, Avidan N, Olender T, Ben Asher E, Zeigler M, Raas-Rothschild A, et al. *Mucolipidosis type IV: novel MCOLN1 mutations in Jewish and non-Jewish patients and the frequency of the disease in the Ashkenazi Jewish population*. Hum Mutat. 2001;**17**(5):397-402.
- [126] Bargal R, Avidan N, Ben-Asher E, Olender Z, Zeigler M, Frumkin A, et al. *Identification of the gene causing mucolipidosis type IV.* Nat Genet. 2000;**26**(1):118-23.
- [127] Segal P, Pode-Shakked B, Raas-Rothschild A. *Elucidating the behavioral phenotype of patients affected with mucolipidosis IV: What can we learn from the parents?* Eur J Med Genet. 2017;**60**(6):340-4.
- [128] Zhang S, Li N, Zeng W, Gao N, Yang M. Cryo-EM structures of the mammalian endo-lysosomal TRPML1 channel elucidate the combined regulation mechanism. Protein Cell. 2017;8(11):834-47.
- [129] Bonam SR, Wang F, Muller S. *Lysosomes as a therapeutic target*. Nat Rev Drug Discov. 2019;**18**(12):923-48.
- [130] Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. Nat Rev Drug Discov. 2018;**17**(2):133-50.
- [131] Grant P, Farmer C, Song J, Kish T, Swedo S. *Riluzole Serum Concentration in Pediatric Patients Treated for Obsessive-Compulsive Disorder.* J Clin Psychopharmacol. 2017;**37**(6):713-6.
- [132] Fraldi A, Klein AD, Medina DL, Settembre C. *Brain Disorders Due to Lysosomal Dysfunction*. Annu Rev Neurosci. 2016;**39**(1):277-95.

[133] Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, et al. *Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance*. Developmental cell. 2011;**21**(3):421-30.

- [134] Tsunemi T, Perez-Rosello T, Ishiguro Y, Yoroisaka A, Jeon S, Hamada K, et al. *Increased Lysosomal Exocytosis Induced by Lysosomal Ca*(2+) *Channel Agonists Protects Human Dopaminergic Neurons from α-Synuclein Toxicity*. J Neurosci. 2019;**39**(29):5760-72.
- [135] Tong BC-K, Wu AJ, Huang AS, Dong R, Malampati S, Iyaswamy A, et al. Lysosomal TPCN (two pore segment channel) inhibition ameliorates beta-amyloid pathology and mitigates memory impairment in Alzheimer disease. Autophagy. 2021:1-19.
- [136] Faris P, Shekha M, Montagna D, Guerra G, Moccia F. *Endolysosomal Ca2+ Signalling and Cancer Hallmarks: Two-Pore Channels on the Move, TRPML1 Lags Behind!* Cancers. 2019;**11**(1):27.

Anhang 64

# **Anhang**

### Amplifizierungsprimer

TPC2- SNP	Primer vorwärts	Primer rückwärts	Fragmentgröße [bp]
V219I	GCCCCAGGGTTTCATTTGT	GAGTCCGCACATGGGTTAGG	427
K376R	GGTGAAGTCAGTTTGCGCC	AAGGTGAGCGCCCTCGAA	444
G387D	GCCATGATGGAGGTACCCG	GTTCCCCAGGTGATCAAGGG	381
M484L	GGTGTTCCTGGTGCTGGA	ACAGCCTCTAGTCCTCAGGG	393
L564P	GCCTGACAGGCTGTGTGG	ACTCCAGTGCATAACCCGCC	303
S681L	GTGCTCTTGCTTTGCTCATC	CGACTCTCCCATCAAAGTTCC	246
G734E	GGCCACCTACCAGATGACT	CGGACGTCACCTGCACAG	789

#### Mutageneseprimer

TPC2- SNP	Primer vorwärts	Primer rückwärts
V219I	CGGAAATGGCCAGCATCGGGCTGCTGCTG	GGCCAGCAGCCCGATGCTGGCCATTTC
	GCC	CG
K376R	GCTGGACAGCTCCCACAGACAGGCCATGA	CTCCATCATGGCCTGTCTGTGGGAGCTGTC
	TGGAG	CAGC
G387D	AAGGTGCGTTCCTACGACAGTGTTCTGCT	GCTGACAGCA
	GTCAGC	GAACACTGTCGTAGGAACGCACCTT
M484L	GTGTACTACCTGTTGGAGCTGCTGCTCAA	GGCAAAGACCTTGAGCAGCAGCTCCAACAG
	GGTCTTTGCC	GTAGTACAC
L564P	GCGTATCATCCCCAGCATGAAGCTGATGG	GGCCACCACGGCCATCAGCTTCATGCTGGG
	CCGTGGTGGCC	GATGATACGC
S681L	GTGGTGGCTGGTGTTGTCTGTCATCTGGG	CCCAGATGACAGACACACCAGCCACCAC
G734E	GGATATTCTGGAGGAGCCCGAGGAGGATG	CTCTGTGAGCTCATCCTCCTCGGGCTCCTCC
	AGCTCACAGAG	AGAATATCC
L564A	ATCATCCCCAGCATGAAGGCGATGGCCGT	CACCACGGCCATCGCCTTCATGCTGGGGAT
	GGTG	GAT
L564G	ATCATCCCCAGCATGAAGGGGATGGCCGT	CACCACGGCCATCCCCTTCATGCTGGGGAT
	GGTG	GAT
M562P	GCGTATCATCCCCAGCCCGAAGCTGATGG	CACGGCCATCAGCTTCGGGCTGGGGATGAT
	CCGTG	ACGC
K563P	TATCATCCCCAGCATGCCGCTGATGGCCG	CACCACGGCCATCAGCGGCATGCTGGGGAT
	TGGTG	GATA
M565P	CCAGCATGAAGCTGCCGGCCGTGGTGGC	TGGCCACCACGGCCGGCAGCTTCATGCTGG
	CA	

Danksagung 65

## **Danksagung**

Nach über drei Jahren am Walther-Straub-Institut ist es Zeit Danke zu sagen:

Danke an meinen Betreuer Christian für die vielen Freiheiten in Bezug auf Themenstellung und Arbeitsweise, die ausgewogene Mischung aus Forderung und Förderung, und für den konstanten Fluss an wissenschaftlichem Input.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Sapna Sharma vom Helmholtz Zentrum und Prof. Dr. Marc Freichel von der Universität Heidelberg für den inspirierenden wissenschaftlichen Austausch. Ebenso der deutschen MLIV-Patientin für ihre gespendeten Fibroblasten und ihrer Familie für ihre große Offenheit.

Allen Mitgliedern des Grimm Labs der letzten Jahre für die schöne Zeit, den respektvollen Umgang und den Spaß im "Office": Anna, Dawid, Barbara, Einar, Rachel, Eva-Maria, Irene, Marcel, Veronika, Stefan, Iria, Alina, Ponsawan und Zagorka. Mein besonderer Dank geht an Yu-Kai Chao für die geduldige Einführung in die Welt des Patch-Clamps und das stets bereitwillige Beantworten sämtlicher Nachfragen und an Carla, HR-Person und Reiseführerin.

Dem Labor Mederos y Schnitzler in der Besetzung vom Sommer 2018 für den Crash-Kurs in Molekularbiologie, Zellkultur und das wissenschaftliche Arbeiten. Insbesondere Serap Erdogmus für deine mentale Unterstützung und deine Ehrlichkeit.

Allen übrigen Kolleginnen und Kollegen am Walther-Straub-Institut für den stets kollegialen Umgang, die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima, trotz eineinhalb Jahren Ausnahmezustands.

Mein größter Dank geht an meine Familie und an Sebastian: Ohne euch wären die letzten drei Jahre nicht möglich gewesen!