

Aus dem Friedrich-Baur-Institut  
an der Neurologische Klinik und Poliklinik  
Klinik der Universität München

Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dietrich, FANA, FEAN

# Morbus Pompe

## Messung der glykolytischen Aktivität an aus Urin gewonnenen Epithelzellen

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

vorgelegt von  
Anna Luisa Schulz  
aus Hagen  
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. Benedikt Schoser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Regina Ensenaer  
Prof. Dr. Christoph Auernhammer

Mitbetreuung durch den  
wissenschaftlichen Mitarbeiter: Dr. rer. med. Peter Meinke

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2023

**Meinen Eltern**

Ursula Elisabeth Schulz

Jörg Kastner

Jörg Ekkehard Brock

**und Großeltern**

Magret Kastner

Rudolf Kastner

Heidrun Tandler

Joachim Tandler

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
3.1	<i>Einführung.....</i>	4
3.2	<i>Historischer Rückblick .....</i>	5
3.3	<i>Inzidenz .....</i>	6
3.4	<i>Ätiologie und Pathogenese.....</i>	7
3.5	<i>Klinik .....</i>	9
3.5.1	Infantile Form (IOPD).....	10
3.5.2	Adulte Form (LOPD).....	10
3.6	<i>Diagnostik .....</i>	11
3.7	<i>Differentialdiagnosen.....</i>	15
3.8	<i>Therapie .....</i>	16
3.8.1	Symptomatische Therapie .....	16
3.8.2	Enzyersatztherapie .....	17
3.8.3	Weitere Therapieansätze.....	19
<b>4</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Untersuchungskollektiv.....</b>	<b>23</b>
5.1	<i>Normalkollektiv .....</i>	23
5.2	<i>Patientenkollektiv .....</i>	23
<b>6</b>	<b>Material .....</b>	<b>24</b>
6.1	<i>Verwendete Gerätschaften .....</i>	24
6.2	<i>Reagenzien, Lösungen und Chemikalien .....</i>	25
6.3	<i>Verwendete Kits.....</i>	25
6.4	<i>Zellkulturmedien .....</i>	26
<b>7</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>27</b>

7.1	<i>Urinprobengewinnung</i> .....	27
7.2	<i>Myoblastenprobengewinnung</i> .....	27
7.3	<i>Urinzellisolation</i> .....	29
7.4	<i>Beschichtungen</i> .....	29
7.5	<i>Zellkultur</i> .....	30
7.6	<i>Seahorse XFp Analyse</i> .....	30
7.6.1	<i>Einführung Seahorse XFp Analyse</i> .....	30
7.6.2	<i>Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer</i> .....	33
7.6.3	<i>Messung der glykolytischen Aktivität von Myoblasten mittels Seahorse XFp Analyzer</i> .....	35
<b>8</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
8.1	<i>Ergebnisse Urinprobengewinnung</i> .....	36
8.2	<i>Ergebnisse Urinzellisolation und Urinzellexpansion</i> .....	36
8.3	<i>Ergebnisse Seahorse XFp Messung mit Myoblasten</i> .....	46
8.4	<i>Ergebnisse Seahorse XFp Messung mit kultivierten Pompe-Urinepithelzellen</i> .....	50
8.5	<i>Ergebnisse Seahorse XFp Messungen aus dem nichtkultivierten Urinzellgemisch</i> .....	54
<b>9</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b> .....	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
<b>12</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>82</b>
<b>13</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
<b>14</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>90</b>
14.1	<i>Protokoll der Seahorse XFp Messung mit kultivierten Pompe-Urinepithelzellen</i> .....	90
14.2	<i>Ausführliche Ergebnisse der Seahorse XFp Messungen mit Urinzellgemischproben</i> .....	91
<b>15</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>105</b>
<b>16</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>106</b>

## 2 Abkürzungsverzeichnis

2-DG .....	2-Desoxy-Glucose
6MWT .....	6-Minuten-Gehtest
ATP .....	Adenosintriphosphat
BiPAP .....	bilevel positive airway pressure
CK .....	Serum-Kreatinkinase
CRIM-negativ .....	cross-reactive immunologic material negative
DBS .....	dried blood spot-Tests
ECAR .....	extracellular acidification rate
EMG .....	Elektromyographie
EET .....	Enzyersatztherapie
FEV .....	forciertes expiratorisches Volumen
GAA .....	acid alpha-glucosidase
Glc4 .....	Glucosetetrasaccharid
GOT .....	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT .....	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSD 2 .....	Glycogen storage disease Typ II
IOPD .....	infantile onset Pompe Disease
IPA) .....	International Pompe Association
LDH .....	Laktat-Dehydrogenase
LOPD .....	late onset Pompe Disease
moss-GAA .....	Moss kultivierter GAA
NADH .....	Nicotinamidadenindinukleotid
OCR .....	oxygen consumption rate

## 3 Einleitung

### 3.1 Einführung

Morbus Pompe ist eine multisystemische Stoffwechselerkrankung, welche in variabler klinischer Ausprägung tödlich verlaufen kann. Als Synonyme werden Glykogenose Typ II (Glycogen storage disease Typ II = GSD 2, OMIM # 232300) und saurer Maltase (acid alpha-glucosidase = GAA) Mangel verwendet. Ursache der Erkrankung sind autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im  $\alpha$ -Glucosidase-Gen (GAA), welches für das lysosomale Enzym saure  $\alpha$ -1,4-Glucosidase kodiert. Die verminderte Aktivität des Enzyms führt zur zunehmenden Akkumulation von Glykogen in Lysosomen, Anschwellung und Ruptur der Lysosomen in allen Geweben des menschlichen Körpers. Besonders betroffen sind Herz, Skelettmuskulatur, Leber und das Nervensystem (Hintze et al., 2020; Raben et al., 2012). Die mangelnde Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase führt zur Glykogenspeicherkrankheit, welche durch ein heterogenes Spektrum an klinischen Symptomen gekennzeichnet ist. Das klinische Spektrum reicht dabei von der Manifestation an Herz- und Skelettmuskulatur über Gliedergürtelmuskelschwäche, respiratorische Beschwerden bis sich als schwere multisystemisch manifestierende Erkrankung. Seit 2006 kann der Morbus Pompe durch eine Enzymersatztherapie (EET) mit rekombinant hergestellter Alglucosidase-alfa (Myozyme®) behandelt werden (European Medicines Agency, 2006; Schoser et al., 2017, S. 622).

Die saure  $\alpha$ -Glucosidase findet sich ubiquitär im menschlichen Körper, so wird das defekte Enzym bei an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen auch in Urinzellen exprimiert (Hirschhorn et al., 2001).

Der menschliche Harntrakt setzt sich aus zwei Nieren, zwei Ureteren, der Harnblase und der Urethra zusammen. Durch Filtration des Blutes in den Nierenkörperchen entstehen täglich ca. 180 Liter Primärharn, welcher an das Tubulussystem abgegeben und prozessiert wird. 99% des Primärharns werden rückresorbiert und 1/100 des Primärharnvolumens (ca. 1,8 Liter/Tag), werden als Endharn ausgeschieden (Welsch et al., 2010). Mit dem Endharn werden täglich 2000 bis 7000 Zellen des Harntraktes ausgeschieden (Zhou et al., 2012). Nach ihrem Genexpressionsprofil handelt es sich um Zellen aus dem Nierenepithel und dem Urothel (Tayhan et al., 2017; Zhou et al., 2012). Sutherland und Brain waren die Ersten, welche über die erfolgreiche Zellkultivierung aus dem abgestoßenen Zellgemisch aus Endharn publizierten (Sutherland et al., 1972).

Im Zuge der Pompe Erkrankung sind Stoffwechselforgänge der Zelle, u.a. die Glykolyse, gestört (Meinke et al., 2019). Für die Stoffwechselformen wurde der Seahorse XFP

Analyzer von Agilent Technologies verwendet. Mithilfe des Seahorse XFp Analyzer lässt sich die Glykolyse der Zellen in Echtzeit erfassen.

### **3.2 Historischer Rückblick**

Der Namensgeber des Morbus Pompe, der niederländische Pathologe Johannes Cassianus Pompe, publizierte 1932 in einem der ältesten medizinischen Journale der Welt über ein im Alter von sieben Monaten verstorbenes Mädchen mit Hypertrophie des Herzens und allgemeiner Muskelschwäche. In dem Artikel beschrieb er erstmals die für die damals unbekannte Glykogenose charakteristischen Autopsiebefunde von in Organen vakuolär angeordneten Glykogenspeicherungen (Pompe, 1932). Der deutsche Pathologe Putschar publizierte im gleichen Jahr eine identische Kasuistik (Putschar 1932).

Bald folgten weitere Fallberichte von verstorbenen Patienten mit Glykogenspeicherungen im Herz und anderen Organen (Bischof, 1932; Di Sant Agnese, 1950; Krivit, 1953; Putschar, 1932).

Im Jahr 1952 gelang es dem Ehepaar Gerty und Carl Cori den Abbauweg des Glykogens zu identifizieren und eine Gruppe von Erkrankungen mit Enzymdefekten im Glykogenstoffwechsel biochemisch zu charakterisieren, die Glykogenosen (Cori, 1952). Das fehlende Enzym für den heute bekannten Morbus Pompe konnte damals noch nicht identifiziert werden.

Wegweisend für die Auffindung des Enzyms war die Entdeckung und Beschreibung von ubiquitär im Körper vorkommenden, von Doppel-Membranen umgebenden Vakuolen mit hydrolytischen Enzymen und einem sauren pH, der Lysosomen, durch Christian de Duve und seine Mitarbeiter im Jahr 1955 (De Duve et al., 1955).

1963 wurde schließlich durch Henri-Géry Hers die intralysosomale  $\alpha$ -(1,4)-Glukosidase, die im sauren Milieu der Lysosomen Glukose aus Glykogen freisetzt, entdeckt. Hers und seinen Mitarbeitern gelang es in Gewebeproben von fünf an Morbus Pompe erkrankten Patienten den Mangel an  $\alpha$ -(1,4)-Glucosidase nachzuweisen und somit die klare Korrelation zwischen dem Enzymdefekt und den für den Morbus Pompe charakteristischen Glykogen-Ablagerungen zu beschreiben (Hers, 1963). Somit wurde der Morbus Pompe als erste lysosomale Speicherkrankheit beschrieben. Hers begann zudem mit der biochemischen Beschreibung der Varianz der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität welche sich in der klinischen Manifestation äußert. Er beschrieb



die Untersuchung einer Patientenprobe mit verminderter  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität bei klinisch fehlender Herzhypertrophie (Hers, 1963).

In den folgenden Jahren wurden Messungen der  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität bei Patienten verschiedenen Alters und klinischer Symptomatik durchgeführt und das klinische Spektrum über das klassisch infantile Erscheinungsbild durch die juvenile und adulte Verlaufsform des Morbus Pompe erweitert (Engel et al., 1968; Hudgson et al., 1968; Roth et al., 1967; Zellweger et al., 1965).

Erste Therapieansätze wurden 1967 mittels intravenöser Applikation des sauren  $\alpha$ -Glucosidase-haltigen Schimmelpilzes *Aspergillus niger* erprobt (Hug et al., 1967).

1979 erfolgte die Zuordnung des  $\alpha$ -Glucosidase-Gens zu Chromosom 17q25, wodurch Mutationsanalysen und Genotyp/Phänotyp-Korrelationen ermöglicht wurden (D'Ancona et al., 1979; Solomon et al., 1979).

1984 beschrieben Reuser et al., dass sie aus Rinderhoden gewonnene  $\alpha$ -Glucosidase mit einem Erkennungssignal für den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor der Zielzelle ausstatteten und so die verminderte Aktivität der  $\alpha$ -Glucosidase in entnommenen Fibroblasten von Pompe Patienten steigern konnten (A. J. Reuser et al., 1984).

Die erste rekombinante GAA wurde 1995 mittels Expression von  $\alpha$ -Glucosidase-cDNA in chinesischen Hamster-Ovarzellen gewonnen (Fuller et al., 1995). Am Menschen wurde die Enzymersatztherapie (EET) im Jahr 2000 durch Van den Hout et al. mit aus Kaninchenmilch gewonnener, rekombinanter  $\alpha$ -Glucosidase und 2001 durch Amalfitano et al. mit aus chinesischen Hamstero-varienzellen (CHO) gewonnener, rekombinanter GAA getestet. In beiden Studien wurde gute Verträglichkeit und klinische Besserung der Symptome beschrieben (Amalfitano et al., 2001; H. Van den Hout et al., 2000).

2006 wurde *alglucosidase alfa* zur Behandlung des Morbus Pompe für alle Altersstufen zugelassen (European Medicines Agency, 2006).

### **3.3 Inzidenz**

Die seltenen Glykogenspeichererkrankungen kommen in Europa mit einer Inzidenz von ca. 1 : 20.000 bis 1 : 25.000 Geburten vor. Morbus Pompe, die GSD2, ist mit ca. 15 % die häufigste aller bisher bekannten Muskelglykogenspeichererkrankungen. Abhängig von ethnischen und

geographischen Aspekten liegt die Inzidenz des Morbus Pompe bei 1 : 40.000 bis 1 : 300.000 Geburten (Hirschhorn & Reuser, 2001; Schoser, A 2007; van der Ploeg et al., 2008). Zur Epidemiologie des Morbus Pompe liegen in der Literatur keine einheitlichen Daten vor. Meistens wird die kombinierte Häufigkeit von infantiler (infantile onset Pompe Disease = IOPD) und adulter (late onset Pompe Disease = LOPD) mit 1:40.000/60.000 angegeben (Toscano et al., 2019).

### 3.4 Ätiologie und Pathogenese

Morbus Pompe zählt zu den Glykogenspeichererkrankungen und zu den lysosomalen Speicherkrankheiten. Ursächlich ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Pathomechanismen: pathologische Glykogenspeicherung durch Mutationen im  $\alpha$ -Glukosidase-Gen (D'Ancona et al., 1979; Schoser et al., 2007; Solomon et al., 1979), Störung der Autophagie (Lim et al., 2015; Myerowitz et al., 2021; Yang et al., 2010), Veränderungen der Calcium-Homöostase, oxidativer Stress und mitochondriale Veränderungen (Kohler et al., 2018). Einige Pathomechanismen sind zum aktuellen Forschungszeitpunkt genau beschrieben, andere bedürfen weiterer Forschung damit ein tieferes und umfassenderes Verständnis des Morbus Pompe entwickelt wird.

Bis heute sind mehrere hundert ursächliche Mutationen in der Chromosomenregion 17q25.2-q25.3 bekannt (Hoefsloot et al., 1990; Kuo et al., 1996). Eine Datenbank von gemeldeten Mutationen wird von dem Pompe Center der Erasmus Universität von Rotterdam geführt (Pompe Center, 2019). Die genetische Veränderung resultiert in einer vollständig bis teilweise aufgehobenen Aktivität des codierenden Enzyms, der lysosomalen sauren  $\alpha$ -Glukosidase. Die Erkrankung ist autosomal rezessiv, Symptome manifestieren sich nur wenn beide Allele ursächliche Mutationen tragen (A. Reuser et al., 2021). Das Enzym findet sich ubiquitär im menschlichen Körper u.a. in Fibroblasten, Lymphozyten, Muskelzellen und im Urinepithel (Hirschhorn & Reuser, 2001).

Das funktionsfähige Enzym spaltet bei einem pH-Optimum von 3,7 bis 4,5,  $\alpha$ -1,4- und  $\alpha$ -1,6-glykosidische Bindungen in Maltose, Oligosaccharide und Glykogen wodurch Glukose hydrolysiert wird (Kishnani et al., B 2006).

Zur Energiegewinnung kann Glykogen zu Glukose abgebaut werden, was im Zuge der Glykolyse im Zytoplasma der Zelle abläuft. Ein Teil des Glykogens gelangt jedoch über den Prozess der Autophagie in den Lysosomen, wo Glykogen durch die  $\alpha$ -Glukosidase zu Glukose hydrolisiert wird (A. Reuser & Schoser, 2021).

Eine verminderte oder fehlende Aktivität der  $\alpha$ -Glukosidase führt zu überwiegend intralysosomaler Glykogenspeicherung in Skelettmuskel, Herz, Leber, zentralem - und peripherem Nervensystem, wobei die genauen Einzelheiten der pathophysiologischen Kaskade des Enzymdefekts nicht abschließend geklärt sind. In Muskelfasern führt die Glykogenspeicherung zu einer Störung des kontraktiven Apparats, was in einer Abnahme der muskulären Kraft und Leistung resultiert (Schoser, A 2007).

Lange wurde für den Strukturverlust der Muskeln und die abnehmende Muskelkraft als zugrundeliegender Pathomechanismus die progressive Vergrößerung der Lysosomen, Verdrängung umgebender Zellstrukturen und Ruptur der Lysosomenmembran mit konsekutiver Freisetzung lysosomaler Enzyme und Akkumulation von Glykogen im Zytoplasma beschrieben (Griffin, 1984; Thurberg et al., 2006). Aktuell geht man jedoch von einem weitaus komplexeren Zusammenspiel verschiedener Pathomechanismen aus (Kohler et al., 2018; Myerowitz et al., 2021).

Neben der Glykogenspeicherung wird eine Störung der lysosomalen Prozessierung, der Autophagie, als ursächlich beschrieben (Kohler et al., 2018; Meena et al., 2020; Myerowitz et al., 2021; A. Reuser & Schoser, 2021; Schoser, A 2007). Im Zuge der Autophagie werden Teile des Zytoplasmas und zerstörte Zellorganellen in von einer Doppelmembran umschlossenen Vakuole sequestriert. Das dabei entstehende Autophagosom fusioniert mit Lysosomen. Der umschlossene Inhalt kann durch diesen Prozess transportiert und wiederaufgearbeitet werden (s. Abb. 1). Ist der Prozess der Autophagie gestört sind oxidativer Stress, Ansammlung von abzubauenen Substraten und defekten Mitochondrien (Myerowitz et al., 2021) die Folge. In Skelettmuskelbiopsien von Pompe Patienten ließen sich große Ansammlungen an Autophagosomen nachweisen, was zu der Vermutung führte, dass dieser gestörte Prozess mitverantwortlich für den Zelluntergang ist (Engel, 1970; Raben et al., 2008; Raben et al., 2012). Im Rahmen dieser gestörten zellulären Wiederverwertung sammeln sich abnorme Mitochondrien an, was in Muskelbiopsaten von Pompe Patienten nachgewiesen werden konnte (Schoser et al., 2007; Thurberg et al., 2006). Aktuell geht man von einer gestörten Induktion der Autophagie und Störung bei der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen in Muskelzellen bei an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen aus (Meena & Raben, 2020; Myerowitz et al., 2021). Im Zuge der Mitophagie, ein selektiver Prozess um defekte Mitochondrien zu zersetzen, spielen Lysosomen eine entscheidende Rolle. Dieser Prozess scheint ebenfalls gestört, was möglicherweise zu einem reduzierten mitochondrialen Energiestoffwechsel beiträgt (Lim et al., 2015; Meinke et al., 2019; Schoser, 2019). Die Identifizierung von Lipofuszin-einlagerungen in Lysosomen und Autophagosomen weist auf

einen weiteren Pathomechanismus hin, der den Abbau alter und die Produktion neuer Zellkomponenten aus dem Gleichgewicht zu bringen scheint (Feeney et al., 2014). Die großen Ansammlungen an mit Glykogen beladenen Lysosomen, zytoplasmatischem Glykogen, Autophagosomen und Lipofuszin zusammen beeinträchtigen den kontraktilem Apparat und damit die Muskelfunktion (Drost et al., 2005; Lim et al., 2014).

In einer Forschungsarbeit wurde in humanen Myoblasten von Patient\*innen mit Morbus Pompe eine Reduktion der Glykolyse gemessen (Meinke et al., 2019), wobei es weiterer Forschung bedarf um den Pathomechanismus der metabolischen Störungen zu verstehen.

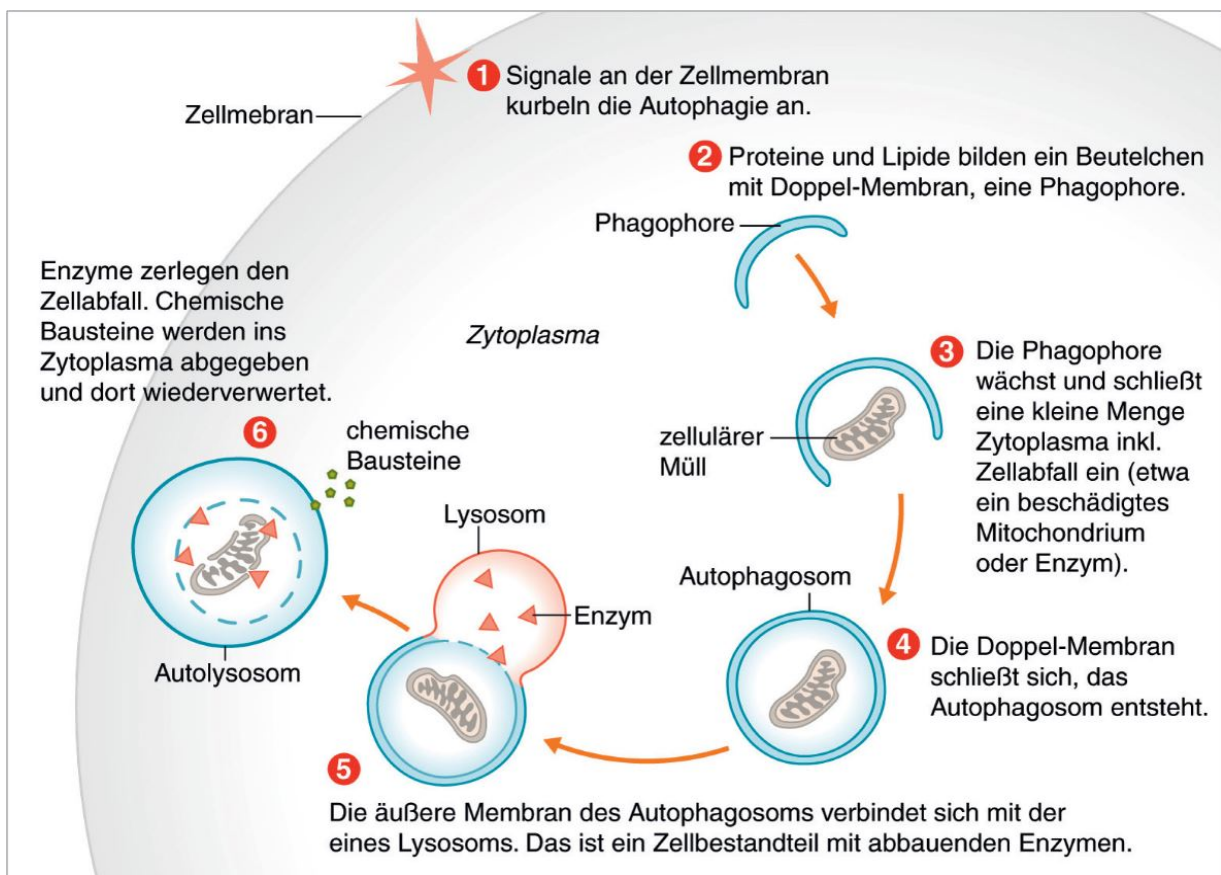


Abbildung 1: Der Prozess der Autophagie: Zellbestandteile des Zytoplasmas werden in das Innere von Autophagosomen eingeschlossen. Autophagosome verschmelzen mit Lysosomen zu Autolysosomen, in denen die Zellbestandteile durch Hydrolasen in ihre Grundbausteine abgebaut werden. Diese werden zurück ins Zytoplasma sezerniert und dienen als neue Bausteine. Dieser Prozess dient der zellulären Homöostase. Quelle: Deutsches Ärzteblatt 2016; 113 (40).

### 3.5 Klinik

Die Klinik des Morbus Pompe zeichnet sich durch eine hohe Variabilität des Erkrankungsalters, der Organbeteiligung und des Krankheitsverlaufs aus. Abhängig von diesen Charakteristika wird die Erkrankung in zwei Verlaufsformen eingeteilt. Die infantile onsets Pompe

disease (IOPD) manifestiert sich vor dem zwölften Lebensmonat, vor allem mit generalisierter Muskelschwäche, Hypotonie, respiratorischen Funktionsstörungen und hypertropher Kardiomyopathie. Die late-onset Pompe disease (LOPD) ist durch eine spätere Erstmanifestation nach dem zwölften Lebensmonat, axialer sowie Gliedergürtelmuskelschwäche, erhöhten CK-Werten und oftmals respiratorischen Funktionsstörungen durch Atemmuskeldeneration charakterisiert (Toscano et al., 2019).

### **3.5.1 Infantile Form (IOPD)**

Die infantile Form entspricht der klassischen Verlaufsform des Morbus Pompe, wie sie erstmals 1932 durch den niederländische Pathologen Dr. J. C. Pompe beschrieben wurde (Pompe, 1932). Mit einem frühen Erstmanifestationsalter innerhalb der ersten Lebensmonate, einer Restaktivität der  $\alpha$ -Glukosidase von in der Regel unter 1% und im ersten Lebensjahr meist tödlichen Verlaufs stellt diese Form die schwerste Verlaufsform der Erkrankung da.

Betroffene Säuglinge werden mit ihrer Haltungsinstabilität oft als sog. „floppy infant“ (wörtl. etwa „schlappes Wickelkind“) auffällig, was durch eine ausgeprägte, rasch progrediente muskuläre Hypotonie gekennzeichnet ist. Es besteht eine deutliche motorische Entwicklungsverzögerung. Neben dem motorischen System ist vor allem das Herz betroffen. Die Glykogeneinlagerungen bedingen eine Kardiomyopathie, welche zu Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz führen kann. Durch Affektion des Diaphragma und der Atemhilfsmuskulatur kann sich eine ventilatorische Insuffizienz mit vergesellschafteten Atemwegsinfekten entwickeln (Hagemans, Winkel, Hop, et al., 2005; Hirschhorn & Reuser, 2001; Schoer, A 2007; H. M. van den Hout et al., 2003).

### **3.5.2 Adulte Form (LOPD)**

Die Spätmanifestationsform der Erkrankung präsentiert sich hinsichtlich Erstmanifestationsalter, Verlauf und Progredienz sehr heterogen. Die LOPD ist klinisch durch progressive Muskelschwäche und Ateminsuffizienz und einem variablen Erkrankungsbeginn in der frühen Kindheit bis ins späte Erwachsenenalter charakterisiert. Typische Frühsymptome wie Myalgie, schnelle muskuläre Erschöpfung und verminderte sportliche Belastbarkeit sind unspezifisch und werden oft über Jahre ignoriert (Hagemans, Winkel, Van Doorn, et al., 2005; Müller-Felber et al., 2007; Schüller et al., 2012; Toscano et al., 2019). Die langsam progrediente Myopathie und rasche muskuläre Ermüdbarkeit äußern sich in einer eingeschränkten Beweglichkeit mit Schwierigkeiten beim Treppensteigen, Aufstehen und Rennen. Teilweise besteht eine ausgeprägte Schwäche der axialen autochthonen Rückenmuskulatur. Im Verlauf der

Erkrankung entstehen u.U. sekundäre muskuloskelettale Einschränkungen, wie eine Osteopenie bzw. Osteoporose, Skoliose und Kontrakturen. Im Verlauf der Erkrankung kann es zur progredienten Gangstörung bis zu Rollstuhlpflichtigkeit kommen. Bei mehr als 50% der Betroffenen entwickelt sich eine progressive diaphragmale Schwäche, schlafbezogene Atemstörungen und im Progress eine ventilatorische Ateminsuffizienz als Haupttodesursache (Hagemans et al., 2004; Hagemans, Winkel, Van Doorn, et al., 2005; Mellies et al., 2001; Pellegrini et al., 2005; Schoser, A 2007; Schüller et al., 2012).

### **3.6 Diagnostik**

Die Seltenheit des Morbus Pompe, die klinische Variabilität und die breite Zeitspanne der Manifestation multisystemischer Symptome erschweren die Diagnosestellung. So vergehen bis zur Diagnosestellung der LOPD oft Jahre vom Erkrankungsbeginn bis zur endgültigen Diagnosestellung und Therapieeinleitung (Byrne et al., 2011; Müller-Felber et al., 2007).

Abbildung 2 zeigt einen nach Toscano et al. diagnostischen Algorithmus für die LOPD. An erster Stelle stehen eine ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung, gefolgt von laborchemischen Untersuchungen. Die klinischen Leitsymptome und hinweisende Laboruntersuchungen sind in Abb. 3 „Diagnose und Therapie des LOPD“ zusammengefasst. So sind in der neurologischen Untersuchung vor allem die axiale, proximal betonte Muskelschwäche krankheitshinweisend, welche sich über die manuelle Muskelkraftprüfung diagnostizieren lässt (Bembi et al., 2008). Bei Affektion des respiratorischen Systems können Atemnot, rezidivierende Atemwegsinfekte, morgendliche Kopfschmerzen und obstruktive Schlafapnoe anamnestisch erhoben werden (Bembi et al., 2008; Mellies et al., 2009). Zur Objektivierung sollte Lungenfunktionsdiagnostik eingesetzt werden. Um die häufig früh einsetzende Einschränkung der Zwerchfellmuskulatur zu beurteilen eignet sich das forcierte expiratorische Volumen (FEV), welches sowohl in sitzender als auch in liegender Position zu bestimmen ist. Ein Abfall des FEV von mehr als 20% in liegender Position im Vergleich zur sitzenden Position ist hinweisend auf eine Zwerchfellschwäche (Pellegrini et al., 2005; Schüller et al., 2013). Nächtliche Hypoventilation kann durch eine Polysomnographie in Verbindung mit einer nächtlichen transkutanen Kapnographie evaluiert werden.

Laborchemisch werden zunächst nicht-spezifische, einfach bestimmbare Parameter erhoben. Dazu gehören standardgemäß die Serum-Kreatinkinase (CK), die Laktat-Dehydrogenase (LDH) sowie der Transaminasen GPT und GOT. Bei erwachsenen Patienten bestehen zu 94%

erhöhte CK-Werte (Ausems et al., 1999), wobei die CK in der Mehrzahl der Fälle nur mäßig erhöht ist und die Werte selten über das 10-fache der Norm liegen (Schüller et al., 2013).

Zur Ergänzung der insgesamt unspezifischen klinischen und laborchemischen Untersuchungsbefunde sollten wie in Abbildung 2 dargestellt elektrophysiologische Untersuchungen folgen. Mittels Elektromyographie (EMG) werden häufig myotone oder komplex repetitive Entladungen und myopathische Veränderungen motorischer Einheiten registriert (Schüller et al., 2013).

Bildgebende Verfahren liefern ebenfalls keine spezifischen Ergebnisse, können jedoch als nicht-invasive Methode differentialdiagnostisch hilfreich sein und bei geplanter Muskelbiopsie zur Auswahl des geeigneten Biopsiemuskels dienen. In der Magnetresonanztomographie können mit T1-, T2- und fettgesättigten Sequenzen die Verteilung der fettigen Muskelatrophien angezeigt werden (Alejaldre et al., 2012; Bembi et al., 2008; Schüller et al., 2013).

Um das Herz beurteilen zu können eignen sich, vor allem bei der infantilen Verlaufsform, Röntgen Thoraxaufnahmen und Sonographie zur Abklärung einer kardialen Hypertrophie. Bildgebende Befunde sind eine Verdickung beider Ventrikelwände und des interventrikulären Septums oder eine Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn (H. M. van den Hout et al., 2003).

Besteht, dem diagnostischen Algorithmus folgend, der Verdacht auf Morbus Pompe, ist die Aktivitätsbestimmung der sauren  $\alpha$ -Glukosidase durch einen Trockenbluttest der zur Diagnose führende Schritt.

Die Messung der  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität ist in unterschiedlichen Gewebsarten möglich: kultivierte Fibroblasten aus Hautbiopsien, Muskelgewebe, gereinigte Lymphozyten sowie getrocknete Blutropfen auf Filterpapier. Standard ist aktuell die Aktivitätsbestimmung aus Lymphozyten bzw. dem Trockenblut (Schüller et al., 2013) Lukacs et al. 2019 siehe weiter hinten. Dabei wird im Rahmen des sogenannten dried blood spot-Tests (DBS) eine geringe Blutmenge auf Acarbose-haltiges Filterpapier appliziert und mittels Fluorometrie die  $\alpha$ -Glukosidase-Restaktivität bestimmt. Dieses Verfahren ist nicht-invasiv, kostengünstig, standardisiert und eignet sich auch als Neugeborenenenscreening. Wird eine niedrige Enzymaktivität nachgewiesen, sollte das Ergebnis durch eine zweite Enzymaktivitätsanalyse verifiziert werden (Chamoles et al., 2004; Schüller et al., 2013; H. Zhang et al., 2006).

Nach der Verifizierung sollte sich die  $\alpha$ -Glukosidase-Gen-Sequenzierung zur Bestimmung von krankheitsursächlichen Mutationen anschließen. Bei erwachsenen, kaukasischen Patienten wird dabei primär die Überprüfung der in 90% der Fälle auftretenden Splice-site-Mutation c.-32-13G>A empfohlen (Schooser, A 2007; Schüller et al., 2013; van der Ploeg et al., 2017).

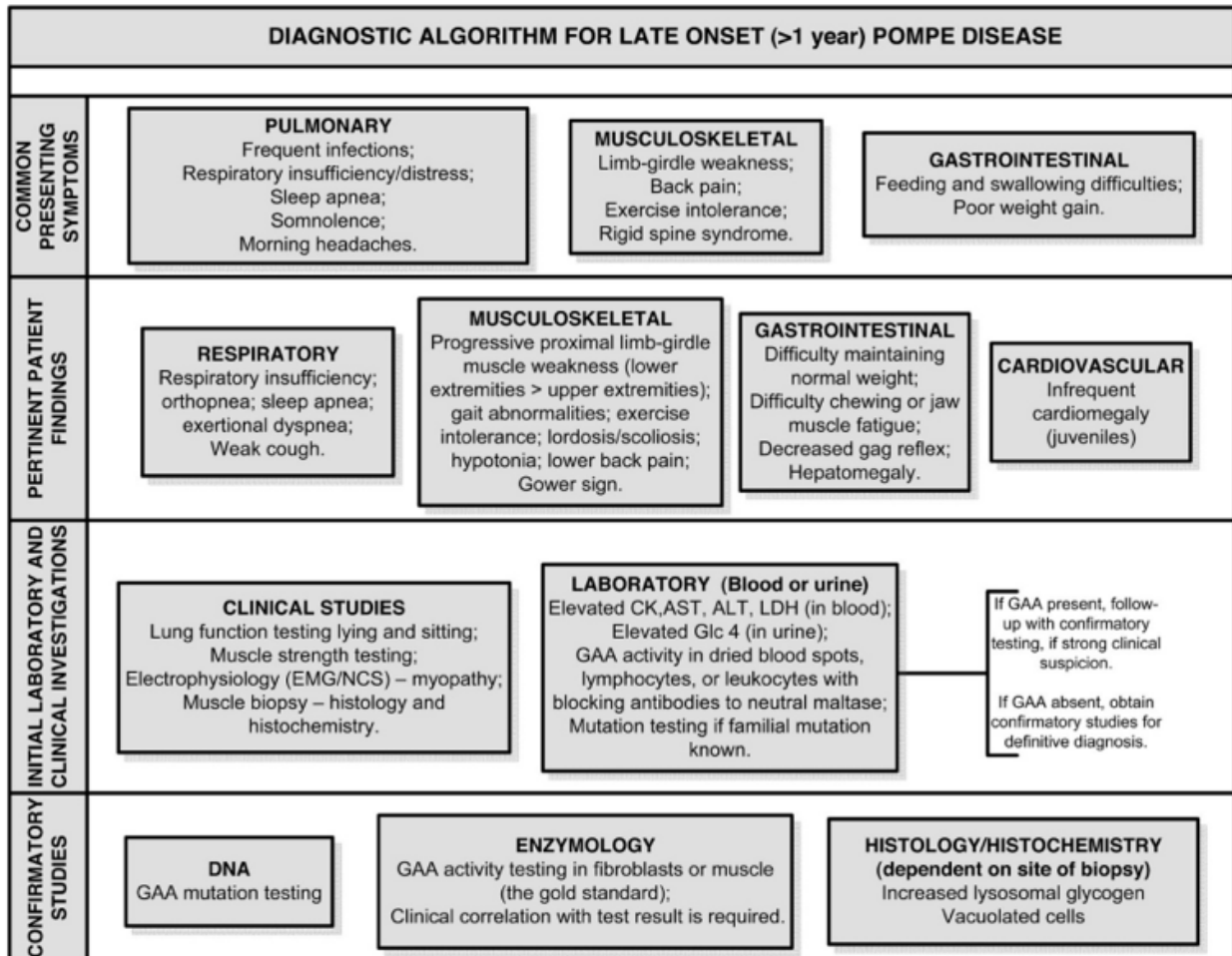


Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus für die adulte Form (LOPD, Symptombeginn >1.LJ). Quelle: (Kishnani et al., 2006, B 2006), Bildrechte wurden über Elsevier genehmigt



<b>Neuromuskulärer Status</b>	<p><i>Häufige Symptome</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Muskelschwäche: proximal und axial &gt; distal</li> <li>– Beckengürtel &gt; Schultergürtel</li> <li>– Positives Trendelenburg-Zeichen</li> <li>– Muskuläre Belastungsintoleranz</li> </ul> <p><i>Seltene Symptome</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Myalgien, lumbale Rückenschmerzen, Crampi</li> <li>– Skoliose, Hyperlordosierung</li> <li>– Rigid-spine-Syndrom</li> <li>– Facies myopathica</li> <li>– Ptosis</li> <li>– Makroglossie</li> <li>– Dysphagie</li> <li>– Dysarthrie</li> </ul>
<b>Elektrophysiologie</b>	<p><i>EMG:</i> (auch paraspinale Muskulatur testen!)  Myopathisches EMG-Muster mit häufig pathologischer Spontanaktivität und Nachweis von komplex-repetitiven Serienentladungen  <i>Nervenleitungsgeschwindigkeit:</i> normal</p>
<b>Labor</b>	<p><i>BLUT</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>CK:</i> normal bis 15-fach erhöht</li> <li>– <i>GOT, GPT, LDH:</i> können erhöht sein</li> <li>– <i>Trockenbluttest</i> für <math>\alpha</math>-Glucodiase Aktivität</li> </ul> <p><i>URIN:</i> Glc4- und Hex4-Konzentrationen erhöht</p>
<b>Ventilatorischer Status</b>	<p>Häufige respiratorische Infekte  Dyspnoe  Orthopnoe  Schläfrigkeit  Morgendliche Kopfschmerzen</p> <p><i>Lungenfunktion:</i> milde bis moderate Reduktion der forcierten expiratorischen Vitalkapazität: Abfall der Vitalkapazität um mehr als 20% zwischen liegender Position und sitzender Position als Hinweis auf eine diaphragmale Insuffizienz</p>
<p><i>CK</i> Kreatin-Kinase, <i>EMG</i> Elektromyographie, <i>Glc4</i> Glucose-Tetrasaccharid, <i>GOT</i> Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, <i>GPT</i> Glutamat-Pyruvat-Transaminase, <i>Hex4</i> Hexose-Tetrasaccharid, <i>LDH</i> Lactatdehydrogenase.</p>	

Abbildung 3: Häufige Symptome und Untersuchungsbefunde des LOPD. Quelle: Schüller et al., 2013, Diagnose und Therapie des Late-onset-Morbus-Pompe, Der Nervenarzt 84: 1467-1472. Bildrechte wurden über Springer Nature BV genehmigt.

### 3.7 Differentialdiagnosen

Bei der kindlichen und juvenilen Verlaufsform muss bei normal saurer  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität in erster Linie an eine Danon disease oder an die X-chromosomale Myopathie mit autophagischen Vakuolen gedacht werden (Schoaser, A 2007). Bei der Danon disease verursacht eine Genmutation für ein lysosomales Membranprotein die Symptomkonstellation aus Kardiomyopathie, Myopathie und vakuolären Glykogeneinlagerungen in der Skelettmuskulatur. Im Gegensatz zum Morbus Pompe liegt bei den betroffenen Patienten allerdings gehäuft eine mentale Retardierung vor (Sugie et al., 2002). Bei Neugeborenen müssen bei kardialer Symptomatik eine Myokarditis und idiopathische hypertrophe Kardiomyopathie ausgeschlossen werden.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über mögliche Differentialdiagnosen für den LOPD. Die progressive Muskelschwäche von Schulter-, Becken- und Oberschenkelmuskulatur bei dem LOPD schließen in differentialdiagnostischen Überlegungen vor allem die Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD), aber auch die Myasthenia gravis oder die myotone Dystrophie Typ 2 mit ein (Kohler et al., 2018; Schoaser, A 2007).

Tabelle 1: Differentialdiagnosen des LOPD. Quelle: Schüller et al., 2013, Diagnose und Therapie des Late-onset-Morbus-Pompe, Der Nervenarzt 84: 1467-1472. Bildrechte wurden über Springer Nature BV genehmigt.

Differenzialdiagnosen	Überlappende Symptomatik
– Gliedergürteldystrophien	– Progressive Muskelschwäche im Becken- und Schultergürtel, ggf. respiratorische Insuffizienz, CK-Erhöhung
– Skapuloperoneale Syndrome z. B. im Rahmen von myofibrillären Myopathien	– Progressive Muskelschwäche der Fußheber und der Schultergürtelmuskulatur
– Myotone Dystrophie Typ 2	– Proximale Muskelschwäche mit Myotonie, EMG: myotone Serienentladung
– Glykogenspeichererkrankungen (IIIa, IV, V, VII)	– Muskuläre Hypotonie und Tetraparese, Hepatomegalie, CK-Erhöhung
– Danon-Erkrankung	– Muskelbiptischer Nachweis von Vakuolen mit Glykogen, Muskelschwäche
– Mitochondriale Myopathien	– Proximale Muskelschwäche, muskuläre Belastungsintoleranz, meist CK-Erhöhung, multisystemische Symptome
– Polymyositis und Einschlusskörpermyositis	– Proximale oder distale Muskelschwäche und -atrophie
– Spinale Muskelatrophie	– Symmetrische Muskelschwäche und -atrophie
– Rigid-spine-Syndrome	– Steifigkeit der Wirbelsäule, lumbale Rückenschmerzen

CK Kreatin-Kinase, EMG Elektromyographie.

## 3.8 Therapie

Die Therapieempfehlungen für an Morbus Pompe erkrankte Patient\*innen basieren auf publizierten Therapierichtlinien und Studien (Barba-Romero et al., 2012; Bembi et al., 2010; Cupler et al., 2012; Hundsberger et al., 2019; Llerena et al., 2009; Tarnopolsky et al., 2016). Um der multisystemischen Erkrankung gerecht zu werden, bedarf es eines interdisziplinären Therapiekonzepts, welches die Zusammenarbeit von Neurologen, Physiotherapeuten, Internisten, Orthopäden, Ergotherapeuten, Logopäden und Diätassistenten erfordert.

### 3.8.1 Symptomatische Therapie

Ziel der symptomatischen Therapie ist es, die motorischen Fähigkeiten zu optimieren, zu stabilisieren und das Auftreten sekundärer Komplikationen zu minimieren.

Zur Behandlung der neuromuskulären Symptome wird ein physiotherapeutisch angeleitetes submaximales, aerobes Training an drei bis fünf Tagen pro Woche, mit langsamem Beginn und Steigerung bis zum Erreichen von 60–70% der maximalen Leistungsfähigkeit empfohlen (Llerena et al., 2009; Schüller et al., 2013).

Es sollte eine regelmäßige Kontrolle der Atemfunktion erfolgen um die häufig auftretenden respiratorischen Komplikationen frühzeitig zu erfassen und symptomatisch zu therapieren. Bei einer nächtlichen Hypoventilation ist ein Therapieversuch mit einer nichtinvasiven BiPAP-Beatmung („bilevel positive airway pressure“) indiziert und die Betreuung sollte an Zentren mit Erfahrung für Beatmungstherapie von Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen erfolgen (Cupler et al., 2012; Mellies et al., 2001). Aufgrund der Gefahr rezidivierender respiratorischer Infekte sollten Pompe Patienten nach aktuellen STIKO Empfehlungen geimpft werden und Infekte frühzeitig therapiert werden (Pellegrini et al., 2005; Schüller et al., 2013).

Es besteht keine allgemeingültige Ernährungsempfehlung. Da das Muskelglykogen nicht als Energiequelle genutzt werden kann liegt eine schnelle Erschöpfbarkeit vor. Hilfreich können kleine additive Gaben von Glukose oder Fruktose als Energiequelle sein und moderates Ausdauertraining um den Muskel frühzeitig an Blutzucker und Fettsäuren als Energielieferanten zu adaptieren. Zusätzlich kann die Supplementation von L-Alanin bis zu 2 g/kg Körpergewicht hilfreich sein (Schüller et al., 2013). In einer Studie von Slonim et al. konnte eine Verlangsamung des Muskelkraffunktionsverlustes sowie des natürlichen Krankheitsverlaufes

durch proteinreiche und kohlenhydratarme Ernährung in Kombination mit körperlichem Training nachgewiesen werden (Slonim et al., 2007).

Wichtig ist auch die psychologische Betreuung der Patienten, da es sich bei der Diagnose Morbus Pompe um eine gravierende, sich auf den Lebensalltag auswirkende Erkrankung mit progressivem Verlauf handelt. Eine unterstützende Betreuung ist deshalb von großer Bedeutung. Außerdem existieren diverse Selbsthilfegruppen. Die Organisation International Pompe Association (IPA) fungiert als weltweiter Dachverband der einzelnen Untergruppen (Organisation International Pompe Association).

### **3.8.2 Enzymersatztherapie**

Für alle Formen und Altersgruppen des Morbus Pompe steht seit 2006 das Enzym Alglucosidase alfa als erste krankheitsspezifische Behandlungsmöglichkeit zur Verfügung. Ziel der Enzymersatztherapie (EET) ist es den Enzymmangel der  $\alpha$ -Glucosidase anzugleichen um ein Fortschreiten der Erkrankung möglichst zu verhindern oder zu verzögern. Ca. 30% der normalen GAA-Aktivität ist ausreichend, um keine Symptome des Morbus Pompe zu manifestieren.

Die Alglucosidase alfa ist das rekombinant hergestellte humane Enzym lysosomale  $\alpha$ -1,4-Glucosidase. Im Rahmen der EET wird Alglucosidase-alfa intravenös über ca. vier bis sechs Stunden, alle zwei Wochen in einer Dosierung von 20mg/kg Körpergewicht, appliziert (Sanofi US, 2017; Schüller et al., 2013). Das Enzym wird über die Blutbahn zu den entsprechenden Organen transportiert, an deren Oberfläche es an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren andockt und als Rezeptor-Enzym-Komplex in die Lysosomen gelangt um dort seine enzymatische Aktivität zu entwickeln (Schoser, A 2007).

Die Wirksamkeit und Sicherheit der EET konnte in mehreren klinischen Studien nachgewiesen werden. So konnte durch die EET bei Säuglingen eine Verbesserung der kardialen, respiratorischen und motorischen Symptomatik erzielt werden und das Überleben verlängert werden (Amalfitano et al., 2001; Kishnani et al., 2007; Kishnani et al., A 2006; H. Van den Hout et al., 2000). In einer zulassungsrelevanten Studie von Kishnani et al. waren unter EET alle der 18 in die Studie eingeschlossenen Säuglinge nach 52 Wochen Behandlung am Leben, 15 der Kinder benötigten keine Beatmung und es zeigte sich eine Verbesserung der Kardiomyopathie und der motorischen Entwicklung (Kishnani et al., 2007). Die Behandlung sollte so früh wie möglich nach Diagnosestellung erfolgen (Kronn et al., 2017).

Die Effektivität der EET konnte auch bei der Behandlung von LOPD-Patienten nachgewiesen werden. In einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie von van der Ploeg et al. wurden 90 LOPD-Patienten eingeschlossen, 60 von ihnen erhielten Alglucosidase-alfa, 30 einen Placebo über einen Zeitraum von 78 Wochen. Die Patienten unter EET zeigten eine signifikante Verbesserung der Gehstrecke, gemessen mittels 6-Minuten-Gehtest (6MGT), und eine Stabilisierung der Atemfunktion (van der Ploeg et al., 2010). Weitere open-label-Langzeitstudien unterstützen dieses Ergebnis (Angelini et al., 2012; Bembi et al., 2010; Gutschmidt et al., 2021; Regnery et al., 2012; Schoser et al., 2017; Strothotte et al., 2010).

Limitation des derzeitigen Therapieerfolgs ist der variierende Effekt der EET, vor allem in der Skelettmuskulatur (Hintze et al., 2020; Kuperus et al., 2017; van der Meijden et al., 2018; van der Ploeg et al., 2017). Neben der in Langzeitstudien erwiesenen Stabilisierung und Verbesserung der Gehstrecke und Atemfunktion bleibt axiale Muskelschwäche unter EET häufig bestehen und zeigt einen zeitlichen Progress (Gutschmidt et al., 2021; Hintze et al., 2020; Kohler et al., 2018; Schoser et al., 2017).

Zum Therapiebeginn bei LOPD-Patienten liegen bis jetzt keine standardisierten Empfehlungen vor. Da die Therapiekosten hoch sind und es sich um eine lebenslange, invasive und zeitaufwändige Therapieform handelt, sind evidente Richtlinien zum Therapieverlauf essentiell. Die Annahme, dass ein früher Therapiebeginn den klinischen Erfolg erhöht, beruht auf den Erfahrungen in der Behandlung der infantilen Verlaufsform (Schüller et al., 2013; Toscano et al., 2013). Das 2014 gegründete European Pompe Consortium hat basierend auf jahrelanger Expertenerfahrung im Bereich der EET und systematischen Literatur-Reviews zur Effektivität der EET bei erwachsenen Pompe Patienten 2017 Empfehlungen für das pragmatische Vorgehen veröffentlicht (van der Ploeg et al., 2017), welche nachfolgend durch Metaanalysen bestätigt wurden (Hundsberger et al., 2019). Demnach ist der Beginn der EET bei präsymptomatischen, genetisch gesicherten LOPD-Patienten ohne klinische Zeichen der Erkrankung bisher nicht empfohlen. Diese Patienten sollten alle sechs Monate klinisch untersucht werden, um die Muskelkraft zu prüfen, damit bei ersten klinischen Zeichen die EET begonnen werden kann. Die EET sollte bei jedem neu diagnostizierten, symptomatischen Patienten gestartet werden. Aufgrund der hohen Therapiekosten und fehlender wissenschaftlicher Erkenntnisse sollte der Therapieerfolg jährlich evaluiert werden. Bei einer Stabilisierung des Krankheitszustands oder einer Verlangsamung des Progresses wird eine Fortführung der Therapie empfohlen (Schüller et al., 2013; van der Ploeg et al., 2017).

Insgesamt ist die EET eine sichere und gut verträgliche Therapieform. Zu den häufiger auftretenden Nebenwirkungen zählen vor allem leicht bis mäßig ausgeprägt einzustufende allergische Reaktionen, Tachykardie, Hypotonie, Erbrechen, Fieber, CK-MB-Erhöhung und das Zentralnervensystem betreffende Nebenwirkungen (Erregung, Tremor und Rigor), welche während oder innerhalb zwei Stunden nach der Infusion auftreten (Schoaser, A 2007). Die meisten EET-Patienten bilden im Verlauf der Therapie niedrigtitrige IgG-Antikörper gegen Alglucosidase-alfa aus, weshalb in den ersten 2 Jahren regelmäßig alle 6 Monate, danach jährliche IgG-Antikörper-Bestimmungen empfohlen werden (Schüller et al., 2013). Die Auswirkung dieser Immunreaktion ist vor allem bei Patienten mit fehlender  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität, vornehmlich infantilen Pompe-Patienten, entscheidend. Diese als CRIM-negativ („cross-reactive immunologic material negative“) bezeichneten Patienten entwickeln, im Gegensatz zu Patienten mit  $\alpha$ -Glukosidase-Restaktivität, hohe Antikörpertiter was zu relevanter klinischer Verschlechterung bis zum Tod führen kann (Banugaria et al., 2011; Kohler et al., 2018; van Gelder et al., 2015). Zur immunologischen Toleranzinduktion bei CRIM-negativ Patienten wurden verschiedene Protokolle veröffentlicht. Die am häufigsten angewandte medikamentöse Prophylaxe ist die Kombination aus Rituximab und Methotrexat (Kohler et al., 2018).

Die EET hat die Therapie des Morbus Pompe revolutioniert und zeigt zusammenfassend in vielen klinischen Studien ihr Behandlungspotential. Herausragend sind dabei vor allem die längere Überlebensdauer und Verbesserung der kardialen Funktion bei Säuglingen. Im Skelettmuskel werden Glykogenablagerungen durch ERT zwar reduziert, die Vakuolisierung, Autophagie und Destruktion des kontraktiven Apparats wird jedoch nicht wiederhergestellt und der klinische Effekt der EET auf die Skelettmuskulatur ist insgesamt sehr variabel (Kohler et al., 2018; Raben et al., 2005; Winkel et al., 2003).

### **3.8.3 Weitere Therapieansätze**

Weitere in der Forschung verfolgte therapeutische Strategien sind die Effektivitätssteigerung der EET, die Chaperon-Therapie und die Gentherapie (Kohler et al., 2018; Parenti et al., 2011; Schüller et al., 2013).

Damit die Alglucosidase alfa in die Zielzellen aufgenommen werden kann muss sie an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor binden. Die limitierten Effekte der EET auf die Skelettmuskulatur werden hauptsächlich auf die geringe Anzahl an Mannose-6-Phosphat-Gruppen auf der rekombinanten-GAA und der niedrigen Expression von Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren auf den Muskelzellen zurückgeführt. Um den Therapieeffekt zu steigern zielt eine

neue Therapiestrategie darauf ab die rekombinant hergestellte GAA mit einer höheren Anzahl an Mannose-6-Phosphat-Resten auszustatten (Kohler et al., 2018). Ein weiter modifiziertes Enzym ist Neo-GAA , welches sich aktuell in Phase III einer multizentrischen, internationalen, doppelblinden, randomisierten, kontrollierten Phase-III Studie überprüft wurde und sich im Zulassungsprozess befindet (Diaz-Manera et al., 2021; Schüller et al., 2013).

Eine weitere Phase-3 Studie untersuchte eine neues modifiziertes GAA in Kombination mit der Gabe eines Chaperone (AmicusTherapeutics, 2018 - 2021).

Grundlage der Chaperontherapie sind small molecule-Chaperone, welche so konzipiert sind, dass sie an das aktive Zentrum der mutierten  $\alpha$ -Glucosidase binden. Durch die Bindung soll die native Konformation der  $\alpha$ -Glucosidase wiederhergestellt werden, der Transport zu den Lysosomen erleichtert werden um die enzymatische Aktivität des veränderten Proteins wiederherzustellen und die Akkumulation von Glykolipiden in Organzellen zu reduzieren (Parenti, 2009; Parenti et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Phase-3 Studie wurde aktuell veröffentlicht (Schoer Bet al, 2021).

Im Forschungsansatz der Gentherapie wird über verschiedene Gentransfersysteme versucht ein intaktes Gen der  $\alpha$ -Glucosidase in das Genom der Zielzelle zu integrieren (Colella et al., 2019; Fraites et al., 2002; Kohler et al., 2018; Pauly et al., 1998; Zaretsky et al., 1997).

## 4 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Dissertation ist eine neue, nicht-invasive diagnostische Methode für den Morbus Pompe mittels Seahorse XFp Analyzer zu etablieren. Der Seahorse XFp Analyzer ist ein von der Firma Agilent hergestelltes Gerät, mit dessen Hilfe metabolische Vorgänge, wie beispielsweise die Glykolyse in lebenden Zellen in Echtzeit gemessen werden können.

Die Glykolyse ist ein kataboler, im Zytosol lokalisierter, Stoffwechselprozess bei der Glucose unter ATP Bildung zu Pyruvat abgebaut wird. In sauerstoffreichen Geweben wird das Pyruvat weiter unter Energiegewinnung im Citratzyklus und der mitochondrialen Atmungskette abgebaut (Schoser, 2019). In Myoblasten von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen konnten Meinke et al. eine reduzierte Glykolyse messen (Meinke et al., 2019). Die biochemischen Zusammenhänge die dazu führen, sind nach aktuellem Forschungsstand weiter unklar (Schoser, 2019). Möglicherweise steht durch das gespeicherte Glykogen weniger Glukose für die Glykolyse zu Verfügung. Auch sekundäre Effekte über verändertes Signaling und Genexpression sind denkbar.

Die saure  $\alpha$ -Glucosidase findet sich ubiquitär im menschlichen Körper. So wird das defekte Enzym bei an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen auch in Urinzellen exprimiert (Hirschhorn & Reuser, 2001). Daraus folgte die Hypothese, dass Urinproben genutzt werden könnten um mittels Seahorse XFp Analyzer die Glykolyse als Stoffwechselweg in lebenden Urinzellen zu analysieren. Durch Testung der glykolytischen Funktion der Zellen sollen charakteristische metabolische Profile für gesunde Proband\*innen und an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen erstellt werden. Die glykolytische Funktion der Zellen aus Proben der an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen sollte sich theoretisch aufgrund des Enzymdefekts von denen aus Proben gesunder Kontrollen unterscheiden, hypothetisch ist eine verminderte Glykolyse-Rate zu erwarten. Durch die Therapie mit der rekombinant hergestellten Alglucosidase-alfa sollte sich die glykolytische Funktion der Zellen steigern, sodass durch diese neue diagnostische Methode ein Therapieverlaufsmonitoring sich eröffnen könnte.

Dies geschah vor dem Hintergrund, dass Urinproben einfach und nicht-invasiv zu gewinnen sind und dadurch bereits etablierten diagnostischen Methoden überlegen sein könnten. Die Urinzellisolation und Zellkultivierung wird in der Literatur als einfaches und kostengünstiges Verfahren beschrieben (Dörrenhaus et al., 2000; Manaph et al., 2018; Oliveira Arcolino et al., 2015; Tayhan et al., 2017; Zhou et al., 2012).

Im ersten Teil der Dissertation wurden Urinproben von gesunden Proband\*innen und an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen gesammelt, um im Rahmen der Urinzellisolation und



Urinzellexpansion proliferationsfähige, glykolytisch aktive Urinepithelzellen zu isolieren und zu kultivieren. Anschließend wurde untersucht, ob die glykolytische Aktivität dieser Zellen mittels des Seahorse XFp Analyzers bestimmbar ist um anhand der gemessenen glykolytischen Aktivität charakteristische metabolische Profile für gesunde Proband\*innen und an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen zu erstellen. Die Hypothese war, dass die Proben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen im Vergleich zu Proben von gesunden Proband\*innen eine verminderte glykolytische Aktivität aufweisen.

Da im Rahmen der Kultivierung in keiner Probe ausreichend Probematerial gewonnen werden konnte, wurde zusätzlich getestet, ob ein Urinzellgemisch ohne vorangehende Zellkultivierung zur Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzers geeignet ist.

## **5 Untersuchungskollektiv**

Alle Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der 11 Patient\*innen (P1 – P11, s. Tabelle 2) und 13 gesunden Proband\*innen (K1 - K13, s. Tabelle 3). Ein positives Votum der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians- Universität, München liegt vor (Projektnummer: Amendement zum Ethikantrag Nr. 17-342).

### **5.1 Normalkollektiv**

Alle Proben wurden von 12 gesunden Proband\*innen gesammelt (K1 – K12, 7 weiblich, 5 männlich, s. Tabelle. 3). Es wurden 98 Urinproben 12 gesunder Proband\*innen gesammelt (K1 – K12, 7 weiblich, 5 männlich, s. Tabelle. 3), welche anschließend für die Urinzellisolation und Urinzellexpansion verwendet wurden. Es wurden außerdem 12 weitere Urinproben von zehn Proband\*innen des Normalkollektivs (sechs weiblich und vier männlich, s. Tabelle 9) als Urinzellgemisch, ohne vorangegangene Urinzellexpansion, als Kontrollmessungen in 12 Seahorse-Messungen verwendet. Es wurde eine Myoblastenprobe einer gesunden Probandin (K13, s. Tabelle 3) als Kontrollmessung in einer Seahorse-Messung genutzt.

### **5.2 Patientenkollektiv**

Alle verwendeten Proben wurden von 11 Patient\*innen (P1 – P11, s. Tabelle 2) gesammelt. Alle Patient\*innen erhielten zum Zeitpunkt der Probengewinnung und Messungen eine Enzyersatztherapie am Friedrich-Baur-Institut. Die Urinproben wurde jeweils vor einer Enzyersatztherapiegabe gesammelt. Die Probengewinnung und die anschließenden Versuche erfolgten unter Einwilligung gemäß des Ethikvotums.

Für die Urinzellexpansion wurden sechs Urinproben von vier Pompe-Patient\*innen verwendet (weiblich P1 und P2, männlich P3 und P4, s. Tabelle 2). Nach der Urinzellisolation wurden insgesamt 13 Seahorse-Messungen mit Pompe-Patient\*innen Proben durchgeführt. Die Urinproben stammten von neun Patient\*innen (fünf weiblich, vier männlich, s. Tabelle 9).

## 6 Material

### 6.1 Verwendete Gerätschaften

#### Seahorse XFp Analyzer von Agilent Technologies

Der Seahorse XFp Analyzer (s. Abb. 4) ist ein von der Firma Agilent hergestelltes Gerät, mithilfe dessen metabolische Vorgänge in lebenden Zellen in Echtzeit gemessen werden können.



Abbildung 4: Seahorse XFp Analyzer von der Firma Agilent. Quelle: Agilent Technologies, Broschüre Agilent Seahorse XFp Analyzer – Generate Functional Metabolic Data on Limited Samples 2017. Die Bildrechte wurden von Springer Nature BV genehmigt.

- Pipetten (10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l) Eppendorf
- Zellzähler: TC20™ Automated Cell Counter, #1450102, von BIO-RAD, USA
- UV-Licht Trockner ov2000 Analytik Jena, Deutschland
- Tischzentrifuge SIGMA Laboratory Centrifuges 6K15, Osterode am Harz, Deutschland
- Zellkultur Multiwellplatte, 12 Well Greiner #665180, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkultur Multiwellplatte, 24 Well Greiner # 662102, Frickenhausen, Deutschland
- Inkubator Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
- Mikroskop von Olympus CKX53 Tokyo, Japan

## 6.2 Reagenzien, Lösungen und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen den Standard Reinheitsanforderungen. Deren genaue Bezeichnung, Herkunft und Bestell- bzw. Katalognummer sind im Methodenteil beschrieben.

- Dulbecco's Phosphat Bufferd Saline (DPBS) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Gibco™ DMEM, High Glucose Fisher Scientific (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Gibco, UK
- Nutrein Mixture F-12 Ham Sigma-Aldrich
- Pen/strep P4333-100ml Sigma
- L-Glutamine G7513 Sigma
- Amphotericin B
- Fetales Kälberserum (FBS)
- 0,1%ige Gelatine Merck Millipore (Ultrapure Water with 0,1% Gelatin (500 ml, Emryo Max, Specialty Media, von Millipore U.S. Cat# ES-006-B)
- Gibco™ DMEM, High Glucose Fisher Scientific (Dulbecco's Modified Eagle Medium, gibco, UK)
- Poly-lysin P4707
- Collagen C8919 Sigma
- Corning™ Matrigel™ Membranmatrix
- Corning™ 354234
- Laminin
- Gelatine.

## 6.3 Verwendete Kits

- REGM™ SingleQuot™ Kit Lonza, Walkersville, MD USA
  - (rhEGF 0,5 ml, Insulin 0,5 ml, Hydrocortison 0,5 ml, GA-100 0,5 ml , FBS 2,5 ml, Epinephrine 0,5 ml, T3 0,5 ml, Tansferrin 0,5 ml)
- REGM™ BulletKit™ Lonza (besteht aus REBM™ Basal Medium #CC-3191 und REGM™ SingleQuot™ Kit)

## 6.4 Zellkulturmedien

- Waschpuffer für Urinzellisolation

DPBS + 2,5 ml Penicillin + 2,5 ml Streptomycin + 1ml Amphotericin B

Für 500 ml Waschpuffer 2,5 ml Penicillin, 2,5 ml Streptomycin, 1 ml Amphotericin B in 496,5 ml DBS lösen. Bei 4°C aufbewahren.

- Primärmedium für Urinzellexpansion

REGM™ SingleQuot™ Kit + Gibco™ DMEM, High Glucose + Nutrein Mixture F-12 Ham + FBS + Penicillin + Streptomycin + Amphotericin + L-Glutamine, Ansatz:

Für 500 ml Primärmedium Supplemente des REGM™ SingleQuot™ Kit, 2,5 ml Penicillin + 2,5 ml Streptomycin + 1 ml Amphotericin, L-Glutamine und 50 ml FBS in 220 ml Gibco™ DMEM, High Glucose und 220 ml Nutrein Mixture F-12 Ham lösen. Bei 4°C aufbewahren und innerhalb von zwei Wochen gebrauchen.

- RE Proliferationsmedium für Urinzellexpansion

REGM™ BulletKit™.

Für 500 ml RE Proliferationsmedium die Supplemente des REGM™ BulletKit™ in 100ml REBM™ Basal Medium lösen. Proliferationsmedium bei 4°C aufbewahren und innerhalb von zwei Wochen gebrauchen.

## **7 Methoden**

Die Urinprobengewinnung erfolgte entsprechend den Protokollschritten aus der Publikation von Dörrenhaus et al., 2000, „Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and the renal tubular system“(Dörrenhaus et al., 2000, S. 619). Die Urinzellisolation und Urinzellexpansion erfolgte nach den Protokollschritten aus der Publikation von Zhou et al., 2012, „Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples“ (Zhou et al., 2012, S. 2084-2085).

### **7.1 Urinprobengewinnung**

Urin wurde von den Proband\*innen und Patient\*innen selbständig in einem sterilen Behältnis gesammelt. Die Proband\*innen und Patient\*innen wurden dazu aufgefordert, Mittelstrahlurin zu sammeln. Es handelte sich dabei nicht um den ersten Urin am Tag. Konnten die Proben nicht direkt im Anschluss aufbereitet werden, wurden sie auf Eis gestellt oder bei 4°C gekühlt. Alle Proben wurden mit einer maximalen Latenzzeit von drei Stunden weiterbearbeitet. Es wurden Urinprobenvolumina von min. 30 ml bis max. 350 ml verwendet.

### **7.2 Myoblastenprobengewinnung**

Da Seahorse Messungen mit Myoblasten-Proben von gesunden Proband\*innen und von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen eine im Labor bereits etablierte Methode sind, wurde eine Myoblastenprobe als Kontrolle genutzt. Die Proben stammen aus Biopsien des M. biceps brachii. Eine Probe stammt von einem an Morbus Pompe erkrankten, zum Zeitpunkt der Probenentnahme 55 Jahre alten Patienten P11 (s. Tabelle 2), aus der Muskelgewebesammlung des Friedrich-Baur-Institutes. Die Probe der gesunden Kontrolle K13 (s. Tabelle 3) stammt von einer weiblichen, zum Zeitpunkt der Probenentnahme 41 Jahre alten, gesunden Probandin.

Tabelle 2: Liste aller an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen (P). Geschlecht w = weiblich, m = männlich, Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme, Probe.

Pompe Patient (P)	Geschlecht w/m	Alter in Jahren	Probe
P1	w	62	Urin
P2	m	58	Urin
P3	w	78	Urin
P4	m	34	Urin
P5	m	34	Urin
P6	w	73	Urin
P7	w	56	Urin
P8	w	43	Urin
P9	m	67	Urin
P10	w	50	Urin
P11	m	55	Myoblasten

Tabelle 3: Liste aller gesunden Kontrollen (K). Geschlecht w = weiblich, m = männlich, Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme, Probe.

Kontrolle (K)	Geschlecht w/m	Alter in Jahren	Probe
K1	w	26	Urin
K2	m	35	Urin
K3	m	36	Urin
K4	w	38	Urin
K5	w	22	Urin
K6	w	37	Urin
K7	m	62	Urin
K8	m	28	Urin
K9	w	32	Urin
K10	w	22	Urin
K11	w	33	Urin
K12	m	36	Urin
K13	w	41	Myoblasten

### 7.3 Urinzellisolation

Alle folgenden Protokollschritte erfolgten unter einer sterilen Sicherheitswerkbank, um Kontaminationen der Proben zu vermeiden.

Um die Urinproben zu reinigen und die Urinzellen zu isolieren, wurden die Proben in sterile, konische Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt, mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen und bei Raumtemperatur bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und ein Restvolumen von 1 ml belassen. Anschließend wurden 10 ml Waschpuffer hinzugegeben. Feste Zellpelletts wurden vorsichtig resuspendiert.

Die Proben wurden bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und ein Restvolumen von 1 bis 3 ml belassen. Jedem Zentrifugenröhrchen wurde 1 ml Primärmedium hinzugefügt. Zellpelletts wurden vorsichtig resuspendiert. Das gesamte Probevolumen wurde auf ein Well einer 12-Well-Platte übertragen. Jeder Probe wurde 1 ml Primärmedium hinzugefügt. Die Zellen wurden für 24h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 7.4 Beschichtungen

Die isolierten Urinzellen wurden auf beschichtete und unbeschichtete Zellkultur Multiwellplatten gegeben. In dem aus der Literatur verwendeten Protokoll wurde 0,1%ige Gelatine als Beschichtung für die Zellkultur Multiwellplatten empfohlen (Zhou et al., 2012, S. 2084). Für die Gelatinebeschichtung der 12 Well Zellkultur Multiwellplatten wurde 250 µl 0,1%ige Gelatine auf jedes Well pipettiert. Die Platten trockneten bei Raumtemperatur und flüssige Überstände wurden entnommen.

Um zu testen, ob andere Beschichtungen zu einer schnelleren und besseren Zelladhärenz führen wurden die 12-Well-Platten außerdem mit folgenden Chemikalien getestet: Kollagen, Laminin, Matrigel und unbeschichtet.

Im Folgenden ist das genaue Vorgehen für die modifizierten Beschichtungen aufgeführt:

**Laminin:** Für die Lamininbeschichtung der Multiwellplatten wurde Laminin mit DPBS im Verhältnis 1:200 verdünnt. Für einen Ansatz von 3 ml wurden demnach 15 µl Laminin in 3 ml DPBS verdünnt. Auf jedes Well wurden 250 µl der Lösung pipettiert. Anschließend wurden die Zellkultur Multiwellplatten für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der flüssige Überstand abpipettiert und jedes



Well wurde zweimal mit je 3 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten unter UV-Licht getrocknet.

**Kollagen:** Für die Beschichtung mittels Kollagen wurden 250 µl je Well pipettiert. Anschließend wurden die Multiwellplatten für 30 Min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mittels PBS, um überschüssiges Kollagen zu entfernen.

**Matrigel:** Für die Matrigelbeschichtung der Multiwellplatten wurde 250 µl Matrigel auf jedes Well pipettiert. Nach kurzer Inkubation der Platten bei 37°C wurden flüssige Überstände abpipettiert.

**Polylysin:** Die Multiwellplatten wurden mit 250 µl Polylysin je Well beschichtet. Nach Auftragen des Polylysins wurden die Platten für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und regelmäßig geschwenkt. Danach wurde jedes Well einmal mit je 3 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur für zwei Stunden getrocknet.

## 7.5 Zellkultur

Die Urinzellen wurden auf den Zellkultur Multiwellplatte bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach den ersten 24, 48 und 72 Stunden wurde je 1 ml Primärmedium hinzugefügt. Es wurde kein Medium abgenommen. Nach 96 Stunden wurde das Medium bis auf einen Rest von 1 ml abgenommen. Jeder Probe wurde 1 ml RE Proliferationsmedium hinzugefügt. In den folgenden Tagen wurde alle 24 Stunden 1 ml Medium abgenommen und 1 ml RE Proliferationsmedium hinzugefügt. Die Proben wurden täglich unter einem Mikroskop begutachtet.

## 7.6 Seahorse XFp Analyse

### 7.6.1 Einführung Seahorse XFp Analyse

Für die Stoffwechselfmessungen und Erstellung metabolischer Profile wurde der Seahorse XFp Analyser von Agilent Technologies. Mithilfe des Seahorse XFp Analyser lassen sich zwei der wichtigsten Energieerzeugungswege der Zelle in Echtzeit erfassen, die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung. Mit der Methode können die extracellular acidification rate (ECAR) und die oxygen consumption rate (OCR) bestimmt werden. Dazu können adhärenente Zellen oder Suspensionszellen genutzt werden, welche nach Isolation auf eine 8-Well-Platte

übertragen werden. Während einer Messung können verschiedene Substrate hinzugegeben werden, um den Einfluss auf die Stoffwechselaktivität in Echtzeit zu untersuchen (s. Abb. 5).

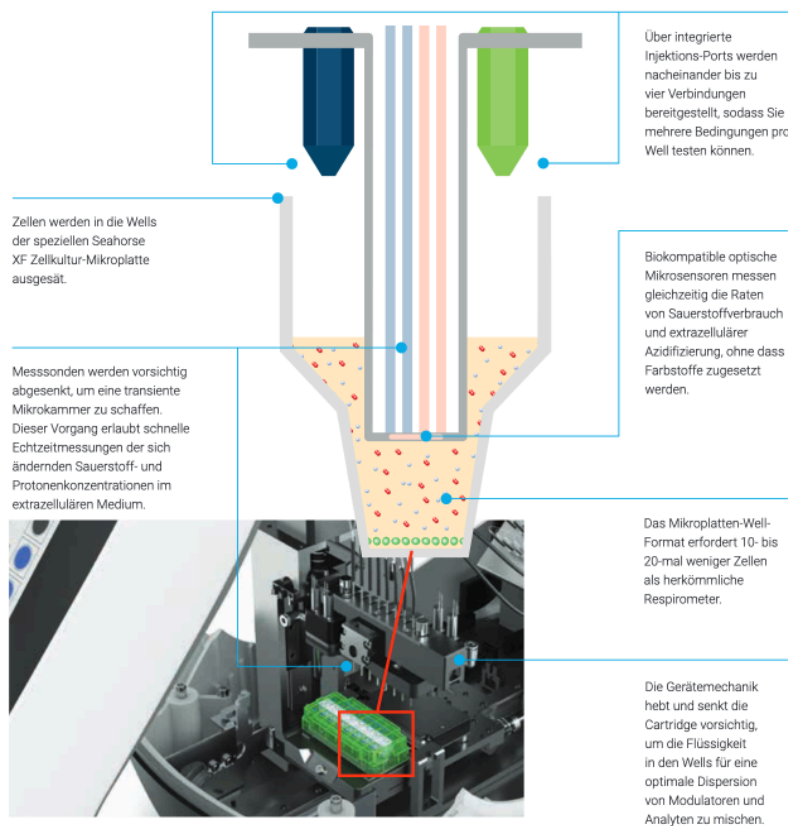


Abbildung 5: Seahorse XFp Analyzer. Schematische Darstellung der Technologie: Die Zellen werden in die Wells der speziellen Seahorse XF Zellkultur-Mikroplatten ausgesät. Über Ports werden nacheinander Reagenzien injiziert. In der Mikrokommer aus Zellen bzw. Zellsuspension und Reagenzien werden über Messsonden die Stoffwechselvorgänge als veränderte Protonenkonzentration im extrazellulären Medium erfasst. Quelle: Broschüre von Agilent Entdecken Sie die wichtigsten Faktoren für Zellschicksal, -funktion und –fitness. Agilent Seahorse XF Analyseplattform 2021. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.

In dieser Arbeit wird der Stoffwechselweg der Glykolyse untersucht. Zur Untersuchung der glykolytischen Zellfunktion und Bestimmung der ECAR nutzte ich das Glycolysis Stress Test Kit (Agilent Technologies # 103017-100, Santa Clara, Vereinigte Staaten), das Seahorse XFp FluxPak (Agilent Technologies # 103022-100 Santa Clara, Vereinigte Staaten), das XF Base Medium Agilent Technologies # 103193-100 Santa Clara, Vereinigte Staaten) und Glutaminlösung (XF 200 mM Glutamin Solution, Agilent Technologies # 103579-100 Santa Clara, Vereinigte Staaten). Es wurden die Protokollschritte des Benutzerhandbuchs „Glycolysis Stress Test Kit User Guide“ von Agilent Technologies genutzt (Technologies, 2019).

Glukose wird über den Stoffwechselweg der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, welches im Zytoplasma zu Lactat, bzw. in den Mitochondrien zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut wird. Während dieser Stoffwechselvorgänge fließen Protonen aus der Zelle in den Extrazellulärraum, was zur Ansäuerung des umgebenden Mediums führt. Diese Ansäuerung wird mithilfe des Seahorse XFP Analyzer als extracellular acidification rate (ECAR) erfasst.

Ablauf des Assays: Im ersten Schritt werden die zu untersuchenden Zellen im Glykolyse Stress Test Medium inkubiert und die ECAR gemessen. Unter Abwesenheit von Glucose oder Pyruvat im Medium entspricht die gemessene ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung des extrazellulären Mediums und misst damit andere Stoffwechselvorgänge, neben der Glykolyse, die zu Protonenfluss führen. Anschließend wird Glucose injiziert, welche über Glykolyse zu ATP, NADH, Wasser und Protonen abgebaut wird. Die Ansäuerung des extrazellulären Mediums erfolgt durch den Protonenfluss und führt zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Als zweites Substrat wird Oligomycin injiziert. Oligomycin inhibiert die mitochondriale ATP Synthese, sodass die zelluläre Energiegewinnung ausschließlich über die zytoplasmatische Glykolyse abläuft. Die nun gemessene ECAR entspricht der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen.

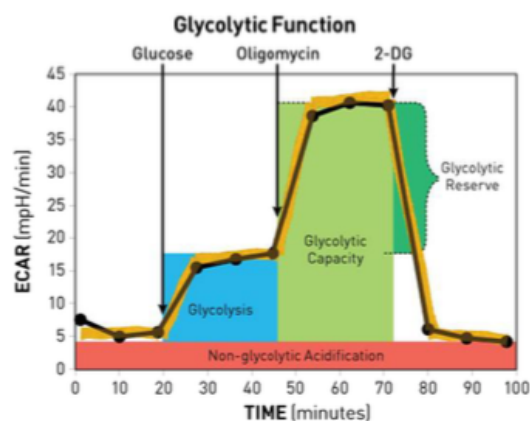


Abbildung 6: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Profil der glykolytischen Aktivität. Darstellung der Kit Injektionen und davon abhängig gemessene basale Glykolyse-Rate, maximale glykolytische Aktivität und glykolytische Reserve. Quelle: Agilent Technologies, Glycolysis Stress Test User Guide 2019. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.

Im letzten Schritt wird 2-Desoxy-Glucose (2-DG, 50 mM) injiziert. 2-DG ist ein Glukoseanalogon, welches durch kompetitive Bindung an die Hexokinase, dem ersten Enzym der Glykolyse, die Glykolyse inhibiert. Der nun messbare Abfall der ECAR dient als Beweis

dafür, dass der zuvor messbare Anstieg der ECAR auf den Stoffwechselweg der Glykolyse zurück zu führen ist. Die Differenz zwischen der maximalen glykolytischen Aktivität und der basalen Glykolyse-Rate entspricht der glykolytischen Reserve der Zellen. Die glykolytische Reserve gibt Hinweise auf die glykolytische Kapazität. Durch Oligomycin-Injektion wird die oxidative Phosphorylierung blockiert, sodass die Zellen nur über den Stoffwechselweg der Glykolyse Energie erzeugen, was als maximal gemessene ECAR der glykolytischen Kapazität der Zellen entspricht (s. Abb. 6).

### **7.6.2 Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer**

Die glykolytische Aktivität von Urinzellproben wurde mit Hilfe des Seahorse XFp Analyzer untersucht. Dazu wurde der Glykolyse Stress Test, anhand der Protokollschritte des Benutzerhandbuchs zur Verwendung des Glykolyse Stress Test Kit (Agilent Technologies, 2019, S. 1-18 Glycolysis Stress Test Kit User Guide) und des Benutzerhandbuchs zur Verwendung von Suspensionszellen (Agilent Technologies, 2017, S. 1-2 Seeding Suspension Cells in Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplates), mit einigen Modifikationen durchgeführt. Der Glykolyse Stress Test ist ein von Agilent entwickelter Assay, um den Stoffwechselweg der Glykolyse in Zellen zu messen. Die Schritte der Standardprotokolle von Agilent Technologies sind im folgenden Methodenteil aufgeführt. Die Modifikationen sind im Ergebnisteil unter 8.4 Ergebnisse Seahorse XFp-Messungen mit kultivierten Pompe-Urinepithelzellen und 8.5 Ergebnisse Seahorse XFp-Messungen aus dem nichtkultivierten Urinzellgemisch gesunder Proband\*innen aufgeführt.

Am Tag vor der Messung wurde die Zellkulturplatte (Seahorse XFp Miniplate) für die Zellsuspension mit Gelatine (0,1% Gelatine, 25µl pro Well bei RT trockenen lassen, Überstand abnehmen) beschichtet, um eine bessere Zelladhärenz zu gewährleisten. Zum Hybridisieren der Kassette (XFp sensor cartridge) wurden je 200 µl Seahorse XF Calibrant in die Wells und je 400µl Seahorse XF Calibrant in die umgebenden, äußeren Kammern der Kassette pipettiert. Anschließend wurde die Kassette mit Parafilm umwickelt und über Nacht in einem kohlenstoffdioxidfreien Inkubator bei 37°C eingelagert.

Compound(s)	Target	Effect on ECAR
Glucose	Glycolysis	Increase
Oligomycin <sup>*</sup>	ATP Synthase Complex V	Increase
2-DG <sup>†</sup>	Glycolysis	Decrease

<sup>\*</sup> Oligomycin is a mixture of Oligomycin A, B, and C with Oligomycin A  $\geq$  60%.

<sup>†</sup> 2-DG may appear clear, opaque (white), or as a mix of white solid and clear liquid. Appearance does not affect performance.

Abbildung 7: Agilent Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit Reagenzien. Quelle: Agilent Technologies, Glycolysis Stress Test User Guide 2019. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.

Am Tag der Messung wurde das Assaymedium nach den Protokollschritten des Benutzerhandbuchs (Agilent Technologies, 2019) vorbereitet. Die Urinzellgewinnung und Urinzellisolation erfolgten anhand der oben aufgeführten Protokollschritte. Zur Injektion der so gewonnenen Zellsuspension auf die vorbereitete Zellkulturplatte (Seahorse XFp Miniplate) wurden orientierend die Protokollschritte des Benutzerhandbuchs zur Verwendung von Suspensionszellen (Agilent Technologies, 2017, S. 1-2 Seeding Suspension Cells in Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplates) genutzt. Es wurden je 150  $\mu$ l Zellsuspension vom Falconboden in ein Well der mit Gelatine beschichteten Zellkulturplatte (Seahorse XFp Miniplate) pipettiert. Den mit den Buchstaben A und H gekennzeichneten Wells wurde keine Zellsuspension zugefügt, sie dienten als Kontrolle. Die optimale Zellkonzentration liegt laut Benutzerhandbuch zur Verwendung von Suspensionszellen zwischen  $1 \times 10^5$  und  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well (Agilent Technologies, 2017, S. 1-2 Seeding Suspension Cells in Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplates). Versuchsweise wurde die Zellzahl mittels Zellzähler (TC20<sup>TM</sup> Automated Cell Counter, #1450102, von BIO-RAD, Vereinigte Staaten) bestimmt. Eine genaue Zellzahlbestimmung mittels Zellcounter lieferte wiederholt ungenaue Ergebnisse, sodass die Methode der Zellzahlbestimmung nicht weiter angewandt wurde. Die Adhärenz und Anzahl der Zellen wurde mikroskopisch bestimmt. Durch mehrfache Wiederholung des Auftragens der Zellsuspension und Zentrifugation der Zellplatten bei 300 g für eine Minute konnte die Zelldichte erhöht werden und so die Zelldichte in den Wells einer Messung annähernd angeglichen werden. Ein quantitativer Vergleich der Messergebnisse ist aufgrund dieses Verfahrens nicht möglich.

Im Folgenden wurde in jedes Well 180  $\mu$ l Assaymedium (auch Well A und H als Kontrollen) pipettiert. In jede umgebende Kammer wurde je 400  $\mu$ l PBS pipettiert. Anschließend wurde die Zellkulturplatte für 30 Minuten in einen Kohlenstoffdioxidfreien Inkubator bei 37°C gegeben um die Temperatur der Proben zu äquilibrieren.

Um die Stammlösungen anzusetzen, wurde den Kit-Komponenten die entsprechenden Mengen an Assaymedium zugefügt (s. Abb. 8). Die Kassette wurde aus dem Inkubator genommen und die Ports wurden mit den entsprechenden Mengen der Stammlösungen befüllt.

<b>Compound</b>	<b>Volume of assay medium</b>	<b>Resulting stock concentration</b>
Glucose	3,000 µL	100 mM
Oligomycin	720 µL	100 µM
2-DG	3,000 µL	500 mM

Abbildung 8: Vorbereitung der Stammlösungen. Quelle: Agilent Technologies, Glycolysis Stress Test User Guide 2019. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.

Zum Start der Messung wurde der Seahorse XFp Analyzer gestartet, der Glykosis Stress Test ausgewählt, die Kassette eingelegt und die Kalibrierung gestartet. Anschließend wurde die Zellkulturplatte eingesetzt und die Messung gestartet. Am Ende jeder Messung wurde erneut die Zelladhärenz unter dem Mikroskop geprüft.

### **7.6.3 Messung der glykolytischen Aktivität von Myoblasten mittels Seahorse XFp Analyzer**

Die Bioplate stammen aus der Muskelgewebesammlung des Friedrich-Baur-Institutes. Die Proben wurden aufbereitet, kultiviert und kryokonserviert.

Zur Testung wurden die Myoblasten-Zellkulturen aufgetaut und Myoblasten auf Zellkulturplatten ausgesät. Nach drei Tagen wurden die Zellen für die Seahorse-Messung vorbereitet. Nach Trypsinisierung wurden in jedes Well der Zellkulturplatte (Seahorse XFp Miniplate) eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Die Zellkonzentration wurde mittels Zellcounter bestimmt. Nach dem Aussähen wurde die Zellkulturplatte über Nacht in einem Kohlenstoffdioxidfreien Inkubator bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte wurden wie unter Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer durchgeführt.

## **8 Ergebnisse**

Zu Beginn werden die etablierten Methoden der Urinprobengewinnung und Urinzellisolation beschrieben. Anschließend wird die Urinzellexpansion mit den entsprechenden Modifikationen des im Methodenteil aufgeführten Standardprotokolls beschrieben. Die letzten beiden Abschnitte des Ergebnisteils umfassen einerseits die modifizierten, neu etablierten Protokolle für Seahorse-Messungen mit Urinepithelzellen als auch die Auswertung der Seahorse-Messung von kultivierten Urinepithelzellen und die Auswertungen der Messungen der isolierten Zellen aus frischen Urinproben.

### **8.1 Ergebnisse Urinprobengewinnung**

Die Urinzellisolation erfolgte anhand der Protokollschritte die im Methodenteil 6.1 Urinprobengewinnung und 6.2 Urinzellisolation aufgeführt sind. Keiner der Proband\*innen und Patient\*innen gab Probleme bei der Urinprobengewinnung an. Die in der Literatur beschriebene einfache, nicht-invasive und kostengünstige Probengewinnung konnte bestätigt werden.

Um die Proben vor Kontamination zu schützen und die Integrität der Zellen zu bewahren, wurden die Proben der Proband\*innen möglichst direkt nach Probengewinnung isoliert. War eine direkte Isolation zeitlich nicht möglich, wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Die Urinprobengewinnung der Pompe-Patient\*innen erfolgte am Friedrich-Baur-Institut. Die Proben wurden nach Gewinnung auf Eis gekühlt zum Labor transportiert. Alle gekühlten Proben wurden maximal drei Stunden nach Gewinnung für die Urinzellisolation genutzt.

### **8.2 Ergebnisse Urinzellisolation und Urinzellexpansion**

Es wurden insgesamt 104 Urinproben untersucht, 98 Proben von gesunden Proband\*innen und sechs Proben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen (siehe Tabelle 1). Es wurden Probepolumina von minimal 25 ml und maximal 350 ml verwendet. Alle Proben wurden bis maximal drei Stunden nach Abgabe nach dem Standardprotokoll zur Urinzellisolation, wie im Methodenteil unter 6.1 Urinprobengewinnung und 6.2 Urinzellisolation aufgeführt sind, aufbereitet. Die Proben wurden auf 12-Well-Zellkulturplatten aufgetragen. Die Platten waren unbeschichtet oder beschichtet mit Gelatine, Polylysin, Kollagen, Laminin oder Matrigel. Die Urinzellexpansion erfolgte weitestgehend nach dem Standardprotokoll, wie im Methodenteil unter 6.4.1 Standardprotokoll zur Urinzellexpansion beschrieben. Abweichungen vom Standardprotokoll sind in diesem Kapitel aufgeführt. In 13 Proben ließen sich

Urinepithelzellkolonien kultivieren (siehe Tabelle 4). In keiner der Proben wurde die gewünschte Zelldichte erreicht.

Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Urinzellkultivierung. Von insgesamt 104 Proben konnte in 13 Proben mikroskopisch Urinzellkolonien nachgewiesen werden.

Kontroll-/ Patient*innen- nummer	Alter in Jahren	Geschlecht m/w	Volumen in ml	Beschichtung	Datum 1. mikroskopisch gesichteten Kolonie
K 2	35	m	50	unbeschichtet	Tag 13
K 5	22	w	50	unbeschichtet	Tag 13
K 3	36	m	50	unbeschichtet	Tag 13
K 2	35	m	30	Gelatine	Tag 10
K 2	35	m	30	Polylysin	Tag 10
K 2	35	m	30	Kollagen	Tag 9
K 2	35	m	30	Matrigel	Tag 9
K 7	62	m	25	Gelatine	Tag 9
K 2	35	m	100	Gelatine	Tag 6
K 2	35	m	100	unbeschichtet	Tag 6
K 2	35	m	100	unbeschichtet	Tag 6
K 2	35	m	350	Gelatine	Tag 10
P 2	58	m	130	Gelatine	Tag 9

Die Urinzellisolation erfolgte nach den im Methodenteil unter 6.2 Urinzellisolation beschriebenen Protokollschritten und erforderten einen Zeitaufwand von ca. 30 Minuten pro Probe.

Die Zelldichte in den Proben nach Urinzellisolation variierte stark (s. Abb. 9).



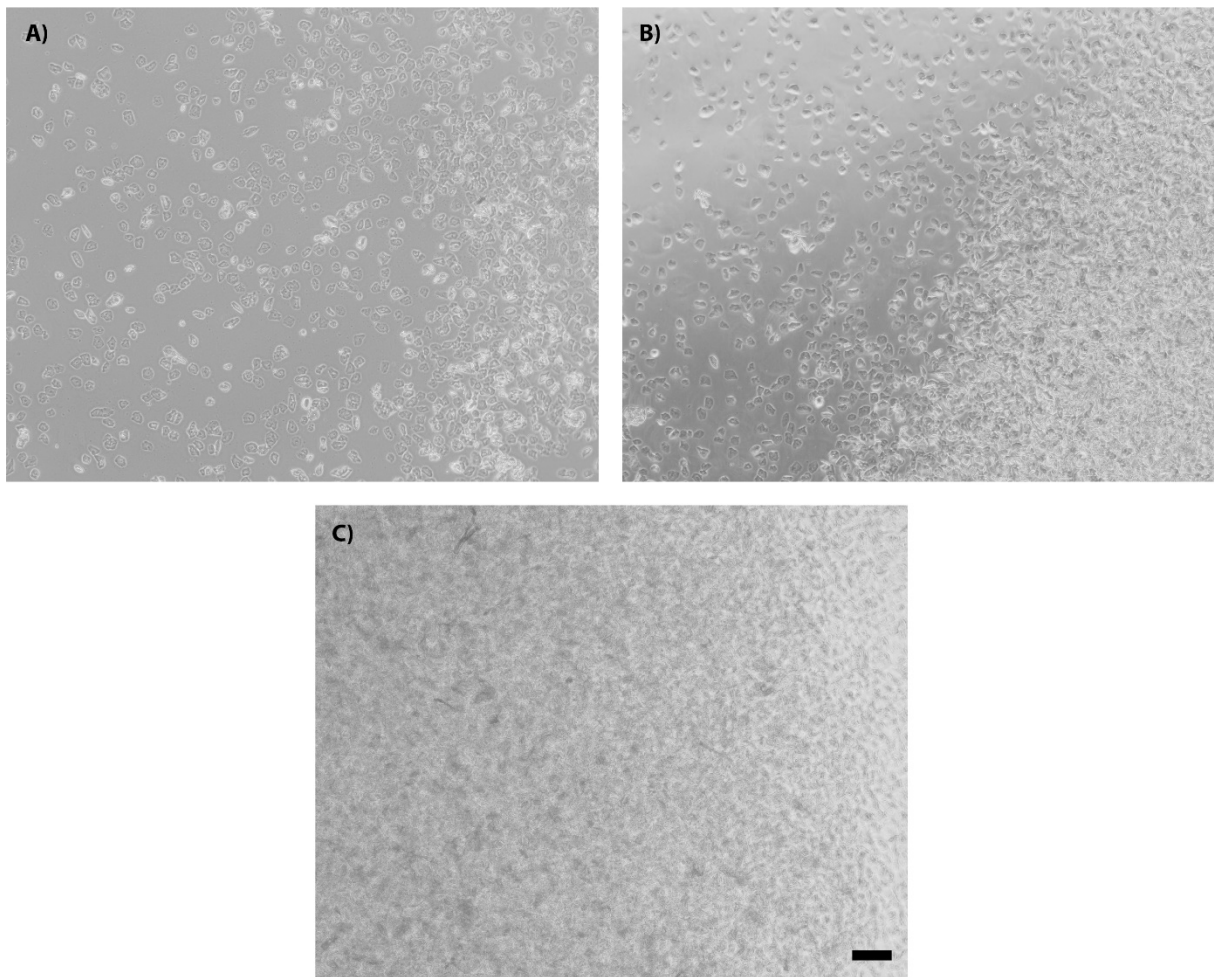


Abbildung 9: Darstellung der variierenden Zelldichte in Urinproben kurz nach Urinzellisolation. Die Urinproben stammten von der weiblichen Kontrolle 1 und umfassten jeweils 100 ml. Die drei Proben wurden am gleichen Tag zu unterschiedlichen Tageszeiten entnommen und direkt im Anschluss nach gleichem Verfahren isoliert und kultiviert. Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 10 A-D sind Fotos von mikroskopischen Aufnahmen von auf Zellkultur Multiwellplatten aufgetragenen Zellsuspensionen wenige Tage nach erfolgter Urinzellisolation dargestellt. In allen Proben waren die Zellen in der Suspension beweglich und hafteten nicht am Well-Boden an. Mikroskopisch ließ sich ein Zellgemisch aus überwiegend Plattenepithelzellen, einigen Blutzellen und in manchen Proben Lipidtröpfchen feststellen. Urinepithelzellen ließen sich während der ersten Tage der Urinzellexpansion schwer im Zellgemisch erkennen. Vor allem weibliche Urinproben waren zellreich, mit einem überwiegenden Anteil an Plattenepithelzellen (s. Abb. 11 A). Männliche Urinproben waren durchschnittlich zellärmer, mit einem höheren Anteil an Blutzellen und Lipidtröpfchen (s. Abb. 11 B).

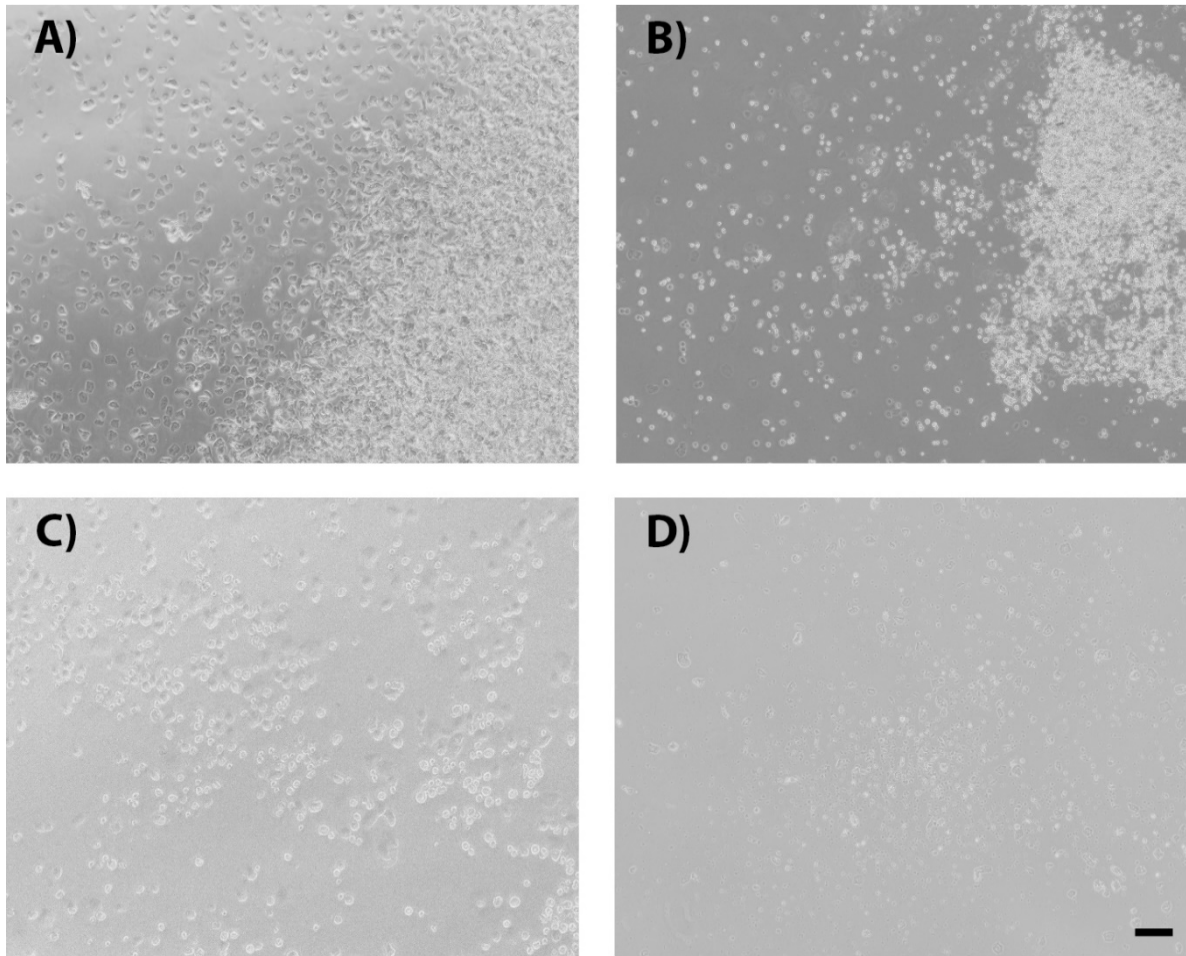


Abbildung 10: Mikroskopische Abbildung von Urinzellen kurz nach Zellisolation. A): Zellisolation aus einer Probe von Probandin 1, Aufnahme am vierten Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich vermutlich hauptsächlich um Plattenepithelzellen. B): Zellisolation aus einer Probe von Proband 2, Aufnahme am vierten Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich bei den dominierenden rundlichen Zellen vermutlich um Blutzellen. C): Zellisolation aus einer Probe von Proband 2, Aufnahme am dritter Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich bei den dominierenden rundlichen Zellen vermutlich um Blutzellen, Lipidtröpfchen und abgestorbenen Zellen. D): Zellisolation aus einer Probe von Probandin 5, Aufnahme am zweiten Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich wahrscheinlich um abgestorbene Zellen, Plattenepithelzellen und einige Blutzellen. A)-D): Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .

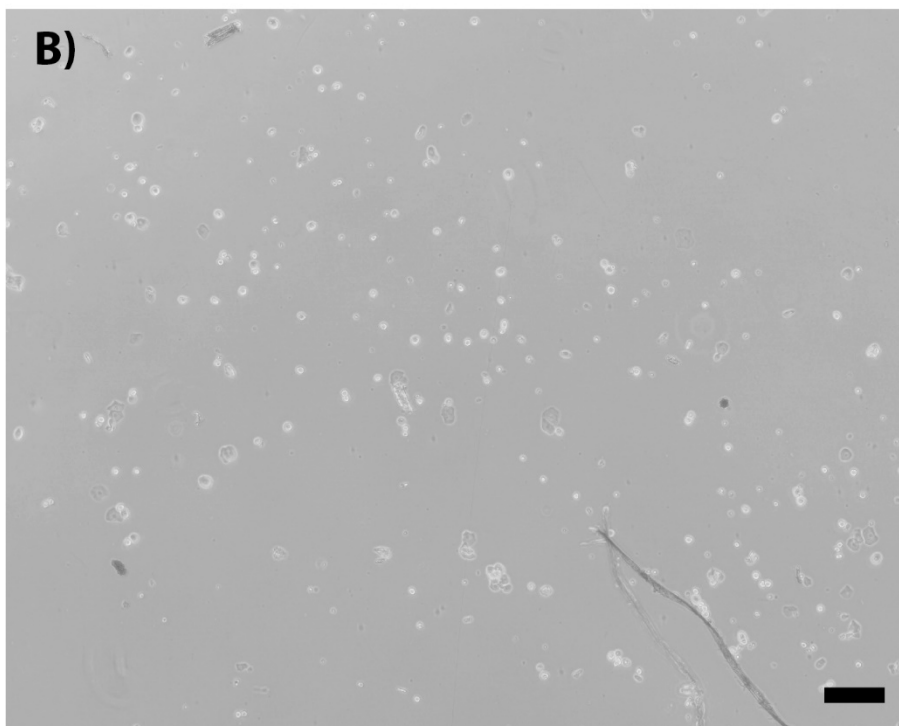
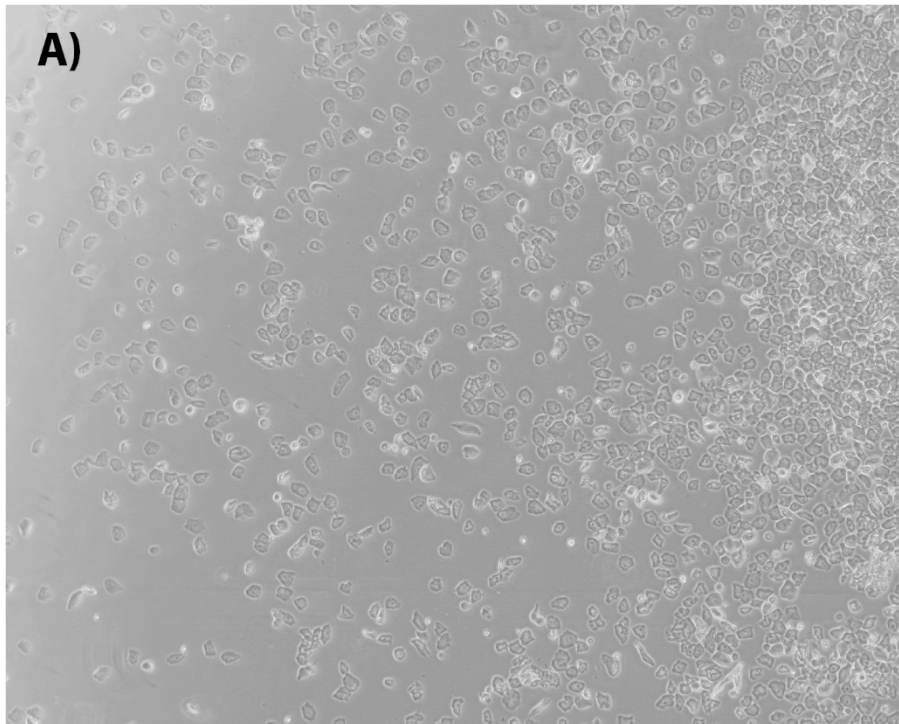


Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen Urinzellkulturen.

A): Urinzellkultur aus 100 ml Urinprobe der weiblichen Kontrolle 5 am dritten Tag nach Urinzellisolation.

B): Urinzellkultur aus 200 ml Urinprobe der männlichen Kontrolle 2 am dritten Tag nach Urinzellisolation.

A)-B): Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .

Im Zuge der Urinzellkultivierung können zwei morphologisch verschiedene Urinzell-kolonie-typen observiert werden, welche als Typ I und Typ II benannt werden (Dörrenhaus et al., 2000;

Felix et al., 1979; Zhou et al., 2012). Typ I Zellen werden morphologisch durch unregelmäßige Zellkonturen charakterisiert (s. Abb. 12 A). Teilweise finden sich spindelförmige Zellen in den unregelmäßig angeordneten Typ-I-Kolonien. Typ II Zellen sind kleiner und morphologisch durch glattkantige Konturen beschrieben (s. Abb. 12 B). Im Zuge der Versuchsreihen konnten beide in der Literatur beschriebenen Kolonie-Morphologien beobachtet werden. In den meisten Proben waren Typ-II Zellen aufzufinden, welche auch in der Literatur als schneller proliferierend beschrieben werden (Zhou et al., 2012).

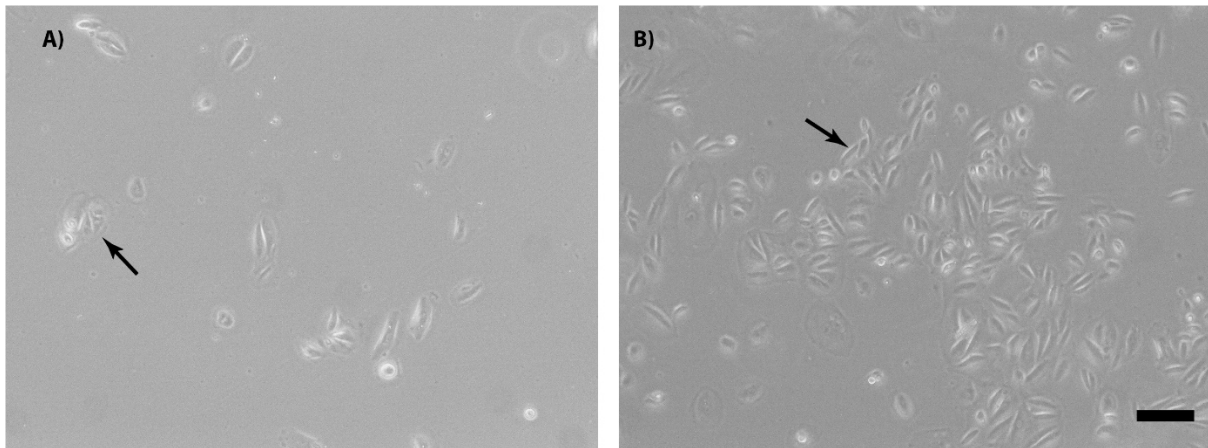


Abbildung 12: Mikroskopische Fotos von Urinepithelzell-Kolonien.  
 A): Zellkultur aus einer Urinprobe von Kontrolle 3. Aufnahme am Tag 26 nach Urinzellisolation. Typ I Zellen sind mit Pfeil markiert.  
 B): Zellkultur aus einer Urinprobe von Kontrolle 2. Aufnahme am Tag 26 nach Urinzellisolation. Typ II Zellen sind mit Pfeil markiert.  
 A)-B): Scale-Bar: 100 µm.

Erste adhärenente, proliferierende Zellen waren frühestens am vierten Tag nach Urinzellisolation mikroskopisch sichtbar. Die Zellen wurden mikroskopisch beurteilt und morphologisch mit in der Literatur beschriebenen Zellen verglichen (Dörrenhaus et al., 2000; Felix & Littlefield, 1979; Zhou et al., 2012). Bildeten sich Urinzellkolonien aus, proliferierten die Kolonien bis durchschnittlich Tag 14, dann stagnierte das Koloniewachstum und in den darauffolgenden Tagen begannen die Zellen apoptotisch zu werden. Der Verlauf einer Urinzell-expansion ist in Abb. 13 A-I eines gesunden, männlichen Probanden von Tag 1 bis Tag 43 anhand von mikroskopischen Aufnahmen der Zellkultur dargestellt.

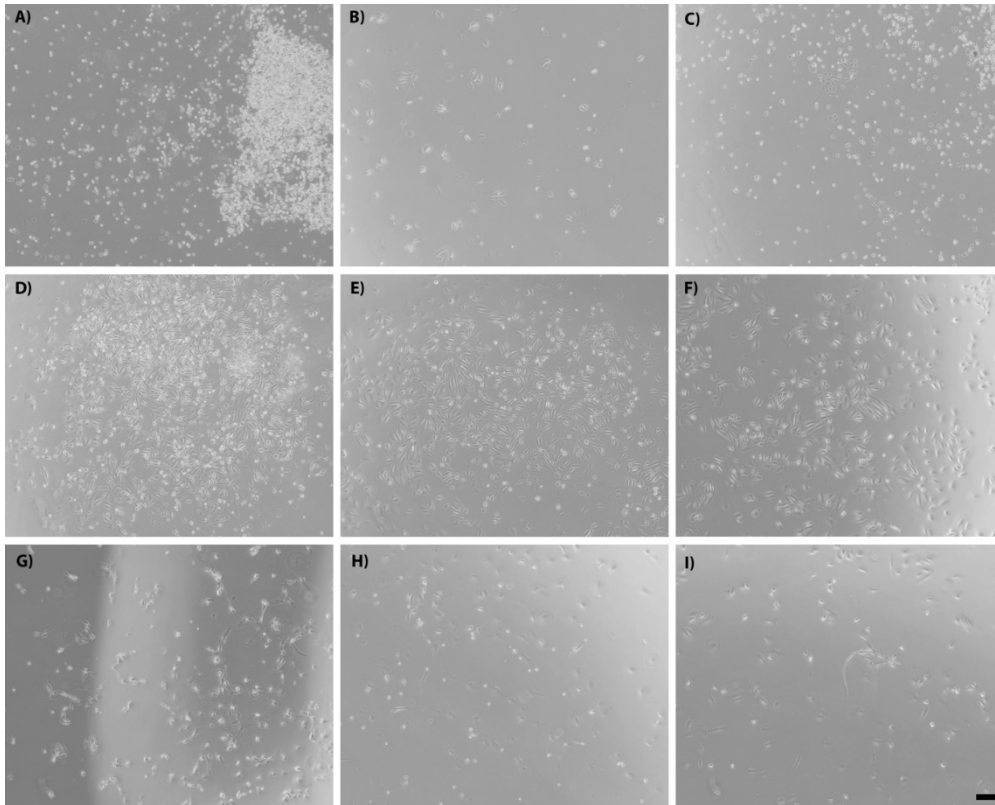


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahmen einer Urinzellkultur an verschiedenen Tagen. Die Probe stammt von der Kontrolle 2. Die Aufnahmen zeigen die Urinzellkultur im zeitlichen Verlauf der Urinzellexpansion von Tag 1 bis Tag 43.

- A): Aufnahme am Tag 1 nach Urinzellisolation. Mikroskopisch zeigten sich viele nicht adhärenz Zellen.
- B): Tag 4 nach Urinzellisolation. Erste adhärenz Zellen, vermutlich handelt es sich um proliferierende Urinepithelzellen.
- C): Tag 7 nach Urinzellisolation; Proliferierende Zellen, welche eine Zellkolonie bilden. Weiterhin viele nicht adhärenz Zellen.
- D): Tag 15 nach Urinzellisolation. Es bildet sich eine dichte Zellkolonie.
- E): Wachsende Zellkolonie, welche nach bildmorphologischem Vergleich hauptsächlich Urinepithelzellen vom Typ II entspricht.
- F)-I): keine weitere Proliferation der Zellen, die Zellen werden zunehmend apoptotisch
- F): Tag 22 nach Urinzellisolation.
- G): Tag 27 nach Urinzellisolation.
- H): Tag 30 nach Urinzellisolation.
- I): Tag 38 nach Urinzellisolation
- J): Tag 43 nach Urinzellisolation.
- A)-F): Scale Bar 200 µm.

In zellreichen Kulturen war es nicht möglich mikroskopisch zu prüfen, ob sich Urinepithelzellen am Well-Boden absetzten und die gewünschten Zellkolonien ausbildeten. Um die Hypothese zu prüfen, dass zu viele nicht adhärenz, abgestorbene Zellen das Wachstum proliferationsfähiger Zellen behindern, wurde das Standardprotokoll modifiziert. In der Literatur war die Ausbildung von Zellkolonien durchschnittlich nach vier bis sechs Tagen beschrieben (Dörrenhaus et al., 2000; Felix & Littlefield, 1979; Zhou et al., 2012). Um die Adhärenz der Zellen in den ersten Tagen zu gewährleisten, wurden zellreiche Proben testweise frühestens

ab Tag 4 nach Urinzellisolation mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde die Zelldichte mikroskopisch geprüft. Wie in Abb. 14 exemplarisch dargestellt war die Zelldichte in den Urinzellkulturen reduziert. Die Adhärenz der verbleibenden Zellen war jedoch nicht verbessert und in keiner der gewaschenen Proben waren Zellkolonien nachweisbar.

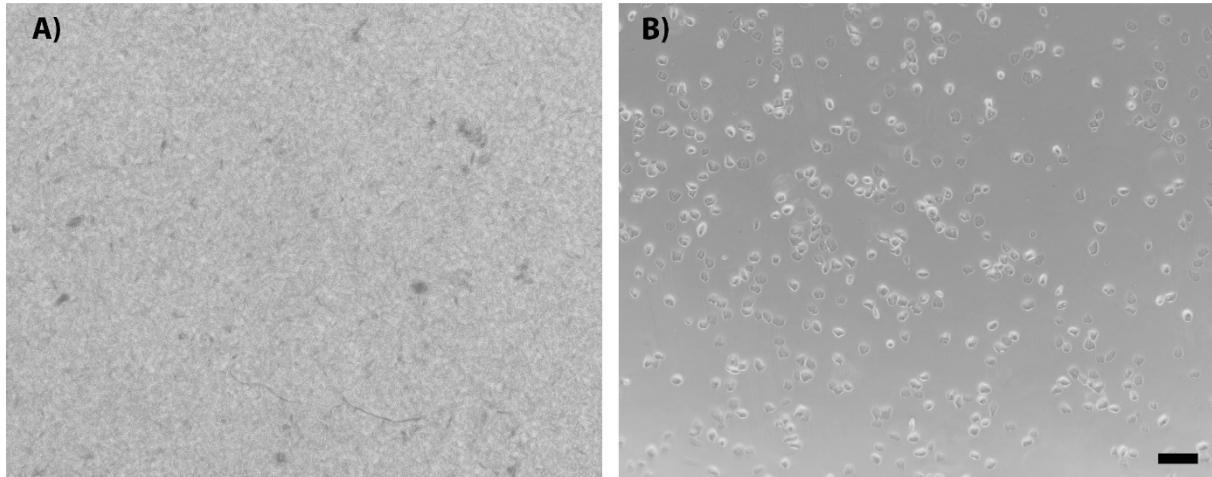


Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme von einer Urinzellkultur vor und nach Waschen mit DPBS. Die Urinzellisolation erfolgte aus einer 50 ml Urinprobe der weiblichen Kontrolle 4.  
A): Zellreiche Probe mit v.a. Plattenepithelzellen, Aufnahme an Tag 2 nach Zellisolation.  
B): Deutliche Zellreduktion nach Waschen des Wells. Aufnahme von Tag 7 nach Zellisolation  
A)-B): Scale Bar 200 µm

Für 52 Proben wurden die Wells nach dem Protokoll von Zhou et al. (Zhou et al., 2012) mit 0,1%iger Gelatine beschichtet. Da sich in den ersten Versuchsreihen keine Zellkolonien bildeten, wurde das Protokoll modifiziert, um zu testen, ob andere Beschichtungen zu einer schnelleren und besseren Zelladhärenz führen. In einer Versuchsreihe mit 25 Urinproben wurden die 12-Well-Platten unbeschichtet belassen oder mit folgenden Chemikalien getestet: Kollagen, Laminin, Matrigel. Das genaue Vorgehen zur Beschichtung ist im Abschnitt 7.4 Beschichtungen aufgeführt. In fünf Zellkulturen bildeten sich Zellkolonien aus, mikroskopische Aufnahmen sind in Abb. 15 dargestellt. Vier der Zellkulturen wurden aus der gleichen Urinprobe isoliert und wuchsen auf den Beschichtungen mit Gelatine, Polylysin, Kollagen und Matrigel. Spätestens ab dem 20. Tag stagnierte das Wachstum der Kolonien in allen Proben und die Zellen begannen apoptotisch zu werden.

Zusammenfassend ließ sich durch keine der getesteten Beschichtungen eine Verbesserung des Zellwachstums nachweisen. In den 104 kultivierten Urinzellproben bildeten sich Zellkolonien auf 15,6 % der unbeschichteten Well-Platten und 11,1 % der beschichteten Well-Platten aus.

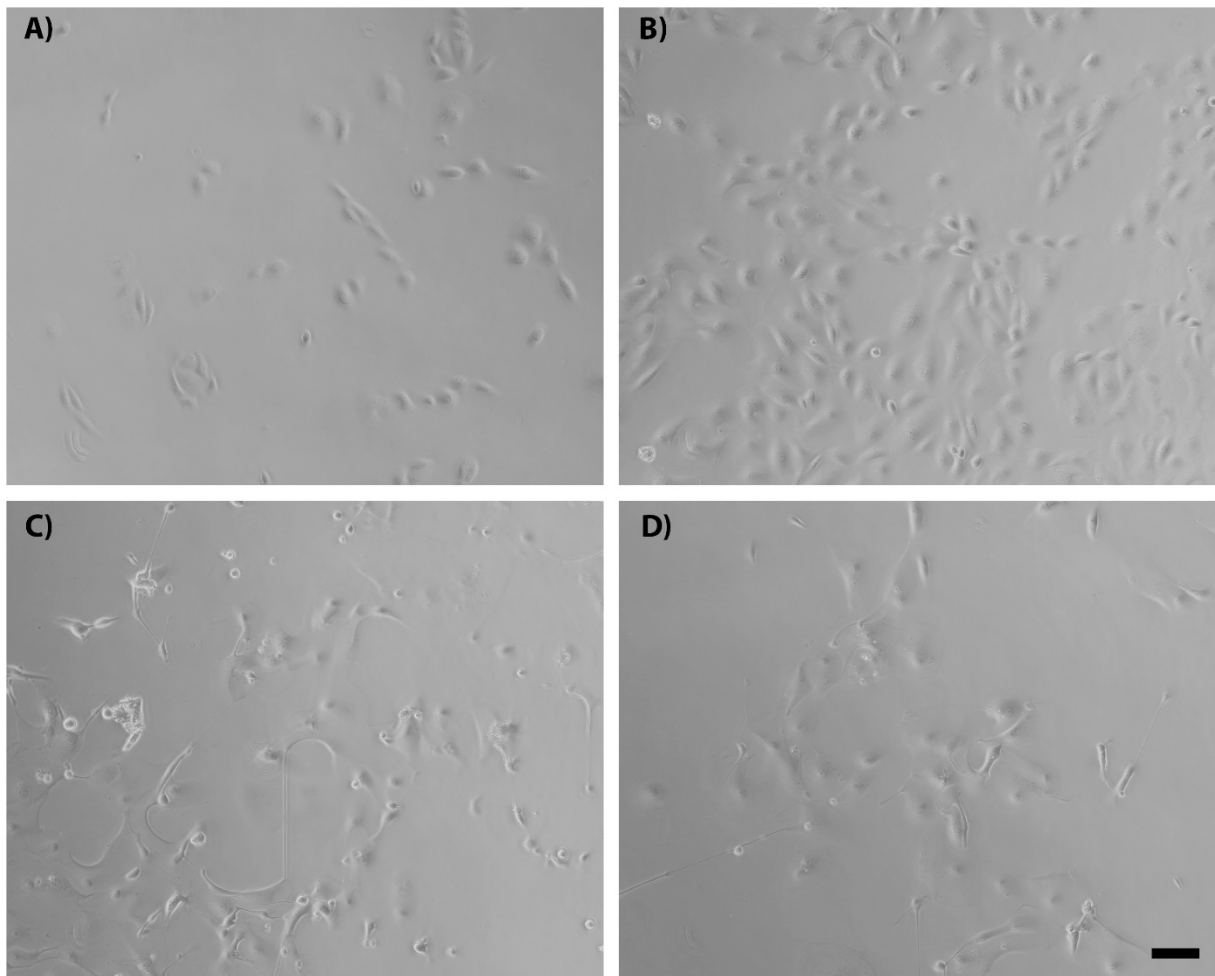


Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen von Urinepithelzell-Kolonien auf verschiedenen beschichteten Platten. Zur Urinzellisolation für die Zellkulturen wurde jeweils 30 ml Urin einer Probe von der männlichen Kontrolle 2 genutzt. Die Aufnahmen wurden an Tag 13 nach Urinzellisolation gemacht.  
 A):Gelatine  
 B):Kollagen  
 C):Matrigel  
 D):Polylysin  
 A)-D): Scale-Bar: 100  $\mu$ m.

Um zu testen, ob ein größeres Probenvolumen zu mehr Zellkolonien führt, wurden Zellen aus 38 Urinproben mit Volumina von 100 bis 350 ml kultiviert.

Bei Probenvolumina über 50 ml wurden die Proben zunächst in sterile 50 ml Reagenzgefäße überführt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur und 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und ein Restvolumen von 1 bis 5 ml belassen. Anschließend wurden die Proben eines Probanden vereinigt. Die weiteren Protokollschritte erfolgten nach dem im Methodenteil beschriebenen Standardprotokoll. In Proben mit höherem Urinprobenvolumen konnten durchschnittlich vier Tage früher Typ I und II Zellen beobachtet

werden, es konnten im Verlauf jedoch weder die Ausbildung von mehr noch von zellreicheren Kolonien beobachtet werden.

Da in keiner Probe die gewünschte Zelldichte erreicht wurde, wurden testweise zwei Proben mit mikroskopisch nachgewiesenem Urinepithelzell-Wachstum trypsinisiert, um zu testen, ob das Wachstum der Zellen angeregt wird, wenn diese nach Trypsinierung gleichmäßiger über eine Zellkulturplatte verteilt sind. Nach Trypsinierung und Auftragen der Zellsuspension auf eine neue 12-Well-Zellkulturplatte konnten einige Urinepithelzellen über die gesamte Zellkulturplatte verteilt gesehen werden. Diese proliferierten nicht weiter.

Da sich die Urinzellkultivierung zeitaufwendig gestaltete, wurden zwei Proben mit Urinepithelzellwachstum wie in der Literatur beschrieben (Felix & Littlefield, 1979; Zhou et al., 2012) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren, um die Haltbarkeit zu testen. Nach Auftauen und Auftragen der Zellsuspension auf Zellkulturplatten waren Urinepithelzellkolonien sichtbar, es zeigte sich jedoch kein Wachstum, die Zellen schienen nicht mehr proliferationsfähig zu sein.

Von den insgesamt 13 Proben aus denen sich Urinepithelzellkolonien kultivieren ließen, stammten 11 Proben von männlichen Probanden, eine Probe von einem männlichen Patienten und eine Probe von einer weiblichen Probandin. Alle Proben hatten eine niedrige bis mittlere Zelldichte. Neun der Proben stammten von dem gleichen Probanden, Kontrolle 2. Die verwendeten Proben umfassten ein Volumen zwischen 30 ml und 350 ml und Urinzellkulturen wuchsen auf verschiedenen Beschichtungen, sodass die Menge an proliferationsfähigen Zellen im Urinzellgemisch vor allem vom Individuum abzuhängen scheint.

Es wurden sechs Urinproben von Pompe Patient\*innen gesammelt und nach dem Standardprotokoll zur Urinzellisolation und -Expansion kultiviert. In einer der Proben wuchsen Kolonien, welche im Verlauf jedoch apoptotisch wurden, sodass die Kultivierung an Tag 22 beendet wurde und trotz mangelnder Zellmenge der Versuch einer Seahorse-Messung gestartet wurde.

Zusammenfassend zeigte sich das Koloniewachstum durchschnittlich später und langsamer, als in den aufgeführten Protokollen beschrieben. In allen Proben konnten in der ersten Woche kaum adhärente Zellen beobachtet werden. Der früheste Zeitpunkt an dem sich adhärente Urinepithelzellkolonien beobachten ließen, war an Tag 4 nach Urinzellisolation. Keine der getesteten Beschichtungen führte zur einer schnelleren und besseren Zelladhärenz. Ein höheres Probevolumen führte zur schnelleren Koloniausbildung. Zellkolonien proliferierten bis



maximal zu Tag 30. In keiner Urinzellkultur ließen sich Urinzellen über ein gesamtes Well kultivieren.

Insgesamt scheint die Menge an proliferationsfähigen Zellen im Urinzellgemisch vor allem vom Individuum abzuhängen.

### **8.3 Ergebnisse Seahorse XFp Messung mit Myoblasten**

Im ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Myoblasten im Glykolyse Stress Test Medium inkubiert und die ECAR gemessen. Unter Abwesenheit von Glucose oder Pyruvat im Medium entspricht die gemessene ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung des extrazellulären Mediums. Anschließend wurde Glucose injiziert, welche über Glykolyse zu ATP, NADH, Wasser und Protonen abgebaut wurde. Die Ansäuerung des extrazellulären Mediums erfolgte durch den Protonenfluss und führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht.

Als zweites Substrat wurde Oligomycin injiziert. Oligomycin inhibiert die mitochondriale ATP Synthese, sodass die zelluläre Energiegewinnung ausschließlich über die zytoplasmatische Glykolyse abläuft. Die nun gemessene ECAR entspricht der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Im letzten Schritt wurde 2-Desoxy-Glucose (2-DG) injiziert. 2-DG ist ein Glukose-analogon, welches durch kompetitive Bindung an die Hexokinase, dem ersten Enzym der Glykolyse, die Glykolyse inhibiert. Der messbare Abfall der ECAR dient als Beweis dafür, dass der zuvor messbare Anstieg der ECAR auf den Stoffwechselweg der Glykolyse zurück zu führen ist. Die Differenz zwischen der maximalen glykolytischen Aktivität und der basalen Glykolyse-Rate entspricht der glykolytischen Reserve der Zellen. Die auf die Zellzahl normalisierten Messwerte sind in Tabelle 5 angegeben und graphisch in Abb. 16 dargestellt.

Der Kurvenverlauf der glykolytischen Aktivität von P11 und K13 entspricht dem erwarteten Kurvenverlauf des Glykolyse Stress Test (Vergl. Abb. 6, aufgeführt im Methodenteil Einführung Seahorse XFp Analyse). Wie hypothetisch angenommen, liegen die Messwerte der Pompe-Myoblastenprobe in allen Messpunkten niedriger als die der gesunden Kontroll-Myoblastenprobe, die glykolytische Funktion der Pompe-Myoblasten ist im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Wie in Tabelle 5 dargestellt, sind die basale glykolytischen Aktivität, die glykolytische Kapazität und die glykolytische Reserve der Pompe-Myoblasten niedriger als die der Kontroll-Myoblasten. Die verminderte glykolytische Funktion der Pompe-Myoblasten sind auf die mangelnde Aktivität der  $\alpha$ -Glukosidase zurückzuführen. Methode und Ergebnisse wurden 2019 von Meinke et al. publiziert (Meinke et al., 2019).

Tabelle 5: Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Pompe Patienten Myoblastenprobe (P11) und einer Myoblastenprobe einer gesunden Kontrolle (K13). In der Tabelle sind die Ergebnisse der zwölf Messungen als auf die Zellzahl normalisierten ECAR-Werte in mpH/Min/10<sup>5</sup>Zellen der Wells E-D angegeben. Die Wells E-G wurden wie im Methodenteil unter 6.6 Seahorse XFp Analyse aufgeführt mit Myoblasten des Pompe Patienten P11 befüllt. Die Wells B-D wurden mit Myoblasten der gesunden Kontrolle K13 befüllt. Die drei Messungen zu den Messzeitpunkten 1-3 erfolgten vor Reagenzinjektion, die drei Messpunkte 4-6 erfolgten nach Injektion von Glucose, Messpunkte 7-9 erfolgten nach Injektion von Oligomycin und die Messpunkte 10-12 erfolgten nach Injektion von 2-DG. Aus den drei Messungen der Wells von P11 bzw. K13 wurden zu einem Messpunkt x jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Vergleicht man die Mittelwerte zwischen P11 und K13 der Messpunkte 1-12 fällt auf, dass die ECAR-Werte der Pompe-Proben in allen Messpunkten niedriger sind als die der gesunden Kontrolle.

Myoblasten-probe	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Einheit
P11	E	0,406	0,278	0,259	1,093	1,297	1,391	1,498	1,760	1,834	0,391	0,343	0,238	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
P11	F	0,389	0,278	0,266	1,188	1,397	1,503	1,750	1,916	1,992	0,489	0,381	0,268	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
P11	G	0,489	0,434	0,396	1,436	1,624	1,707	2,006	2,191	2,203	0,521	0,383	0,285	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
Mittelwert		0,428	0,330	0,307	1,239	1,439	1,534	1,751	1,955	2,010	0,467	0,369	0,264	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
StD		0,053	0,090	0,077	0,177	0,168	0,160	0,254	0,218	0,185	0,068	0,023	0,024	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
K13	B	1,927	1,175	1,154	3,683	4,427	4,917	6,006	6,730	7,068	1,643	1,177	0,982	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
K13	C	1,723	1,453	1,325	3,968	4,415	4,794	6,170	6,488	6,748	1,574	0,973	0,784	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
K13	D	1,593	1,471	1,347	3,793	4,173	4,533	5,748	6,108	6,389	1,513	1,016	0,807	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
Mittelwert		1,748	1,366	1,275	3,815	4,338	4,748	5,975	6,442	6,735	1,577	1,055	0,858	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
StD		0,168	0,166	0,106	0,143	0,143	0,196	0,213	0,313	0,340	0,065	0,107	0,108	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen

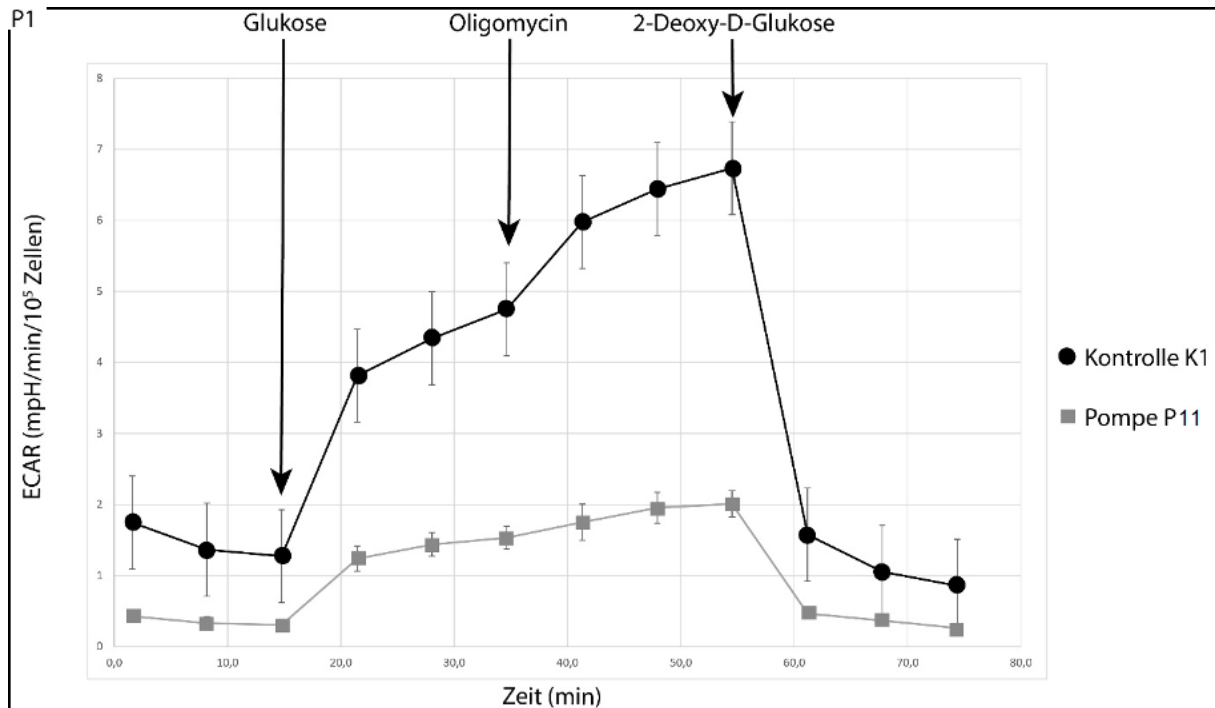


Abbildung 16: Graphische Darstellung der in Tabelle 5 aufgeführten Messwerte des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Pompe Myoblasten-Probe (P11) und einer Myoblastenprobe einer gesunden Kontrolle (K13). Darstellung der gemessenen glykolytischen Funktion als ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. Die gemessenen Werte der ECAR vor Reagenzinjektion kommen durch nicht-glykolytische Ansäuerung des umgebenden Mediums zustande. Nach der ersten Injektion von Glucose steigt die ECAR, die Messwerte entsprechen der basalen Glykolyserate der Zellen. Nach der Injektion von Oligomycin steigt die ECAR auf ihr Maximum, welches der glykolytischen Kapazität der Zellen entspricht. Durch Injektion von 2-DG fällt die ECAR auf den Wert, der durch die nicht-glykolytische Ansäuerung des Mediums erreicht wird. Die ECAR-Werte der gesunden Kontrolle K13 liegen in allen Messpunkten deutlich über denen des Pompe-Patienten P11.

Tabelle 6: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Pompe Myoblasten-Probe (P11) und einer Myoblastenprobe einer gesunden Kontrolle (K13): Berechnung der Glykolyse, Glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. Unter Abwesenheit von Glucose oder Pyruvat im Medium entspricht die gemessene ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung des extrazellulären Mediums. Als Messwert wurde die letzte Messung vor Glucose-Injektion, zum Zeitpunkt Messpunkt 3, gewählt. Die in Tabelle 6 aufgeführten Werte der nichtglykolytischen Ansäuerung von P11 und K13 wurden aus den Mittelwerten der Wells B-D (für K13) und E-G (für P11) berechnet (siehe Tabelle 5) Die Glucose-Injektion führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Zur Berechnung der Glykolyse-Rate wurden für P11 der Mittelwert der maximalen Messwerte der Messpunkte 4-6 der Wells E-G bzw. für K13 der Wells B-D bestimmt. Um die alleinige Glykolyse-Rate der Zellen zu berechnen, wurde von den Werten die Messwerte der nicht-glykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Nach Oligomycin-Injektion lief die zelluläre Energiegewinnung ausschließlich über die zytoplasmatische Glykolyse ab. Die nun gemessene ECAR entspricht der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Für die Berechnung der glykolytischen Kapazität wurde von den Mittelwerten der maximalen Messwerte der Messpunkte 7-9 die ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert.

Myoblasten-probe	Glykolyse	Glykolytische Kapazität	Glykolytische Reserve	Nicht-glykolytische Ansäuerung	Einheit
<b>P1</b>	1,23	1,70	0,48	0,31	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
<b>StD</b>	0,09	0,12	0,03	0,08	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
<b>K1</b>	3,47	5,46	1,99	1,28	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen
<b>StD</b>	0,29	0,44	0,15	0,11	mpH/Min/10 <sup>5</sup> Zellen

## **8.4 Ergebnisse Seahorse XFp Messung mit kultivierten Pompe-Urinepithelzellen**

In der Generierung von Zellkulturen konnte nur von einem der sechs Pompe Patient\*innen (P2, s. Tabelle 1) eine Kultur mit einer geringen Zellzahl gewonnen werden. Da diese Arbeit dazu dienen sollte, eine nichtinvasive Methode zur Gewinnung und metabolischen Messung von Patient\*innen Zellen zu entwickeln, wurde bei dieser Zellkultur eine Seahorse-Messung durchgeführt.

Urinzellisolation und Urinzellexpansion erfolgten gemäß den im Methodenteil unter 6.1 Urinprobengewinnung, 6.2 Urinzellisolation und 6.4 Zellkultur beschriebenen Protokollschritten. Da die Zellproliferation im Verlauf der Kultivierung stagnierte und mikroskopisch apoptotische Zellen nachgewiesen wurden, wurden die kultivierten Urinepithelzellen an Tag 23 nach Urinzellisolation für eine Seahorse-Messung genutzt. Da zu diesem Zeitpunkt nicht der gesamte Well-Boden mit Zellen bedeckt war, musste das Standardprotokoll modifizieren werden.

Die Vorbereitungsschritte am Vortag der Messung erfolgten zunächst wie im Methodenteil 6.5.2 Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer beschrieben.

Die Urinepithelzellen ließen sich mittels Trypsinierung von der 12-Well-Zellkulturplatte ablösen. Nach einmaligem Aufbringen der Zellsuspension und einmaligem Zentrifugieren war die mikroskopisch geprüfte Zelldichte zu gering für eine Messung. Durch mehrfaches Aufbringen von Zellsuspension auf die Zellkulturplatte mit anschließendem Zentrifugieren konnte die Zelldichte wie in Abb. 17 dargestellt, erhöht werden. Die genaue Vorgehensweise ist im Anhang unter 11.3 Protokoll Seahorse XFp Messung mit Pompe-Urinepithelzellen aus Zellkultur beschrieben. Aufgrund von zu wenig vorhandenem Zellmaterial konnte ich nur ein Well mit Zellsuspension befüllen und es gab keine Kontroll-Messung eines gesunden Probanden. Die weiteren Schritte erfolgten nach dem im Methodenteil unter 6.5.2 Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer beschrieben Standardprotokoll für Seahorse-Messungen.

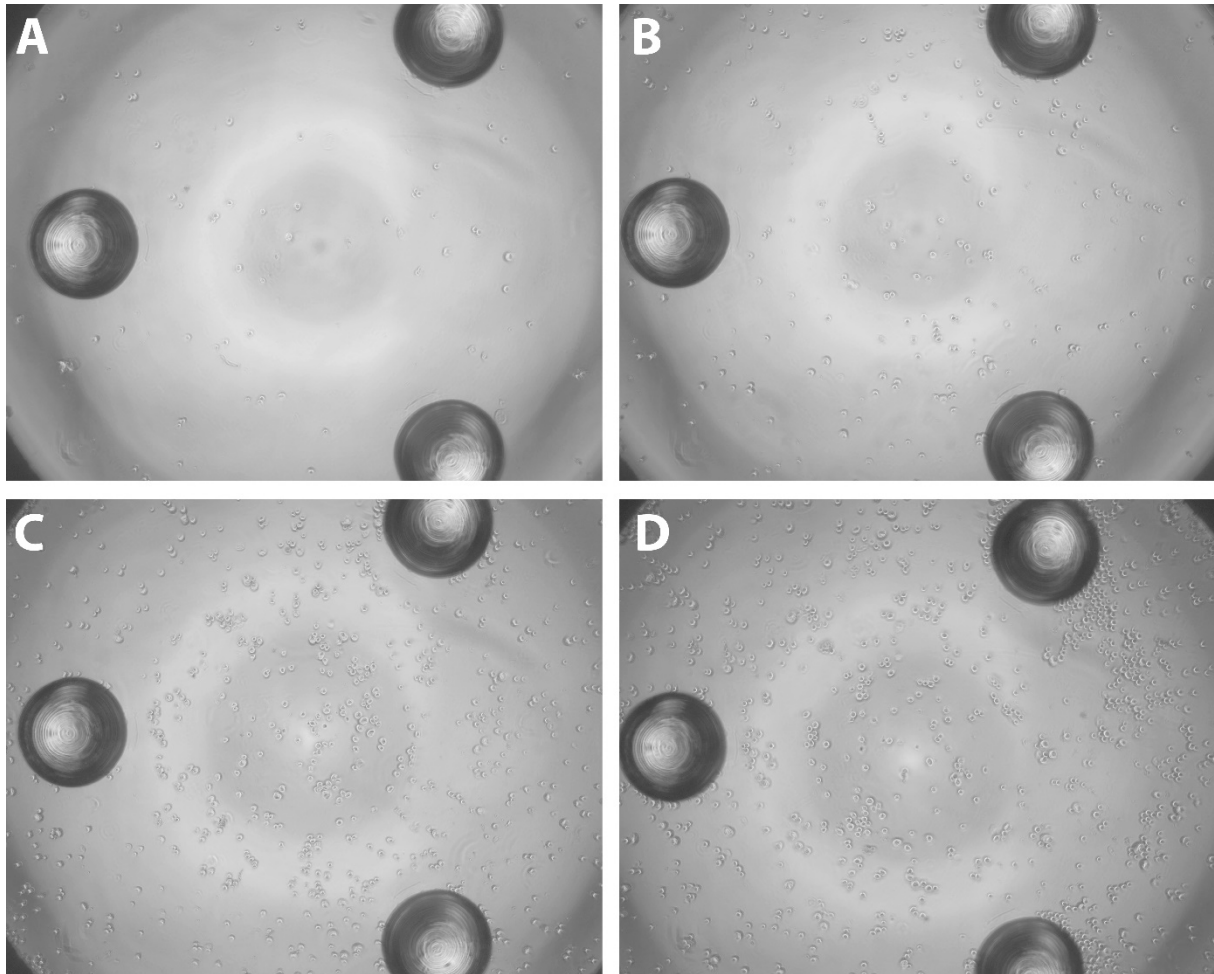


Abbildung 17: Fotos der mikroskopischen Ansicht von Urin-epithelzellen nach Zugabe von Trypsin zur Zellablösung. Beurteilung der Adhärenz nach Zentrifugation.  
 A): nach erster Zentrifugation  
 B): erhöhte Zelldichte nach zweiter Zentrifugation  
 C): erhöhte Zelldichte nach dritter Zentrifugation  
 D): erhöhte Zelldichte nach vierter Zentrifugation.

Da die Seahorse Messung nur in einem Well durchgeführt werden konnte, kann eine Aussage über die tatsächliche metabolische Aktivität der Epithelzellen nur bedingt getroffen werden. In Tabelle 7 sind die Rohdaten der Messung aufgeführt. Eine Normalisierung der Zellzahl war aufgrund der ungenauen Zellzahlbestimmung nicht möglich, weshalb die ECAR-Werte in mpH/Minute angegeben sind. Die Auswertung der Messung zeigt, dass glykolytisch aktive Zellen in der Urinzellkultur vorhanden waren. Aus den Messdaten der Tabelle 7 ergibt sich der Kurvenverlauf in Abb. 18 ein Kurvenverlauf, wie er auch von Agilent selbst für den Glycolysis Stress Test beschrieben wurde. In Tabelle 6 sind die aus den Messdaten berechneten Werte für die basale glykolytischen Aktivität, die glykolytische Kapazität und die glykolytische Reserve angegeben. Ein Vergleich zu einer gesunden Kontrolle war aufgrund mangelnder Zellen nicht möglich. Dadurch konnte die Hypothese, dass die glykolytische Funktion von

Urinzellen von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen niedriger ist, als die gesunder Probanden, nicht überprüft werden. Ein Vergleich der glykolytischen Funktion zwischen kultivierten Urinzellen und kultivierten Myoblasten ist aufgrund der ungenauen Zellzahlbestimmung der Urinzellprobe nicht möglich.

Tabelle 7: Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Urinzellprobe nach Zellkultivierung von Pompe Patient P2. In der Tabelle sind die Ergebnisse als Rohdaten der zwölf Messungen als ECAR-Werte in mpH/Min angegeben. Durch die vorangegangene Zellkultivierung konnte nur Zellmaterial für die Befüllung eines Wells kultiviert werden. Die Messung verlief ohne Kontrolle. Die drei Messungen zu den Messzeitpunkten 1-3 erfolgten vor Reagenzinjektion, die drei Messpunkte 4-6 erfolgten nach Injektion von Glucose, Messpunkte 7-9 erfolgten nach Injektion von Oligomycin und die Messpunkte 10-12 erfolgten nach Injektion von 2-DG.

Urinzell- probe	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Einheit
P2	B	1,95	2,75	3,01	5,06	4,88	4,91	7,58	6,72	6,22	2,62	1,11	0,79	mpH/Min

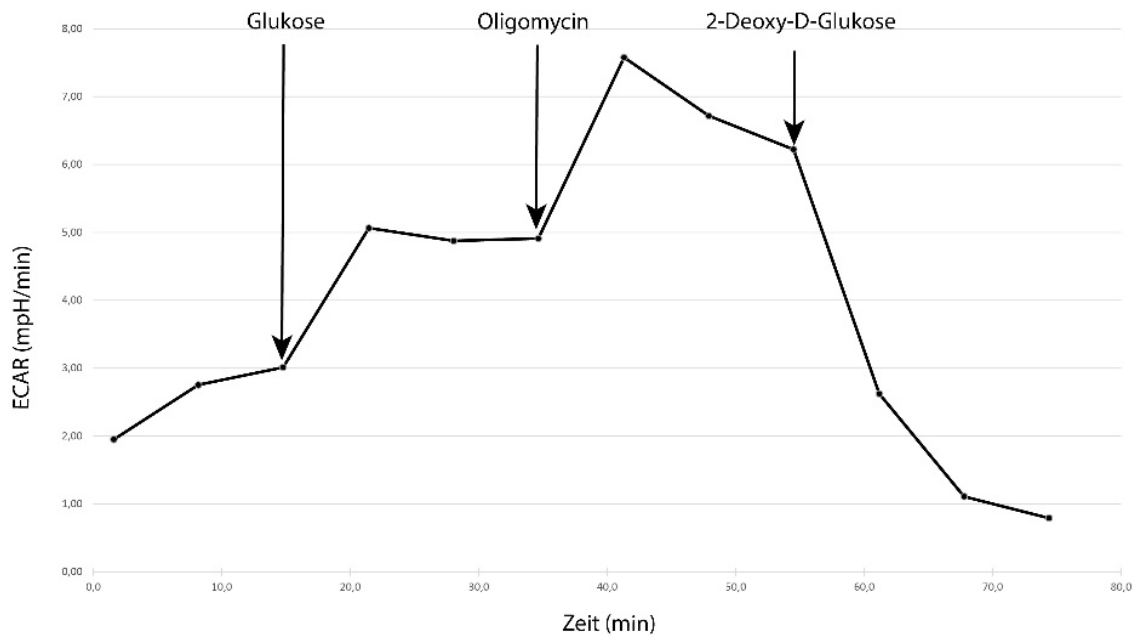


Abbildung 18: Graphische Darstellung der in Tabelle 7 aufgeführten Messwerte des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Urinepithelzellprobe von Patient 2 (P2). Darstellung der gemessenen glykolytischen Funktion als ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. Die gemessenen Werte der ECAR vor Reagenzinjektion kommen durch nicht-glykolytische Ansäuerung des umgebenden Mediums zustande. In den ersten 15 Min liegt die ECAR zwischen 100 und 200 mpH/min. Nach der ersten Injektion von Glucose steigt die ECAR in einem Zeitraum von 10 Min auf 350 mpH/min. Die ECAR entspricht der basalen Glykolyserate der Zellen. Nach der Injektion von Oligomycin 35 Min nach Beginn der Messung steigt die ECAR auf ihr Maximum von 500 mpH/min, welches der glykolytischen Kapazität der Zellen entspricht. Durch Injektion von 2-DG fällt die ECAR auf den Wert der durch die nicht-glykolytische Ansäuerung des Mediums erreicht wird.



Tabelle 8: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Urinzellprobe nach Zellkultivierung von Pompe Patient P2. Berechnung der Glykolyse, glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. Als Messwert für die nicht-glykolytischen Ansäuerung wurde die letzte Messung vor Glucose-Injektion, zum Zeitpunkt Messpunkt 3, gewählt. Die Glucose-Injektion führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Zur Berechnung der Glykolyse-Rate wurde der maximale Messwert der Messpunkte 4-6 bestimmt. Um die alleinige Glykolyse-Rate der Zellen zu berechnen wurde der Messwert der nicht-glykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Nach Oligomycin-Injektion entsprechen die gemessenen ECAR-Werte der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Für die Berechnung der glykolytischen Kapazität wurde von dem maximalen Messwert der Messpunkte 7-9 die ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Die Differenz zwischen der glykolytischen Kapazität und der basalen Glykolyse-Rate entspricht der glykolytischen Reserve der Zellen.

Urinzell- probe	Glykolyse	Glykolytische Kapazität	Glykolytische Reserve	Nicht- glykolytische Ansäuerung	Einheit
P2	2,05	4,56	2,51	3,01	mpH/Min

## 8.5 Ergebnisse Seahorse XFp Messungen aus dem nichtkultivierten Urinzellgemisch

Die Etablierung der Zellkultivierung von Urinepithelzellen im ersten Teil meiner Dissertation gestaltete sich zeitaufwändiger, als in den Bezugsprotokollen beschrieben. Zellkolonien bildeten sich nur in 12,5 % der 98 Proben von 12 Probanden. In keiner der Proben konnte genügend Zellmaterial für eine Seahorse-Messung einer Probe auf drei Wells kultiviert werden. Im Rahmen der Zellkultivierung musste täglich ein Mediumwechsel erfolgen. Aufgrund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes ist eine Etablierung im klinischen Alltag nicht vorstellbar. Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchte ich im zweiten Teil meiner Dissertation, ob das Urinzellgemisch nach Probengewinnung und Isolation der Urinzellen für Seahorse-Messungen geeignet ist. Modifikationen des Standardprotokolls und die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

Urinprobengewinnung und Urinzellisolation aller Proben erfolgte nach dem im Methodenteil unter 6.1 Urinprobengewinnung und 6.2 Urinzellisolation aufgeführten Standardprotokoll. Alle

Urinproben wurden am gleichen Tag der Probengewinnung aufbereitet und für Seahorse-Messungen verwendet.

Die Vorbereitungsschritte für die Seahorse-Messungen erfolgten nach dem unter 6.5.2 Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer beschriebenen Standardprotokoll.

Für eine Seahorse-Messung sollten annähernd ähnliche Zellkonzentration in den sechs Wells einer Zellkulturplatte sein, um die Messwerte vergleichen zu können. Um dies zu gewährleisten unternahm ich folgende Protokollmodifikationen:

War die Zelldichte zu gering, wurden vorsichtig 50 µl Medium pro Well abpipettiert und erneut 150 µl der Zellsuspension aufgetragen, die Platte wurde bei 300 g für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zelldichte wurde anschließend mikroskopisch überprüft.

War die Zelldichte zu hoch, wurde das Medium vorsichtig abpipettiert, dann das Well einmal mit 80 µl Assay-Medium gewaschen und anschließend 80 µl Assay-Medium hinzugegeben. Die Zelldichte wurde erneut mikroskopisch überprüft.

Durch diese Methode konnte in den Wells für die Messungen eine annähernd ähnliche Zellkonzentration erreicht werden. Quantitative Vergleiche der Messungen sind aufgrund der ungenauen Zellzahlbestimmung nicht möglich. Versuche die Zellkonzentration genau mittels Zellcounter zu bestimmen erwiesen sich ebenfalls als ungenau.

Im Folgenden sind zusammenfassend die Ergebnisse der zwölf Seahorse-Messungen beschrieben und in Tabelle 9 dargestellt. Detailliertes Vorgehen und Einzelergebnisse der Messungen sind im Anhang unter 11.4 Ausführliche Ergebnisse der Seahorse XFp Messungen mit Urinzellgemischproben beschrieben. In jeder Messung wurde je eine Probe eines/einer Pompe-Patient\*in und eine Probe eines/er gesunden Proband\*in als Kontrolle verwendet. Die Urinproben volumina umfassten minimal 80 ml und maximal 200 ml.

Tabelle 9: Zusammenfassende Darstellung der Seahorse-Messungen mit Urinzellgemisch als Proben. Für In jeder einzelnen Messung wurde die glykolytische Aktivität (GA) der Probe eines/r Proband\*in (K) mit der eines/r Patient\*in (P) gemessen. Glykolytische Aktivität, gemessen als ECAR, konnte in einer Probe von P5, K4 und P7 gemessen werden. GA = Glykolytische Aktivität, KP = Kontrollprobe, PP = Patient\*innenprobe.

Proband*in (K)	Alter in Jahren	Geschlecht m/w	Urinprobevolumen in ml	Patient*in (P)	Alter in Jahren	Geschlecht m/w	Urinprobevolumen in ml	GA messbar in KP	GA messbar in PP
K3	36	m	140	P 5	34	m	200	nein	ja
K1	26	w	200	P1	62	w	100	nein	nein
K1	26	w	50	P6	73	w	50	nein	nein
K4	38	w	150	P7	56	w	150	ja	Ja
K2	35	m	150	P5	34	m	150	nein	nein
K11	33	w	100	P8	43	w	50	nein	nein
K6	37	w	100	P6	73	w	100	nein	nein
K2	35	m	150	P9	67	m	50	nein	nein
K5	22	w	150	P10	50	w	100	nein	nein
K10	22	w	100	P 1	62	w	100	nein	nein
K12	36	m	100	P4	34	m	80	nein	nein
K7	62	m	80	P2	58	m	100	nein	nein

Glykolytische Aktivität konnte in zwei der Seahorse-Messungen nachgewiesen werden. In einer Messung waren glykolytisch aktive Zellen in den Proben von Pompe-Patient und Kontrolle, worauf die gemessenen ECAR-Werte hinweisen (s. Tabelle 10). Die gemessene glykolytische Aktivität beider Proben verhielt sich in den zwölf Messpunkten wie vom Hersteller des Glycolysis Stress Tests beschrieben. Ein Vergleich zwischen den Messwerten der kultivierten Urinepithelzellen oder Myoblasten ist aufgrund der ungenauen Zellzahlbestimmung nicht möglich. In einer weiteren Messung waren die ECAR-Werte ebenfalls hinweisend darauf, dass sich glykolytisch Aktive Zellen in einer Pompe-Probe befanden, die Messergebnisse sind im Anhang unter 11.4 Ausführliche Ergebnisse der Seahorse XFp Messungen mit Urinzellgemischproben aufgeführt. In zehn Messungen lagen die ermittelten ECAR-Werte unterhalb 10 mpH/Min, teils lagen die Messwerte im negativen Bereich, was bedeutet, dass keine glykolytische Aktivität messbar war. Die Messergebnisse eines Glycolysis Stress Tests sind exemplarisch in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10: Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung eines Pompe Patienten (P7) und einer gesunden Kontrolle (K4). In der Tabelle sind die Ergebnisse der zwölf Messungen als Rohdaten der gemessenen ECAR-Werte in mpH/Min der Wells E-D angegeben. Die Wells E-G wurden wie im Methodenteil unter 6.5.2 *Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp zAnalyzer* aufgeführt mit Zellen des Urinzellgemischs des Pompe Patienten P7 befüllt. Die Wells B-D wurden mit Zellen des Urinzellgemischs der gesunden Kontrolle K4

befüllt. In beiden Proben konnte glykolytische Aktivität der Zellen gemessen werden. Die drei Messungen zu den Messzeitpunkten 1-3 erfolgten vor Reagenzinjektion, nach Injektion von Glucose zeigten sich wie erwartet sowohl in den Wells von P7 als auch K4 ein Anstieg der ECAR in den Messpunkten 4-6. Nach Injektion von Oligomycin zeigten sich in beiden Proben die maximalen Messwerte (Messpunkte 7-9). Die Injektion von 2-DG führte wie erwartet zu einem Abfall der ECAR in den Messpunkten 10-12. Aus den drei Messungen der Wells von P7 bzw. K4 wurden zu einem Messpunkt x jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Ein Vergleich der Messwerte zwischen P7 und K4 ist aufgrund der ungenauen Zellzahlbestimmung nur eingeschränkt möglich.

Urinzell-probe	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Einheit
P7	E	21,79	20,17	19,08	56,73	56,38	57,60	58,57	58,17	59,22	18,53	10,97	8,66	mpH/Min
P7	F	20,36	17,33	15,82	50,75	53,52	56,68	52,86	57,11	59,43	17,10	11,27	9,48	mpH/Min
P7	G	17,45	18,24	17,16	49,94	48,95	50,10	53,99	53,19	54,18	17,69	8,98	6,23	mpH/Min
Mittelwert		19,87	18,58	17,35	52,47	52,95	54,80	55,14	56,16	57,61	17,77	10,41	8,12	mpH/Min
StD		2,21	1,45	1,64	3,71	3,75	4,09	3,03	2,62	2,97	0,72	1,25	1,69	mpH/Min
K4	B	21,76	20,79	19,66	55,66	56,44	59,03	59,04	60,13	61,67	20,78	12,86	10,22	mpH/Min
K4	C	24,51	21,97	20,78	56,71	58,57	60,95	57,42	59,59	60,73	24,25	13,37	10,99	mpH/Min
K4	D	23,06	23,07	21,57	60,18	58,14	58,87	61,55	60,76	61,66	22,04	12,05	9,54	mpH/Min
Mittelwert		23,11	21,94	20,67	57,51	57,72	59,62	59,34	60,16	61,35	22,36	12,76	10,25	mpH/Min
StD		1,38	1,14	0,96	2,36	1,13	1,15	2,08	0,58	0,54	1,76	0,67	0,73	mpH/Min

Tabelle 11: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung von Pompe Patienten (P7) und der gesunden Kontrolle (K4). Berechnung der Glykolyse, Glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. Als Messwerte für die nicht-glykolytischen Ansäuerung wurden die Mittelwerte der letzten Messungen vor Glucose-Injektion, zum Zeitpunkt Messpunkt 3, gewählt. Die Glucose-Injektion führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Zur Berechnung der Glykolyse-Rate wurden für P7 der Mittelwert der maximalen Messwerte der Messpunkte 4-6 der Wells E-G bzw. für K4 der Wells B-D bestimmt. Um die alleinige Glykolyse-Rate der Zellen zu berechnen wurden von den Werten die Messwerte der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Nach Oligomycin-Injektion entsprechen die gemessenen ECAR-Werte der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Für die Berechnung der glykolytischen Kapazität wurde von den Mittelwerten der maximalen Messwerte der Messpunkte 7-9 die ECAR der nicht-glykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Die Differenz zwischen der maximalen glykolytischen Aktivität, der glykolytischen Kapazität,

und der basalen Glykolyse-Rate entspricht der glykolytischen Reserve der Zellen.

Urinzell- probe	Glykolyse	Glykolytische Kapazität	Glykolytische Reserve	Nicht- glykolytische Ansäuerung	Einheit
<b>P7</b>	39,7	41,9	2,2	17,5	mpH/Min
<b>StD</b>	1,7	3,3	1,2	1,6	mpH/Min
<b>K4</b>	39,4	40,7	1,3	20,7	mpH/Min
<b>StD</b>	0,8	1,2	1,4	1,0	mpH/Min

Tabelle 12: Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung eines Pompe Patienten (P5) und einer gesunden Kontrolle (K3). Alle Messergebnisse der Probe von P5 liegen unterhalb von 5 mpH/Min. Alle Messergebnisse der Probe K3 liegen unterhalb von 0 mpH/Min. Aufgrund der negativen Werte sind die Messergebnisse nicht aussagekräftig, die Messung ist nicht verwertbar.

Urinzell-probe	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Einheit
P5	E	0,60	1,11	0,30	0,82	1,04	0,50	1,29	1,39	1,00	1,45	0,98	0,67	mpH/Min
P5	F	0,34	1,05	0,49	1,43	1,21	0,93	1,23	1,45	0,79	3,35	1,14	0,93	mpH/Min
P5	G	0,45	0,95	0,62	1,21	1,24	1,21	1,19	1,65	1,55	0,62	0,50	0,46	mpH/Min
K3	B	-4,71	-3,85	-3,95	-5,32	-4,79	-4,59	-2,55	-2,08	-2,39	-4,03	-2,96	-2,88	mpH/Min
K3	C	-4,26	-3,70	-3,69	-5,33	-4,43	-4,58	-2,56	-2,02	-2,31	-4,77	-3,44	-3,04	mpH/Min
K3	D	-4,21	-3,52	-3,67	-4,25	-3,61	-3,90	-2,38	-1,84	-2,03	-4,02	-3,07	-2,86	mpH/Min

Tabelle 13: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung von Pompe Patienten (P5) und der gesunden Kontrolle (K3). Berechnung der Glykolyse, Glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums.

Urinzell-probe	Glykolyse	Glykolytische Kapazität	Glykolytische Reserve	Nicht-glykolytische Ansäuerung	Einheit
P5		0,8	1,0	0,2	0,4 mpH/Min
StD		0,1	0,1	0,2	0,2 mpH/Min
K3		-0,4	1,8	2,2	-3,8 mpH/Min
StD		0,4	0,1	0,4	0,2 mpH/Min

Die insgesamt niedrigen oder negativen ECAR-Werte der Seahorse-Messungen weisen darauf hin, dass die Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung nicht genügend glykolytische Zellen enthalten, um charakteristische metabolische Profile durch Seahorse-Messungen zu erstellen. Demnach konnte die Hypothese, dass die glykolytische Funktion von gesunden Proband\*innen oberhalb der von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen liegen, nicht verifiziert oder widerlegt werden.

## 9 Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer neuen, nicht-invasiven diagnostischen Methode, die glykolytische Aktivität von Urinepithelzellen untersucht. Zielsetzung war die Erstellung metabolischer Profile von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen und gesunden Proband\*innen zum Monitoren der Krankheitsaktivität durch die Messung der glykolytischen Aktivität in Urinproben.

Im ersten Teil der Dissertation wurden Urinproben von 10 Pompe-Patient\*innen und gesunden 12 Proband\*innen gesammelt. Anschliessend wurden die Urinzellen isoliert und versucht proliferationsfähige, glykolytisch aktive Urinepithelzellen zu kultivieren. Die glykolytische Aktivität dieser Zellen sollte mittels Seahorse XFp Analyzer gemessen werden um charakteristische metabolische Profile zu erstellen.

Die Urinprobengewinnung und Urinzellisolation gestaltete sich wie in der Literatur beschrieben als einfache, schnelle und nicht-invasive Methode (Chamoles et al., 2004; Schüller et al., 2013; H. Zhang et al., 2006).

Die Urinzellexpansion hingegen erforderte einen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand. Die Zellen benötigten täglich frisches Medium, Kolonien bildeten sich durchschnittlich erst am neunten Tag aus und waren in nur 12,5 % aller Proben nachweisbar. Die Zellkolonien proliferierten langsam und führten in keiner der 104 Proben zu der erforderlichen Zelldichte für Seahorse-Messungen. Die Kultivierung von Urinzellen wird teils auch in der Literatur als aufwändig und unergiebig beschrieben (Felix & Littlefield, 1980; Felix, Sun, et al., 1980; Lazzeri et al., 2015; Y. Zhang et al., 2008). Als ursächlich werden vor allem der geringe Anteil an lebenden Zellen im Uringemisch, das geringe Anhaftungsvermögen aktiver und differenzierungsfähiger Zellen an die Zellkulturplatte, die kurze Lebensdauer und die toxische Umgebung des Urins aufgeführt (Felix & Littlefield, 1979; Y. Zhang et al., 2008).

Wie durch Y. Zang et al. beschrieben ist der Großteil an Zellen in einer Urinprobe ausdifferenziert. Nur etwa 0,1 % sind nicht ausdifferenziert (Y. Zhang et al., 2008). Außerdem machten Y. Zeng et al ebenfalls die Erfahrung, dass ein Großteil der lebenden Zellen nicht an den Kulturplatten anhaften (Y. Zhang et al., 2008). Dass sich in nur 12,5 % der Proben Urinepithelzellen ausbilden hängt vermutlich außerdem mit der kurzen Zellebensdauer zusammen. Dies wird durch Felix und Littlefield beschrieben. So weisen bereits biotisch gewonnene Urinepithelzellen eine kurze Lebensdauer auf, in natürlich abgeschiedenen Epithelzellen aus dem Urin ist diese weiter reduziert (Felix & Littlefield, 1979).

Um die Zellkultivierung zu verbessern wurden Protokollmodifikationen aus Arbeiten mit einer erfolgreichen Zellkultivierung übernommen. Beschichtungen der Zellkulturplatten führten laut Literaturangaben zu einer Verbesserung der initialen Anhaftung (Dörrenhaus et al., 2000; Rahmoune et al., 2005; Zhou et al., 2012). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen mit den Beschichtungen aus Gelatine, Matrigel, Kollagen, Polylysin und Laminin jedoch nicht bestätigt werden.

Laut Zouh et al. genügen 30 ml Probevolumen für eine erfolgreiche Zellkultivierung. Ein höheres Volumen würde jedoch zu mehr proliferationsfähigen Urinepithelzellen führen (Zhou et al., 2012). In eigenen Versuchsreihen bildeten sich Kolonien in Proben mit höherem Volumen durchschnittlich drei Tage früher aus, erreichten jedoch ebenfalls nicht die gewünschte Zelldichte.

Im Urinzellgemisch befinden sich viele abgestorbene Zellen (Felix & Littlefield, 1979). Um zu testen, ob die abgestorbenen Zellen sich negativ auf das Koloniewachstum auswirken wurde durch Mediumwechsel und Waschen von Proben mit DPBS versucht diesen abgestorbenen Zellanteil zu reduzieren. Nach dem Waschen zellreicher Proben ließ sich jedoch keine verbesserte Zellexpansion beobachten. Möglicherweise wurden durch den Vorgang auch proliferationsfähige Zellen, welche noch nicht an der Kulturplatte anhafteten, entfernt.

In zu dichten Kulturen ist die Lebensfähigkeit der Zellen reduziert (Zhou et al., 2012).

Im Protokoll nach Rahmoune et al. wurden kleine Zellkolonien, welche sich durchschnittlich nach einer Woche Zellkultivierung bildeten, für Subkulturen trypinisiert, wonach sich ein gutes Wachstum der Subkulturen zeigte (Rahmoune et al., 2005). In den eigenen Versuchen ließ sich der Effekt nicht bestätigen.

In den Arbeiten zur Urinzellexpansion wird ein regelmäßiger, oft täglicher, Mediumwechsel der Zellkulturen beschrieben, was im Laboralltag möglicherweise nicht immer gewährleistet ist. Im Hinblick darauf testete ich wie durch Zhou et al. und Felix und Littlefield (Felix & Littlefield, 1979; Zhou et al., 2012) beschrieben, ob Zellkulturen durch Kryokonservierung erhalten bleiben, was sich aber in eigenen Versuch an einer Probe nicht bestätigte. Diese Ergebnisse stehen unter dem Vorbehalt, dass die beschriebene Kryokonservierung nur bei einer Probe getestet wurde.

Durch keine der aufgeführten Modifikationen ließ sich also die Zellkultivierung optimieren. Das Urinzellkoloniewachstum schien vor allem von dem/der Spender\*in der Probe abhängig zu sein, ein Faktor welcher sich labortechnisch nicht beeinflussen lässt. Zouh et al. belegen in ihrer Studie hingegen, dass das Koloniewachstum unabhängig von Geschlecht und Spender\*in sei



(Zhou et al., 2012). Ein Faktor ist möglicherweise die Trinkmenge des Probenspenders. Kontrolle 2 gab an, täglich durchschnittlich 3-4 Liter zu trinken und bereits vor Urinprobenabgabe ausreichend getrunken zu haben, was zu einem höheren Volumen an Primär- und Sekundärharn führt und so möglicherweise zu einer höheren Ausscheidung an Urinepithelzellen führt.

Auch die weiblichen Kontrollen, welche zellreiche Proben hatten, gaben eine durchschnittliche Trinkmenge von 3 Litern täglich an. Kontrolle 3 und Kontrolle 7 hingegen gaben eine geringere Trinkmenge von durchschnittlich 1,5 Litern täglich an. Die Proben der beiden männlichen Kontrollen waren zellarm und Urinepithelzellen ließen sich nur in zwei Proben nachweisen. In den zellreichen Proben der weiblichen Kontrollen ließ sich im Vergleich zu der männlichen Kontrolle 2 seltener Koloniewachstum feststellen. In den weiblichen Proben waren mikroskopisch viele Plattenepithelzellen nachgewiesen, was wahrscheinlich das Absetzen von Urinepithelzellen am Well-Boden verhinderte. Abgestorbene Zellen und Zelltrümmer führen durch Lysierung zu unspezifischer Ansäuerung des Zellmediums, was sich wahrscheinlich negativ auf das Koloniewachstum einzelner Urinepithelzellen ausgewirkt hat.

Somit konnte die Urinzellexpansion in unserem Laboratorium trotz verschiedener Modifikationen nicht zufriedenstellend etabliert werden. Für eine erfolgreiche Etablierung bedarf es weiterer Versuche um die Menge an proliferationsfähigen, glykolytisch aktiven Urinepithelzellen für Seahorse-Messungen gewährleisten zu können. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von Urinepithelzellen in Zellkulturen (Felix & Littlefield, 1979; Y. Zhang et al., 2008) und im Hinblick auf eine zeiteffektive und ressourcenschonende diagnostische Methode sollte die Urinzellenexpansion nach maximal zwei Wochen abgeschlossen sein, wie es in einigen Literaturangaben beschrieben ist (Lazzeri et al., 2015; Zhou et al., 2012). Zudem ist eine zeitnahe Analyse der Proben wichtig um keine verfälschten Ergebnisse der glykolytischen Aktivität zu messen. Werden Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert, dann ist der Zellmetabolismus verändert und entspricht nicht mehr dem im Zellverband eines lebenden Organismus. Für eine etablierte diagnostische Methode muss außerdem die Kultivierung in einem Großteil an Proben gewährleistet sein, wie es in den Versuchen von Zhou et al. mit 82 % beschrieben ist (Zhou et al., 2012). Ein Mediumwechsel an sieben Tagen der Woche während der Zellexpansion stellt einen zu hohen logistischen Aufwand dar. Da aber der Mediumwechsel keines hohen Zeitaufwandes bedarf, ist eine Etablierung im Laboralltag an fünf Tagen der Woche machbar.

Im Vergleich zur invasiven Gewinnung unterschiedlicher Gewebsarten der standardisierten diagnostischen Methoden zur Messung der  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität hat sich die nicht-invasive

Trockenblutanalyse als kostengünstiger, komplikationsloser und zeitsparender herausgestellt (Chamoles et al., 2004; Lukacs et al., 2016; Schüller et al., 2013; H. Zhang et al., 2006).

Für die Stoffwechselfmessungen und Erstellung metabolischer Profile wurde ein Seahorse XFp Analyzer von Agilent Technologies genutzt um über die Messung der extracellular acidification rate (ECAR) die Glykolyse als Energieerzeugungsweg der Urinzellen in Echtzeit zu erfassen. In der Seahorse-Messung mit kultivierten Urinepithelzellen einer Probe eines an Morbus Pompe erkrankten Patienten stellte sich der erwartete Kurvenverlauf der glykolytischen Aktivität dar. Dies gibt Hinweise darauf, dass Urinepithelzellen zur Erstellung metabolischer Profile dienen könnten. Gelänge es die Methode weiter zu etablieren, dann könnte die glykolytische Aktivität der Patienten-Zellen während der Therapie bestimmt werden und der Therapieerfolg so einfach und reliabel überprüft werden.

Da keine Urinzellkultivierung aus 98 Proben 12 Gesunder genügend Zellmaterial hervorbrachte, konnte keine vergleichende Seahorse-Messung durchgeführt werden.

Für die Analyse bedarf es im Labor die Anschaffung des speziellen Seahorse XFp Analyzer. Das Gerät ist nach einer kurzen Einarbeitungsphase einfach bedienbar. Der Zeitaufwand der Vorbereitungen am Vortag und Tag der Messung beträgt ca. eineinhalb Stunden, eine Messung von zwei Proben im Vergleich dauert ebenfalls ca. eineinhalb Stunden. Der Zeitaufwand der Messungen ist damit überschaubar, es bedarf allerdings einer Einarbeitungszeit um die Arbeitsschritte gut in den Laboralltag zu integrieren.

Die Zellzahlbestimmung mittels Zellzähler (TC20™ Automated Cell Counter, #1450102, von BIO-RAD, Vereinigte Staaten) erwies sich als nicht durchführbar, die Berechnung der genauen Zellkonzentration einer Probe in mehreren Messungen variierte erheblich und deckte sich nicht mit der mikroskopischen Prüfung. Dies ist wahrscheinlich auf die Morphologie der Urinepithelzellen bzw. des Urinepithelzellgemisches zurückzuführen. Der Zellcounter eignet sich für kugelförmige Zellen. Die Myoblastenkonzentration konnte hingegen gut mittels Zellzähler bestimmt werden, da die Myoblasten nach Trypsinisierung eine kugelförmige Morphologie annehmen. Um die Zellkonzentration von Urinepithelzellen vor und nach Seahorse-Messungen genau bestimmen zu können bedarf es einer anderen Methode. Agilent führt den XFp Analyzer (XF Analyzer Seahorse XF Imaging and Normalization System, <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-analyzers/seahorse-xf-imaging-normalization-system-740882>) als mögliche Methode auf.

Dass metabolische Messungen in Echtzeit mithilfe des Seahorse XFp Analyzer möglich sind, zeigen die im Labor bereits etablierten Messungen mit Myoblasten (Hintze et al., 2020; Meinke et al., 2019). In den Messungen mit kultivierten humanen Myoblasten zeigte sich eine reduzierte glykolytische Aktivität in Proben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Außerdem wurde der Effekt der EET in metabolischen Messungen untersucht. Dabei zeigte sich, wie hypothetisch angenommen, eine gesteigerte glykolytische Aktivität nach Enzyersatztherapie EET mittels Alglucosidase alfa, was den therapeutischen Effekt bestätigt. Bestandteil aktueller Forschung sind verschiedene Modifikationen der Alglucosidas-alfa, um eine bessere Aufnahme in die Zielzellen zu gewährleisten und so den therapeutischen Effekt zu steigern (Basile et al., 2018; El Cheikh et al., 2016; Hintze et al., 2020; LeBowitz et al., 2004; Maga et al., 2013; Zhu et al., 2009). Dahingehend wurde durch Hintze et al. weiterführend Aufnahme, Aktivität und der Effekt auf die glykolytische Aktivität von nicht-phosphorylierter, rekombinant hergestellter humaner in Moss kultivierter GAA (moss-GAA) getestet, welche ebenfalls zu einer höheren glykolytischen Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Myoblasten führte (Hintze et al., 2020).

Im Hinblick darauf, dass neben der aktuell verfügbaren EET mittels Alglucosidase alfa neue Enzyme für die Enzyersatztherapie in der Entwicklung sind (Diaz-Manera et al., 2021; Kishnani et al., 2014; Pena et al., 2019; Schoser et al., 2021; Xu et al., 2019) ergibt sich eine weitere Anwendung: Gelänge es Urinepithelzellen von Patienten effektiv zu kultivieren könnte der Effekt von Medikamenten zuvor laborchemisch an den Zellen im Rahmen eines Prätests getestet werden indem man die Auswirkung des Medikaments auf die glykolytische Aktivität der Urinepithelzellen mittels Seahorse XFp Analyzer misst. Damit könnte man möglicherweise vor Therapiebeginn eine Therapie-Prognose treffen und so eventuell ein Nicht-Ansprechen auf eine Therapie prognostizieren.

Wie auch bei bereits etablierten diagnostischen Methoden mit Fibroblasten muss auch bei der Verwendung von Urinzellen gezeigt werden, dass diese Zelltypen nicht Zielzellen der Enzyersatztherapie sind, was die Aussagekraft der Messungen möglicherweise limitiert.

Im weiteren Teil der Dissertation wurden Urinzellgemisch für Seahorse-Messungen untersucht. Urinprobengewinnung und -isolation waren nicht-invasiv, kostengünstig und erforderten einen Zeitaufwand von ca. 30 Minuten.

Nachteilig ist die Kurzlebigkeit von Urinzellen im Urin (Felix & Littlefield, 1979), was eine sofortige Aufbereitung und Testung der Proben erforderlich macht.

Die Vorbereitungen für eine Seahorse-Messung sind einfach durchzuführen, benötigen jedoch ein organisiertes Zeitmanagement, da auch am Vortag der Messung Arbeitsschritte erfolgen müssen. Als schwierig erwies sich die genaue Zellkonzentrationsbestimmung für die Messungen. Die Zellzahlbestimmung mittels Zellzähler (TC20™ Automated Cell Counter, #1450102, von BIO-RAD, Vereinigte Staaten) erwies sich als nicht durchführbar, die Berechnung der genauen Zellkonzentration einer Probe in mehreren Messungen variierte erheblich und deckte sich nicht mit der mikroskopischen Prüfung. Dies ist wahrscheinlich auf die Morphologie der Urinepithelzellen bzw. des Urinepithelzellgemisches zurückzuführen. Der Zellcounter eignet sich für kugelförmige Zellen. Im Gegensatz dazu konnte die Myoblastenkonzentration gut mittels Zellzähler bestimmt werden, da die Myoblasten nach Trypsinisierung eine kugelförmige Morphologie annehmen. Um die Zellkonzentration von Urinepithelzellen vor und nach Seahorse-Messungen genau bestimmen zu können bedarf es einer anderen Methode.

Agilent führt den XF Analyzer (XF Analyzer Seahorse XF Imaging and Normalization System, <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-analyzers/seahorse-xf-imaging-normalization-system-740882>) als mögliche Methode auf. Um im Zuge des Versuches die Zellzahl mikroskopisch zu prüfen, konnte in vielen Proben keine ähnliche Zellkonzentration in den sechs Wells erreicht werden. Dies liegt vermutlich an der natürlichen Varianz der Zellkonzentration in den Proben verschiedener Proband\*innen und Patient\*innen und an dem geringen Anteil an glykolytisch aktiven Zellen. So wiesen einige Proben eine extrem hohe Zelldichte auf, während andere nur wenige Zellen enthielten. Die durchschnittliche Vorbereitungs- und Testungszeit für eine Probe betrug drei Stunden.

In einigen Messungen entsprachen die Kurvenverläufe der erwarteten glykolytischen Funktion der Zellen und deckte sich mit dem Kurvenverlauf der Myoblasten-Seahorse-Messungen. In vielen Messungen entsprach der Kurvenverlauf jedoch nicht den Erwartungen und die Reagenzien-Injektionen erzielten nicht die hypothetisch angenommenen und in Messungen mit anderen Zellreihen erwiesenen Effekte.

Zusammenfassend scheint auch ein Urinzellgemisch nicht geeignet zu sein, um die glykolytische Aktivität mittels Seahorse XFp Analyzer zu messen. In den meisten Proben war zu wenig glykolytisch aktive Zellen vorhanden, was sich in niedrig gemessenen ECAR-Werten und fehlendem Ansprechen auf die Glykolyse-Aktivatoren widerspiegelte. Auch zellreiche Proben lieferten keine erwarteten Kurvenverläufe und die Verwendung von einem höheren Urinprobevolumen hatte keinen messbaren Effekt. Vermutlich sind ein Großteil der abgeschiedenen Zellen im Urinzellgemisch abgestorbene und damit nicht mehr zur Glykolyse

fähige Zellen. Um genügend glykolytisch aktive Zellen als Probematerial für die Seahorse-Messungen zu gewinnen müssen die Urinepithelzellen zuvor kultiviert werden.

Traditionell wird die fehlende bzw. verminderte  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität aktuell in aus Hautbiopsie gewonnenen und kultivierten Fibroblasten, Muskelbiopsien, Lymphozyten und mononukleären Zellen bestimmt (Kishnani et al., B 2006).

Diagnostischer Goldstandard ist aktuell die Aktivitätsbestimmung in kultivierten Fibroblasten oder aus Muskelbiopsien. In Leukozyten werden alternierend Isoenzym-Aktivitäten gemessen, was die Testungen verfälschen kann (Kishnani et al., B 2006). Für die etablierte Methode der Messung der  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität in Fibroblasten bedarf es einer Hautbiopsie, was vergleichend zu Urinproben invasiv ist. Auch benötigt es für die Kultivierung von Fibroblasten mitunter bis zu vier bis sechs Wochen, was die Diagnosestellung verzögern kann (Kishnani et al., B 2006). Die Urinzellkultivierung wird in der Literatur durch einige Arbeitsgruppen bereits nach zwei Wochen als erfolgreich beschrieben, was ein zeitlicher Vorteil wäre.

Muskelbiopsien haben gegenüber der Kultivierung aus Urinproben und Fibroblasten den Vorteil, dass die  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität direkt und ohne vorangehende Kultivierung bestimmt werden kann (Kishnani et al., B 2006). Die Methode ist jedoch invasiv, mitunter kommt zur Diagnostik der infantilen Form das Narkoserisiko hinzu (Ing et al., 2004) und es bedarf in der Aufarbeitung der Probe eine ausgesprochene Präzision. Bei der Muskelbiopsie zur Diagnosestellung der adulten Form kann sich die unterschiedliche Ausprägung der Glykogenakkumulation an verschiedenen Biopsielokalisationen auf das Ergebnis auswirken. Es besteht sowohl eine Varianz der Glykogenakkumulation in den verschiedenen Muskeln als auch innerhalb des gleichen Muskels (Kishnani et al., B 2006).

Die Gewinnung von Leukozyten durch eine Blutentnahme ist weniger invasiv als Haut- oder Muskelbiopsien, jedoch invasiver und mit einem höheren Infektionsrisiko als die Verwendung von Urinproben. Zudem können zusätzlich vorkommende Maltasen, wie beispielsweise die Maltase-Glucoamylase, die Messungen verfälschen (Kishnani et al., B 2006).

Durch einige Gruppen wurde die Methode Morbus Pompe über Trockenblutproben auf Filterpapier zu diagnostizieren getestet. Die Methode wird aktuell als Neugeborenenenscreening für Morbus Pompe in Taiwan, Japan und den USA eingesetzt (Sawada et al., 2020). Chamoles et al. und weitere Arbeitsgruppen entwickelten eine kostengünstige Methode um die  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität im Rahmen des sogenannten dried blood spot-Tests (DBS) mittels Fluorometrie oder Tandem-Massenspektrometrie zu bestimmen (Chamoles et al., 2004; Li et

al., 2004; Sista et al., 2013; Taverna et al., 2020). Diese Methode ist ebenfalls kostengünstig, wird aktuell zur Diagnostik der infantilen Form (IOPD) und der adulten Form (LOPD) eingesetzt. Ein Monitoring des Therapieverlaufs unter ERT ist nicht möglich (Davison, 2020; Musumeci et al., 2019; van der Ploeg et al., 2017). Die Methode wird im Rahmen von Neugeborenenenscreening eingesetzt. Alle positive Fälle einer Trockenblutanalyse müssen anhand eines zweiten Assays oder dem Nachweis des Gendefekts bestätigt werden (Bodamer et al., 2017; Niño et al., 2021).

Ein weiterer Nachteil der Methode ist, dass mitunter nicht zwischen pseudodefizienten Allelen unterschieden werden kann. Pseudodefiziente Allele führen zwar zu einer verminderten  $\alpha$ -Glukosidase-Aktivität, nicht jedoch zur Ausprägung der Erkrankung (Kroos et al., 2008; Tajima et al., 2007), was zu falsch positiven Ergebnissen führt (Liao et al., 2017).

Hallgren et al. identifizierten 1974 als erstes eine Erhöhung des Biomarkers Glucose-tetrasaccharid (Glc4) im Urin von an Morbus Pompe Erkrankten Patient\*innen durch chromatographische Verfahren (Hallgren et al., 1974; Taverna et al., 2020). Seitdem wurde eine erhöhte Konzentration des Biomarkers in Urinproben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen von verschiedenen Arbeitsgruppen durch unterschiedliche Analysemethoden nachgewiesen. Yan An et al. führten eine Studie mit 21 Patient\*innen mit diagnostiziertem Morbus Pompe (IOPD und LOPD) und gesunden Kontrollen durch. In den Urinproben aller Patient\*innen mit der infantilen und juvenilen Form wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte Konzentration an Glc4 durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie festgestellt. Von den sieben untersuchten Urinproben von LOPD-Patient\*innen war die Glc4-Konzentration von zwei Patient\*innen jedoch im Normbereich (An et al., 2000). Bei Patient\*innen mit IOPD beträgt die Sensitivität fast 100 % (An et al., 2000; Young et al., 2003). Kumlien et al. beschreiben in ihrer Arbeit mit präziseren Messungen höhere Glc4-Konzentrationen in Urinproben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen. Die Forschungsgruppe nutzte einen 24-Stunden-Sammelurin (Kumlien et al., 1988), was im klinischen Alltag jedoch schwerer zu etablieren ist. Auch in der französischen Studie von Piraud et al. wurden in der Mehrzahl der 320 getesteten Urinproben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen erhöhte Glc4-Konzentrationen gemessen (Piraud et al., 2020).

Die Methode wurde an getrockneten, auf Filterpapier aufgebrauchten Urinproben getestet, was Lagerung und Transport erleichtert (Kishnani et al., B 2006). Die Methode wird aktuell nur in spezialisierten Laboratorien und hauptsächlich im Rahmen der Forschung genutzt. Nachteilig ist, dass das im Urin nachgewiesene Glc4 auch im Rahmen anderer Erkrankungen wie beispielsweise GSD Typ III und VI (Lennartson et al., 1976; Oberholzer et al., 1990), im Rahmen einer akuten Pankreatitis (Kumlien et al., 1989; Kumlien et al., 1988; Wang et al.,

1989) oder während der Schwangerschaft erhöht sein kann (Hallgren et al., 1977; Zopf et al., 1982). In der Arbeit von Yan An et al. ist beschrieben, dass die Glc4 Konzentration im Urin altersabhängig ist (An et al., 2000). Außerdem ist in der Literatur der Einfluss von physischer Aktivität und Ernährung auf die Glc4 Konzentration beschrieben (Kumlien et al., 1988). Die Methode ist bezüglich auf die einfache und kostengünstige Verwendung von Urinproben mit der von mir vorgestellten Methode gleichzustellen.

Zudem wird Glc4 durch einige Arbeitsgruppen als Biomarker, welcher mit dem Ansprechen auf die EET korreliert, beschrieben (An et al., 2005; Young et al., 2003). Demnach entsteht Glc4 durch den intravaskulären Abbau von Glykogen und kann nach der Freigabe in den Blutkreislauf gemessen werden (Kumlien et al., 1988; Ugorski et al., 1983). Mehrere Arbeitsgruppen stellten die Hypothese auf, dass demnach die Glc4-Konzentration im Urin mit der Menge an vermehrter Glykogenakkumulation in Herz- und Skelettmuskulatur bei an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen korrelieren sollte (An et al., 2005). Die Arbeitsgruppe von Yan An et al. schloss 11 Patient\*innen mit IOPD in eine Studie ein und beschreibt eine gute Korrelation zwischen klinischem Outcome und Glc4-Konzentration unter EET, gemessen über ein Jahr (An et al., 2005). 10 der Patient\*innen zeigten vor EET im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Glc4-Konzentrationen im Urin.

Frühestens zwei Wochen nach Therapiebeginn mittels EET wurde in den meisten Urinproben eine abfallende Glc4-Konzentration gemessen. In den Urinproben der vier Patient\*innen mit dem besten klinischen Outcome unter EET nach einem Jahr wurden normale bis annähernd ähnliche Glc4-Konzentrationen wie die der gesunden Kontrollen gemessen. Innerhalb dieser Gruppe zeigten sich insbesondere eine klinische Verbesserung der Kardiomyopathie, des Wachstums und die Fähigkeit sich unabhängig bewegen zu können. Bei sechs Patient\*innen zeigten sich in den Glc4-Konzentrationsbestimmungen über ein Jahr Fluktuationen. Patient\*innen mit einem schlechteren klinischen Outcome bezogen auf die motorische Funktion zeigten über das Jahr durchgehend über die Norm erhöhte Glc4-Konzentrationen.

Ein Vorteil gegenüber der im Rahmen dieser Dissertation erforschten Methode ist, dass es keiner zeit- und arbeitsaufwändigen Zellkultivierung bedarf. Viele Studien beziehen sich jedoch nur auf IOPD-Patient\*innen. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen wenige Daten für die Anwendung dieser diagnostischen Methode für LOPD-Patient\*innen vor. In den aktuellen Daten werden teils nicht signifikant erhöhte Glc4-Konzentrationen in Urinproben von LOPD-Patient\*innen beschrieben (An et al., 2000). Aufgrund der dürftigen Datenlage ist noch nicht feststellbar, ob diese Methode gut für LOPD-Patient\*innen geeignet ist, was zum einen weiterer Studien in

diesem Bereich bedarf und zum anderen die Erforschung weiterer, nicht-invasiver Methoden zum Monitoren für den Therapieverlauf unter EET von LOPD-Patient\*innen notwendig macht.



## 10 Zusammenfassung

Der Morbus Pompe ist eine angeborene, autosomal rezessiv vererbte, lysosomale Speicherkrankheit. Durch Mutationen im Gen der sauren alpha-Glukosidase kommt es zur verminderten oder fehlenden Aktivität des Enzyms, was zu Glykogenspeicherung (Schoser et al., 2007), Störung der Autophagie (Yang & Klionsky, 2010), Veränderungen der Calcium-Homöostase, oxidativem Stress und mitochondrialen Veränderungen (Kohler et al., 2018) führt. Besteht aufgrund von Anamnese und Symptomen der Verdacht auf Morbus Pompe ist die Aktivitätsbestimmung der sauren  $\alpha$ -Glukosidase aus dem Trockenblut der diagnoseführende Schritt. Ebenso geeignete, aber invasiv gewonnene Gewebsarten sind kultivierte Fibroblasten aus Hautbiopsien, Muskelgewebe, und gereinigte Lymphozyten (Chamoles et al., 2004; Schüller et al., 2013; H. Zhang et al., 2006).

Ziel dieser Dissertation war es Urinproben von an Morbus Pompe erkrankten Patient\*innen auf die glykolytische Zellfunktion als eine neue Methode zu testen. Die glykolytische Zellfunktion der Proben der Pompe-Patient\*innen sollte aufgrund des Enzymdefekts niedriger sein als die Proben der gesunder Proband\*innen.

Zur Untersuchung der Urinproben wurde der Seahorse XFp Analyzer genutzt, mit welchem der Stoffwechselweg der Glykolyse in Echtzeit gemessen wurde. Für die Messungen wurde das Urinzellgemisch, sowie zuvor durch Zellkultivierung gewonnene Urinzellen genutzt.

Urinprobegewinnung und Aufbereitung stellten sich als einfach durchführbar, zeit- und kostengünstig da. Das sofort gewonnene Urinzellgemisch scheint jedoch nicht für die Analyse mittels Seahorse XFp Analyzer geeignet, da keine bzw. nur sehr geringe glykolytische Aktivität im Zellgemisch messbar war. Für die Messungen bedarf es zunächst der Kultivierung von glykolytisch aktiven Urinepithelzellen. Die Urinzellkultivierung erwies sich unter den Laborbedingungen als langwierig und Zellproliferation konnte nur in ca. einem Zehntel der Proben nachgewiesen werden. In keiner der Proben kam es zu dem für eine Seahorse-Messung erforderliche Zellzahl. In der einzigen Seahorse-Messung mit kultivierten Urinepithelzellen eines an Morbus Pompe erkrankten Patienten stellte sich das hypothetisch angenommene metabolische Profil der glykolytischen Aktivität dar. Dies gibt einen Ausblick darauf, dass es sich um eine geeignete nicht-invasive diagnostische Methode handeln könnte, gelänge es die Urinzellkultivierung zu optimieren. Da Urinproben leicht und nicht-invasiv gewonnen werden, ist diese Methode als Therapiemonitoring denkbar. Auch im Blick auf die aktuelle Zulassung weiterer Enzyme für die Enzyersatztherapie des Morbus Pompe wären Urinproben als Vortestproben und ggf. als Therapie-Biomarker denkbar und von weiterem Interesse.

## 11 Literaturverzeichnis

- Agilent Technologies. (2017). Seeding Suspension Cells in Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplates. Abgerufen am 05.01.2020. Verfügbar unter <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/Seeding%20Suspension%20Cells%20in%20XFp%20Cell%20Culture%20Miniplates.pdf>
- Agilent Technologies. (2019). *Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit User Guide Kit 103017-100*. (103017-400).
- Alejaldre, A., Diaz-Manera, J., Ravaglia, S., Tibaldi, E. C., D'Amore, F., Moris, G., ... Pichiecchio, A. (2012). Trunk muscle involvement in late-onset Pompe disease: study of thirty patients. *Neuromuscul Disord*, 22 Suppl 2, S148-154. DOI: 10.1016/j.nmd.2012.05.011
- Amalfitano, A., Bengur, A. R., Morse, R. P., Majure, J. M., Case, L. E., Veerling, D. L., ... Chen, Y. T. (2001). Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med*, 3(2), 132-138. DOI: 10.1097/00125817-200103000-00007
- AmicusTherapeutics. (2018 - 2021). *PROPEL Study - A Study Comparing ATB200/AT2221 With Alglucosidase/Placebo in Adult Subjects With LOPD*. Amicus Therapeutics ClinicalTrials.gov Verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03729362?term=NCT03729362&draw=2&rank=1>
- An, Y., Young, S. P., Hillman, S. L., Van Hove, J. L., Chen, Y. T. & Millington, D. S. (2000). Liquid chromatographic assay for a glucose tetrasaccharide, a putative biomarker for the diagnosis of Pompe disease. *Anal Biochem*, 287(1), 136-143. DOI: 10.1006/abio.2000.4838
- An, Y., Young, S. P., Kishnani, P. S., Millington, D. S., Amalfitano, A., Corz, D. & Chen, Y. T. (2005). Glucose tetrasaccharide as a biomarker for monitoring the therapeutic response to enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Mol Genet Metab*, 85(4), 247-254. DOI: 10.1016/j.ymgme.2005.03.010
- Angelini, C., Semplicini, C., Ravaglia, S., Bembi, B., Servidei, S., Pegoraro, E., ... Toscano, A. (2012). Observational clinical study in juvenile-adult glycogenosis type 2 patients undergoing enzyme replacement therapy for up to 4 years. *J Neurol*, 259(5), 952-958. DOI: 10.1007/s00415-011-6293-5
- Ausems, M. G., Lochman, P., van Diggelen, O. P., Ploos van Amstel, H. K., Reuser, A. J. & Wokke, J. H. (1999). A diagnostic protocol for adult-onset glycogen storage disease type II. *Neurology*, 52(4), 851-853. DOI: 10.1212/wnl.52.4.851
- Banugaria, S. G., Prater, S. N., Ng, Y. K., Kabori, J. A., Finkel, R. S., Ladda, R. L., ... Kishnani, P. S. (2011). The impact of antibodies on clinical outcomes in diseases treated with therapeutic protein: lessons learned from infantile Pompe disease. *Genet Med*, 13(8), 729-736. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3182174703
- Barba-Romero, M. A., Barrot, E., Bautista-Lorite, J., Gutierrez-Rivas, E., Illa, I., Jimenez, L. M., ... Vilchez-Padilla, J. J. (2012). Clinical guidelines for late-onset Pompe disease. *Rev Neurol*, 54(8), 497-507.
- Basile, I., Da Silva, A., El Cheikh, K., Godefroy, A., Daurat, M., Harmois, A., ... Maynadier, M. (2018). Efficient therapy for refractory Pompe disease by mannose 6-phosphate analogue grafting on acid  $\alpha$ -glucosidase. *J Control Release*, 269, 15-23. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.10.043
- Bembi, B., Cerini, E., Danesino, C., Donati, M. A., Gasperini, S., Morandi, L., ... Vianello, A. (2008). Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology*, 71(23 Suppl 2), S4-11. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31818da91e

- Bembi, B., Pisa, F. E., Confalonieri, M., Ciana, G., Fiumara, A., Parini, R., ... Ravaglia, S. (2010). Long-term observational, non-randomized study of enzyme replacement therapy in late-onset glycogenosis type II. *J Inherit Metab Dis*, 33(6), 727-735. DOI: 10.1007/s10545-010-9201-8
- Bischof, G. (1932). Zum klinischen Bild der Glykogenspeicherkrankheit. *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, 52, 722.
- Bodamer, O. A., Scott, C. R. & Giugliani, R. (2017). Newborn Screening for Pompe Disease. *Pediatrics*, 140(Suppl 1), S4-s13. DOI: 10.1542/peds.2016-0280C
- Byrne, B. J., Kishnani, P. S., Case, L. E., Merlini, L., Muller-Felber, W., Prasad, S. & van der Ploeg, A. (2011). Pompe disease: design, methodology, and early findings from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab*, 103(1), 1-11. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.02.004
- Chamoles, N. A., Niizawa, G., Blanco, M., Gaggioli, D. & Casentini, C. (2004). Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*, 347(1-2), 97-102. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.04.009
- Colella, P. & Mingozi, F. (2019). Gene Therapy for Pompe Disease: The Time is now. *Hum Gene Ther*, 30(10), 1245-1262. DOI: 10.1089/hum.2019.109
- Cori, G. T. (1952). Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease. *Harvey lectures*, 48, 145-171.
- Cupler, E. J., Berger, K. I., Leshner, R. T., Wolfe, G. I., Han, J. J., Barohn, R. J. & Kissel, J. T. (2012). Consensus treatment recommendations for late-onset Pompe disease. *Muscle Nerve*, 45(3), 319-333. DOI: 10.1002/mus.22329
- D'Ancona, G. G., Wurm, J. & Croce, C. M. (1979). Genetics of type II glycogenosis: assignment of the human gene for acid alpha-glucosidase to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4526-4529. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4526
- Davison, J. E. (2020). Advances in diagnosis and management of Pompe disease. *J Mother Child*, 24(2), 3-8. DOI: 10.34763/jmotherandchild.20202402si.2001.000002
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, 60(4), 604-617. DOI: 10.1042/bj0600604
- Di Sant Agnese, P., Andersen, D. & Mason, H. (1950). Glycogen storage disease of the heart. *Pediatrics*, 6, 607.
- Diaz-Manera, J., Kishnani, P. S., Kushlaf, H., Ladha, S., Mozaffar, T., Straub, V., ... Schoser, B. (2021). Safety and efficacy of avalglucosidase alfa versus alglucosidase alfa in patients with late-onset Pompe disease (COMET): a phase 3, randomised, multicentre trial. *Lancet Neurol*, 20(12), 1012-1026. DOI: 10.1016/s1474-4422(21)00241-6
- Dörrenhaus, A., Müller, J. I., Golka, K., Jedrusik, P., Schulze, H. & Föllmann, W. (2000). Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and the renal tubular system. *Arch Toxicol*, 74(10), 618-626. DOI: 10.1007/s002040000173
- Drost, M. R., Hesselink, R. P., Oomens, C. W. & van der Vusse, G. J. (2005). Effects of non-contractile inclusions on mechanical performance of skeletal muscle. *J Biomech*, 38(5), 1035-1043. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2004.05.040
- El Cheikh, K., Basile, I., Da Silva, A., Bernon, C., Cérutti, P., Salgues, F., ... Morère, A. (2016). Design of Potent Mannose 6-Phosphate Analogues for the Functionalization of Lysosomal Enzymes To Improve the Treatment of Pompe Disease. *Angew Chem Int Ed Engl*, 55(47), 14774-14777. DOI: 10.1002/anie.201607824

- Engel, A. G. (1970). Acid maltase deficiency in adults: studies in four cases of a syndrome which may mimic muscular dystrophy or other myopathies. *Brain*, 93, 599-616.
- Engel, A. G. & Dale, A. J. (1968). Autophagic glycogenosis of late onset with mitochondrial abnormalities: light and electron microscopic observations. *Mayo Clin Proc*, 43(4), 233-279.
- European Medicines Agency. (2006). Myozyme – alglucosidase alfa Abgerufen am 08.01.2020. Verfügbar unter <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/myozyme>
- Feeney, E. J., Austin, S., Chien, Y. H., Mandel, H., Schoser, B., Prater, S., ... Raben, N. (2014). The value of muscle biopsies in Pompe disease: identifying lipofuscin inclusions in juvenile- and adult-onset patients. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 2. DOI: 10.1186/2051-5960-2-2
- Felix, J. S. & Littlefield, J. W. (1979). Urinary tract epithelial cells cultured from human urine. *Int Rev Cytol Suppl*(10), 11-23. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)60609-9
- Felix, J. S. & Littlefield, J. W. (1980). Human newborn urine as a source of epithelial cells. *Birth Defects Orig Artic Ser*, 16(2), 231-237.
- Felix, J. S., Sun, T. T. & Littlefield, J. W. (1980). Human epithelial cells cultured from urine: growth properties and keratin staining. *In Vitro*, 16(10), 866-874. DOI: 10.1007/bf02619424
- Fraites, T. J., Jr., Schleissing, M. R., Shanely, R. A., Walter, G. A., Cloutier, D. A., Zolotukhin, I., ... Byrne, B. J. (2002). Correction of the enzymatic and functional deficits in a model of Pompe disease using adeno-associated virus vectors. *Mol Ther*, 5(5 Pt 1), 571-578. DOI: 10.1006/mthe.2002.0580
- Fuller, M., Van der Ploeg, A., Reuser, A. J., Anson, D. S. & Hopwood, J. J. (1995). Isolation and characterisation of a recombinant, precursor form of lysosomal acid alpha-glucosidase. *Eur J Biochem*, 234(3), 903-909. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.903\_a.x
- Griffin, J. L. (1984). Infantile acid maltase deficiency. I. Muscle fiber destruction after lysosomal rupture. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 45(1), 23-36. DOI: 10.1007/bf02889849
- Gutschmidt, K., Musumeci, O., Díaz-Manera, J., Chien, Y. H., Knop, K. C., Wenninger, S., ... Schoser, B. (2021). STIG study: real-world data of long-term outcomes of adults with Pompe disease under enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa. *J Neurol*, 268(7), 2482-2492. DOI: 10.1007/s00415-021-10409-9
- Hagemans, M. L., Janssens, A. C., Winkel, L. P., Sieradzan, K. A., Reuser, A. J., Van Doorn, P. A. & Van der Ploeg, A. T. (2004). Late-onset Pompe disease primarily affects quality of life in physical health domains. *Neurology*, 63(9), 1688-1692. DOI: 10.1212/01.wnl.0000142597.69707.78
- Hagemans, M. L., Winkel, L. P., Hop, W. C., Reuser, A. J., Van Doorn, P. A. & Van der Ploeg, A. T. (2005). Disease severity in children and adults with Pompe disease related to age and disease duration. *Neurology*, 64(12), 2139-2141. DOI: 10.1212/01.Wnl.0000165979.46537.56
- Hagemans, M. L., Winkel, L. P., Van Doorn, P. A., Hop, W. J., Loonen, M. C., Reuser, A. J. & Van der Ploeg, A. T. (2005). Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain*, 128(Pt 3), 671-677. DOI: 10.1093/brain/awh384
- Hallgren, P., Hansson, G., Henriksson, K. G., Häger, A., Lundblad, A. & Svensson, S. (1974). Increased excretion of a glucose-containing tetrasaccharide in the urine

- of a patient with glycogen storage disease type II (Pompe's disease). *Eur J Clin Invest*, 4(6), 429-433. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1974.tb00416.x
- Hallgren, P., Lindberg, B. S. & Lundblad, A. (1977). Quantitation of some urinary oligosaccharides during pregnancy and lactation. *J Biol Chem*, 252(3), 1034-1040.
- Hers, H. G. (1963). alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J*, 86, 11-16. DOI: 10.1042/bj0860011
- Hintze, S., Limmer, S., Dabrowska-Schlepp, P., Berg, B., Kriehoff, N., Busch, A., ... Schoser, B. (2020). Moss-Derived Human Recombinant GAA Provides an Optimized Enzyme Uptake in Differentiated Human Muscle Cells of Pompe Disease. *Int J Mol Sci*, 21(7). DOI: 10.3390/ijms21072642
- Hirschhorn, R. & Reuser, A. J. (2001). Glycogen storage disease type II: acid-glucosidase (Acid maltase) deficiency *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (Bd. 8). New York.
- Hoefsloot, L. H., Hoogeveen-Westerveld, M., Reuser, A. J. & Oostra, B. A. (1990). Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene. *Biochem J*, 272(2), 493-497. DOI: 10.1042/bj2720493
- Hudgson, P., Gardner-Medwin, D., Worsfold, M., Pennington, R. J. & Walton, J. N. (1968). Adult myopathy from glycogen storage disease due to acid maltase deficiency. *Brain*, 91(3), 435-462. DOI: 10.1093/brain/91.3.435
- Hug, G. & Schubert, W. K. (1967). Lysosomes in type II glycogenosis. Changes during administration of extract from *Aspergillus niger*. *J Cell Biol*, 35(1), C1-6. DOI: 10.1083/jcb.35.1.c1
- Hundsberger, T., Schoser, B., Leupold, D., Rosler, K. M. & Putora, P. M. (2019). Comparison of recent pivotal recommendations for the diagnosis and treatment of late-onset Pompe disease using diagnostic nodes-the Pompe disease burden scale. *J Neurol*, 266(8), 2010-2017. DOI: 10.1007/s00415-019-09373-2
- Ing, R. J., Cook, D. R., Bengur, R. A., Williams, E. A., Eck, J., Dear Gde, L., ... Kishnani, P. S. (2004). Anaesthetic management of infants with glycogen storage disease type II: a physiological approach. *Paediatr Anaesth*, 14(6), 514-519. DOI: 10.1111/j.1460-9592.2004.01242.x
- Kishnani, P. S. & Beckemeyer, A. A. (2014). New therapeutic approaches for Pompe disease: enzyme replacement therapy and beyond. *Pediatr Endocrinol Rev*, 12 Suppl 1, 114-124.
- Kishnani, P. S., Corzo, D., Nicolino, M., Byrne, B., Mandel, H., Hwu, W. L., ... Wraith, J. E. (2007). Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology*, 68(2), 99-109. DOI: 10.1212/01.wnl.0000251268.41188.04
- Kishnani, P. S., Nicolino, M., Voit, T., Rogers, R. C., Tsai, A. C., Waterson, J., ... Chen, Y. T. (A 2006). Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr*, 149(1), 89-97. DOI: 10.1016/j.jpeds.2006.02.035
- Kishnani, P. S., Steiner, R. D., Bali, D., Berger, K., Byrne, B. J., Case, L. E., ... Watson, M. S. (2006). Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*, 8(5), 267-288. DOI: 10.1097/01.gim.0000218152.87434.f3
- Kishnani, P. S., Steiner, R. D., Bali, D., Berger, K., Byrne, B. J., Case, L. E., ... Watson, M. S. (B 2006). Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*, 8(5), 267-288. DOI: 10.1097/01.gim.0000218152.87434.f3
- Kohler, L., Puertollano, R. & Raben, N. (2018). Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics*, 15(4), 928-942. DOI: 10.1007/s13311-018-0655-y

- Krivit, W., Polglase, W., Gunn, F. & Tyler, F. . (1953). Studies in disorders of muscle, IX: glycogenstorage disease primarily affecting skeletal muscle and clinically resembling amyotoniacongenita. *Pediatrics*, *12*, 165-177.
- Kronn, D. F., Day-Salvatore, D., Hwu, W. L., Jones, S. A., Nakamura, K., Okuyama, T., ... Kishnani, P. S. (2017). Management of Confirmed Newborn-Screened Patients With Pompe Disease Across the Disease Spectrum. *Pediatrics*, *140*(Suppl 1), S24-s45. DOI: 10.1542/peds.2016-0280E
- Kroos, M. A., Mullaart, R. A., Van Vliet, L., Pomponio, R. J., Amartino, H., Kolodny, E. H., ... Reuser, A. J. (2008). p.[G576S; E689K]: pathogenic combination or polymorphism in Pompe disease? *Eur J Hum Genet*, *16*(8), 875-879. DOI: 10.1038/ejhg.2008.34
- Kumlien, J., Andrén-Sandberg, A., Zopf, D. & Lundblad, A. (1989). Determination of a glucose-containing tetrasaccharide in urine of patients with acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*, *4*(2), 139-147. DOI: 10.1007/bf02931316
- Kumlien, J., Chester, M. A., Lindberg, B. S., Pizzo, P., Zopf, D. & Lundblad, A. (1988). Urinary excretion of a glucose-containing tetrasaccharide. A parameter for increased degradation of glycogen. *Clin Chim Acta*, *176*(1), 39-48. DOI: 10.1016/0009-8981(88)90172-6
- Kuo, W. L., Hirschhorn, R., Huie, M. L. & Hirschhorn, K. (1996). Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet*, *97*(3), 404-406. DOI: 10.1007/bf02185782
- Kuperus, E., Kruijshaar, M. E., Wens, S. C. A., de Vries, J. M., Favejee, M. M., van der Meijden, J. C., ... van der Beek, N. (2017). Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: A 5-year prospective study. *Neurology*, *89*(23), 2365-2373. DOI: 10.1212/wnl.00000000000004711
- Lazzeri, E., Ronconi, E., Angelotti, M. L., Peired, A., Mazzinghi, B., Becherucci, F., ... Romagnani, P. (2015). Human Urine-Derived Renal Progenitors for Personalized Modeling of Genetic Kidney Disorders. *J Am Soc Nephrol*, *26*(8), 1961-1974. DOI: 10.1681/asn.2014010057
- LeBowitz, J. H., Grubb, J. H., Maga, J. A., Schmiel, D. H., Vogler, C. & Sly, W. S. (2004). Glycosylation-independent targeting enhances enzyme delivery to lysosomes and decreases storage in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 3083-3088. DOI: 10.1073/pnas.0308728100
- Lennartson, G., Lundblad, A., Sjöblad, S., Svensson, S. & Ockerman, P. A. (1976). Quantitation of a urinary tetrasaccharide by gas chromatography and mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom*, *3*(2), 51-54. DOI: 10.1002/bms.1200030202
- Li, Y., Scott, C. R., Chamoles, N. A., Ghavami, A., Pinto, B. M., Turecek, F. & Gelb, M. H. (2004). Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem*, *50*(10), 1785-1796. DOI: 10.1373/clinchem.2004.035907
- Liao, H. C., Chan, M. J., Yang, C. F., Chiang, C. C., Niu, D. M., Huang, C. K. & Gelb, M. H. (2017). Mass Spectrometry but Not Fluorimetry Distinguishes Affected and Pseudodeficiency Patients in Newborn Screening for Pompe Disease. *Clin Chem*, *63*(7), 1271-1277. DOI: 10.1373/clinchem.2016.269027
- Lim, J. A., Li, L., Kakhlon, O., Myerowitz, R. & Raben, N. (2015). Defects in calcium homeostasis and mitochondria can be reversed in Pompe disease. *Autophagy*, *11*(2), 385-402. DOI: 10.1080/15548627.2015.1009779
- Lim, J. A., Li, L. & Raben, N. (2014). Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci*, *6*, 177. DOI: 10.3389/fnagi.2014.00177

- Llerena, J. C., Jr., Horovitz, D. M., Marie, S. K., Porta, G., Giugliani, R., Rojas, M. V. & Martins, A. M. (2009). The Brazilian consensus on the management of Pompe disease. *J Pediatr*, 155(4 Suppl), S47-56. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.07.006
- Lukacs, Z., Nieves Cobos, P., Wenninger, S., Willis, T. A., Guglieri, M., Roberts, M., ... Schoser, B. (2016). Prevalence of Pompe disease in 3,076 patients with hyperCKemia and limb-girdle muscular weakness. *Neurology*, 87(3), 295-298. DOI: 10.1212/wnl.0000000000002758
- Maga, J. A., Zhou, J., Kambampati, R., Peng, S., Wang, X., Bohnsack, R. N., ... LeBowitz, J. H. (2013). Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid  $\alpha$ -glucosidase enhances muscle glycogen clearance in pompe mice. *J Biol Chem*, 288(3), 1428-1438. DOI: 10.1074/jbc.M112.438663
- Manaph, N. P. A., Al-Hawwas, M., Bobrovskaya, L., Coates, P. T. & Zhou, X. F. (2018). Urine-derived cells for human cell therapy. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 222. DOI: 10.1186/s13287-018-0974-2
- Meena, N. K. & Raben, N. (2020). Pompe Disease: New Developments in an Old Lysosomal Storage Disorder. *Biomolecules*, 10(9). DOI: 10.3390/biom10091339
- Meinke, P., Limmer, S., Hintze, S. & Schoser, B. (2019). Assessing metabolic profiles in human myoblasts from patients with late-onset Pompe disease. *Ann Transl Med*, 7(13), 277. DOI: 10.21037/atm.2019.04.18
- Mellies, U. & Lofaso, F. (2009). Pompe disease: a neuromuscular disease with respiratory muscle involvement. *Respir Med*, 103(4), 477-484. DOI: 10.1016/j.rmed.2008.12.009
- Mellies, U., Ragette, R., Schwake, C., Baethmann, M., Voit, T. & Teschler, H. (2001). Sleep-disordered breathing and respiratory failure in acid maltase deficiency. *Neurology*, 57(7), 1290-1295. DOI: 10.1212/wnl.57.7.1290
- Müller-Felber, W., Horvath, R., Gempel, K., Podskarbi, T., Shin, Y., Pongratz, D., ... Schoser, B. (2007). Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord*, 17(9-10), 698-706. DOI: 10.1016/j.nmd.2007.06.002
- Musumeci, O. & Toscano, A. (2019). Diagnostic tools in late onset Pompe disease (LOPD). *Ann Transl Med*, 7(13), 286. DOI: 10.21037/atm.2019.06.60
- Myerowitz, R., Puertollano, R. & Raben, N. (2021). Impaired autophagy: The collateral damage of lysosomal storage disorders. *EBioMedicine*, 63, 103166. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103166
- Niño, M. Y., Wijgerde, M., de Faria, D. O. S., Hoogeveen-Westerveld, M., Bergsma, A. J., Broeders, M., ... Pijnappel, W. (2021). Enzymatic diagnosis of Pompe disease: lessons from 28 years of experience. *Eur J Hum Genet*, 29(3), 434-446. DOI: 10.1038/s41431-020-00752-2
- Oberholzer, K. & Sewell, A. C. (1990). Unique oligosaccharide (apparently glucotetrasaccharide) in urine of patients with glycogen storage diseases. *Clin Chem*, 36(7), 1381.
- Oliveira Arcolino, F., Tort Piella, A., Papadimitriou, E., Bussolati, B., Antonie, D. J., Murray, P., ... Levchenko, E. (2015). Human Urine as a Noninvasive Source of Kidney Cells. *Stem Cells Int*, 2015, 362562. DOI: 10.1155/2015/362562
- Organisation International Pompe Association. Organisation International Pompe Association (IPA) Abgerufen am 14.01.2020. Verfügbar unter <https://www.worldpompe.org/>
- Parenti, G. (2009). Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol Med*, 1(5), 268-279. DOI: 10.1002/emmm.200900036



- Parenti, G. & Andria, G. (2011). Pompe disease: from new views on pathophysiology to innovative therapeutic strategies. *Curr Pharm Biotechnol*, 12(6), 902-915. DOI: 1389-2010/11 \$58.00+.00  
10.2174/138920111795542606
- Parenti, G., Moracci, M., Fecarotta, S. & Andria, G. (2014). Pharmacological chaperone therapy for lysosomal storage diseases. *Future Med Chem*, 6(9), 1031-1045. DOI: 10.4155/fmc.14.40
- Pauly, D. F., Johns, D. C., Matelis, L. A., Lawrence, J. H., Byrne, B. J. & Kessler, P. D. (1998). Complete correction of acid alpha-glucosidase deficiency in Pompe disease fibroblasts in vitro, and lysosomally targeted expression in neonatal rat cardiac and skeletal muscle. *Gene Ther*, 5(4), 473-480. DOI: 10.1038/sj.gt.3300609
- Pellegrini, N., Laforet, P., Orlikowski, D., Pellegrini, M., Caillaud, C., Eymard, B., ... Lofaso, F. (2005). Respiratory insufficiency and limb muscle weakness in adults with Pompe's disease. *Eur Respir J*, 26(6), 1024-1031. DOI: 10.1183/09031936.05.00020005
- Pena, L. D. M., Barohn, R. J., Byrne, B. J., Desnuelle, C., Goker-Alpan, O., Ladha, S., ... van der Ploeg, A. T. (2019). Safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exploratory efficacy of the novel enzyme replacement therapy avalglucosidase alfa (neoGAA) in treatment-naïve and alglucosidase alfa-treated patients with late-onset Pompe disease: A phase 1, open-label, multicenter, multinational, ascending dose study. *Neuromuscul Disord*, 29(3), 167-186. DOI: 10.1016/j.nmd.2018.12.004
- Piraud, M., Pettazzoni, M., de Antonio, M., Vianey-Saban, C., Froissart, R., Chabrol, B., ... Laforêt, P. (2020). Urine glucose tetrasaccharide: A good biomarker for glycogenoses type II and III? A study of the French cohort. *Mol Genet Metab Rep*, 23, 100583. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2020.100583
- Pompe Center. (2019). Pompe disease GAA variant database Abgerufen am 09.01.2020. Verfügbar unter [http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe\\_mutations\\_list.php?orderby=aMut\\_ID1](http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?orderby=aMut_ID1)
- Pompe, J. (1932). Over idiopathische hypertrofie van het hart. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 76, 304-311
- Putschar, W. (1932). *Über angeborene Glykogenspeicherkrankheit des Herzens – "Thesaurimosis glycogenica" (v. Gierke)*. .
- Raben, N., Fukuda, T., Gilbert, A. L., de Jong, D., Thurberg, B. L., Mattaliano, R. J., ... Plotz, P. H. (2005). Replacing acid alpha-glucosidase in Pompe disease: recombinant and transgenic enzymes are equipotent, but neither completely clears glycogen from type II muscle fibers. *Mol Ther*, 11(1), 48-56. DOI: 10.1016/j.ymthe.2004.09.017
- Raben, N., Hill, V., Shea, L., Takikita, S., Baum, R., Mizushima, N., ... Plotz, P. (2008). Suppression of autophagy in skeletal muscle uncovers the accumulation of ubiquitinated proteins and their potential role in muscle damage in Pompe disease. *Hum Mol Genet*, 17(24), 3897-3908. DOI: 10.1093/hmg/ddn292
- Raben, N., Wong, A., Ralston, E. & Myerowitz, R. (2012). Autophagy and mitochondria in Pompe disease: nothing is so new as what has long been forgotten. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160c(1), 13-21. DOI: 10.1002/ajmg.c.31317
- Rahmoune, H., Thompson, P. W., Ward, J. M., Smith, C. D., Hong, G. & Brown, J. (2005). Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 54(12), 3427-3434. DOI: 10.2337/diabetes.54.12.3427



- Regnery, C., Kornblum, C., Hanisch, F., Vielhaber, S., Strigl-Pill, N., Grunert, B., ... Schoser, B. (2012). 36 months observational clinical study of 38 adult Pompe disease patients under alglucosidase alfa enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*, 35(5), 837-845. DOI: 10.1007/s10545-012-9451-8
- Reuser, A. & Schoser, B. (2021). *Pompe Disease* (Bd. 3rd edition): UNI-MED Verlag AG, Bremen.
- Reuser, A. J., Kroos, M. A., Ponne, N. J., Wolterman, R. A., Loonen, M. C., Busch, H. F., ... Bolhuis, P. A. (1984). Uptake and stability of human and bovine acid alpha-glucosidase in cultured fibroblasts and skeletal muscle cells from glycogenosis type II patients. *Exp Cell Res*, 155(1), 178-189. DOI: 10.1016/0014-4827(84)90779-1
- Roth, J. C. & Williams, H. E. (1967). The muscular variant of Pompe's disease. *J Pediatr*, 71(4), 567-573. DOI: 10.1016/s0022-3476(67)80109-4
- Sanofi US. (2017). Lumizyme - the treatment experience. Abgerufen am 17.01.2020. Verfügbar unter [https://www.lumizyme.com/patients/getting\\_treatment/the\\_treatment\\_experience](https://www.lumizyme.com/patients/getting_treatment/the_treatment_experience)
- Sawada, T., Kido, J. & Nakamura, K. (2020). Newborn Screening for Pompe Disease. *Int J Neonatal Screen*, 6(2), 31. DOI: 10.3390/ijns6020031
- Schoser, B. (2019). Pompe disease: what are we missing? *Ann Transl Med*, 7(13), 292. DOI: 10.21037/atm.2019.05.29
- Schoser, B. (A 2007). Glykogenspeichererkrankung Typ 2 - Morbus Pompe. Neue pathophysiologische Aspekte und aktueller Stand der Enzymersatztherapie mit Alglucosidase-alfa. *Aktuelle Neurologie*, 34, 283-290.
- Schoser, B., Muller-Hocker, J., Horvath, R., Gempel, K., Pongratz, D., Lochmuller, H. & Muller-Felber, W. (2007). Adult-onset glycogen storage disease type 2: clinico-pathological phenotype revisited. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33(5), 544-559. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2007.00839.x
- Schoser, B., Roberts, M., Byrne, B. J., Sitaraman, S., Jiang, H., Laforêt, P., ... Kishnani, P. S. (2021). Safety and efficacy of cipaglucosidase alfa plus miglustat versus alglucosidase alfa plus placebo in late-onset Pompe disease (PROPEL): an international, randomised, double-blind, parallel-group, phase 3 trial. *Lancet Neurol*, 20(12), 1027-1037. DOI: 10.1016/s1474-4422(21)00331-8
- Schoser, B., Stewart, A., Kanters, S., Hamed, A., Jansen, J., Chan, K., ... Toscano, A. (2017). Survival and long-term outcomes in late-onset Pompe disease following alglucosidase alfa treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol*, 264(4), 621-630. DOI: 10.1007/s00415-016-8219-8
- Schüller, A., Kornblum, C., Deschauer, M., Vorgerd, M., Schrank, B., Mengel, E., ... Schoser, B. (2013). Diagnosis and therapy of late onset Pompe disease. *Nervenarzt*, 84(12), 1467-1472. DOI: 10.1007/s00115-013-3947-9
- Schüller, A., Wenninger, S., Strigl-Pill, N. & Schoser, B. (2012). Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 160c(1), 80-88. DOI: 10.1002/ajmg.c.31322
- Sista, R. S., Wang, T., Wu, N., Graham, C., Eckhardt, A., Winger, T., ... Pamula, V. K. (2013). Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. *Clin Chim Acta*, 424, 12-18. DOI: 10.1016/j.cca.2013.05.001
- Slonim, A. E., Bulone, L., Goldberg, T., Minikes, J., Slonim, E., Galanko, J. & Martiniuk, F. (2007). Modification of the natural history of adult-onset acid maltase deficiency by nutrition and exercise therapy. *Muscle Nerve*, 35(1), 70-77. DOI: 10.1002/mus.20665

- Solomon, E., Swallow, D., Burgess, S. & Evans, L. (1979). Assignment of the human acid alpha-glucosidase gene (alphaGLU) to chromosome 17 using somatic cell hybrids. *Ann Hum Genet*, 42(3), 273-281. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1979.tb00661.x
- Strothotte, S., Strigl-Pill, N., Grunert, B., Kornblum, C., Eger, K., Wessig, C., ... Schoser, B. (2010). Enzyme replacement therapy with alglucosidase alfa in 44 patients with late-onset glycogen storage disease type 2: 12-month results of an observational clinical trial. *J Neurol*, 257(1), 91-97. DOI: 10.1007/s00415-009-5275-3
- Sugie, K., Yamamoto, A., Murayama, K., Oh, S. J., Takahashi, M., Mora, M., ... Nishino, I. (2002). Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology*, 58(12), 1773-1778. DOI: 10.1212/wnl.58.12.1773
- Sutherland, G. R. & Bain, A. D. (1972). Culture of cells from the urine of newborn children. *Nature*, 239(5369), 231. DOI: 10.1038/239231a0
- Tajima, Y., Matsuzawa, F., Aikawa, S. I., Okumiya, T., Yoshimizu, M., Tsukimura, T., ... Sakuraba, H. (2007). Structural and biochemical studies on Pompe disease and a "pseudodeficiency of acid alpha-glucosidase". *J Hum Genet*, 52(11), 898-906. DOI: 10.1007/s10038-007-0191-9
- Tarnopolsky, M., Katzberg, H., Petrof, B. J., Sirrs, S., Sarnat, H. B., Myers, K., ... Khan, A. (2016). Pompe Disease: Diagnosis and Management. Evidence-Based Guidelines from a Canadian Expert Panel. *Can J Neurol Sci*, 43(4), 472-485. DOI: 10.1017/cjn.2016.37
- Taverna, S., Cammarata, G., Colomba, P., Sciarrino, S., Zizzo, C., Francofonte, D., ... Duro, G. (2020). Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis. *Aging (Albany NY)*, 12(15), 15856-15874. DOI: 10.18632/aging.103794
- Tayhan, S. E., Keles, G. T., Topcu, I., Mir, E. & Gurhan, S. I. D. (2017). Isolation and in vitro cultivation of human urine-derived cells: an alternative stem cell source. *Turk J Urol*, 43(3), 345-349. DOI: 10.5152/tud.2017.93797
- Technologies, A. (2019). *Glycolysis Stress Test Kit User Guide*.
- Thurberg, B. L., Lynch Maloney, C., Vaccaro, C., Afonso, K., Tsai, A. C., Bossen, E., ... O'Callaghan, M. (2006). Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest*, 86(12), 1208-1220. DOI: 10.1038/labinvest.3700484
- Toscano, A., Rodolico, C. & Musumeci, O. (2019). Multisystem late onset Pompe disease (LOPD): an update on clinical aspects. *Ann Transl Med*, 7(13), 284. DOI: 10.21037/atm.2019.07.24
- Toscano, A. & Schoser, B. (2013). Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *J Neurol*, 260(4), 951-959. DOI: 10.1007/s00415-012-6636-x
- Ugorski, M., Seder, A., Lundblad, A. & Zopf, D. (1983). Studies on the metabolic origin of a glucose-containing tetrasaccharide in human urine. *J Exp Pathol*, 1(1), 27-38.
- Van den Hout, H., Reuser, A. J., Vulto, A. G., Loonen, M. C., Cromme-Dijkhuis, A. & Van der Ploeg, A. T. (2000). Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet*, 356(9227), 397-398. DOI: 10.1016/s0140-6736(00)02533-2
- van den Hout, H. M., Hop, W., van Diggelen, O. P., Smeitink, J. A., Smit, G. P., Poll-The, B. T., ... van der Ploeg, A. T. (2003). The natural course of infantile Pompe's disease: 20 original cases compared with 133 cases from the literature. *Pediatrics*, 112(2), 332-340. DOI: 10.1542/peds.112.2.332

- van der Meijden, J. C., Kruijshaar, M. E., Harlaar, L., Rizopoulos, D., van der Beek, N. & van der Ploeg, A. T. (2018). Long-term follow-up of 17 patients with childhood Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*, 41(6), 1205-1214. DOI: 10.1007/s10545-018-0166-3
- van der Ploeg, A. T., Clemens, P. R., Corzo, D., Escolar, D. M., Florence, J., Groeneveld, G. J., ... Zivkovic, S. A. (2010). A randomized study of alglucosidase alfa in late-onset Pompe's disease. *N Engl J Med*, 362(15), 1396-1406. DOI: 10.1056/NEJMoa0909859
- van der Ploeg, A. T., Kruijshaar, M. E., Toscano, A., Laforet, P., Angelini, C., Lachmann, R. H., ... Schoser, B. (2017). European consensus for starting and stopping enzyme replacement therapy in adult patients with Pompe disease: a 10-year experience. *Eur J Neurol*, 24(6), 768-e731. DOI: 10.1111/ene.13285
- van der Ploeg, A. T. & Reuser, A. J. (2008). Pompe's disease. *Lancet*, 372(9646), 1342-1353. DOI: 10.1016/s0140-6736(08)61555-x
- van Gelder, C. M., Hooegeveen-Westerveld, M., Kroos, M. A., Plug, I., van der Ploeg, A. T. & Reuser, A. J. (2015). Enzyme therapy and immune response in relation to CRIM status: the Dutch experience in classic infantile Pompe disease. *J Inherit Metab Dis*, 38(2), 305-314. DOI: 10.1007/s10545-014-9707-6
- Wang, W. T., Kumlien, J., Ohlson, S., Lundblad, A. & Zopf, D. (1989). Analysis of a glucose-containing tetrasaccharide by high-performance liquid affinity chromatography. *Anal Biochem*, 182(1), 48-53. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90716-1
- Welsch, U. & Deller, T. (2010). *Lehrbuch Histologie* (Elsevier, Hrsg. 3 Aufl.): Elsevier.
- Winkel, L. P., Kamphoven, J. H., van den Hout, H. J., Severijnen, L. A., van Doorn, P. A., Reuser, A. J. & van der Ploeg, A. T. (2003). Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy. *Muscle Nerve*, 27(6), 743-751. DOI: 10.1002/mus.10381
- Xu, S., Lun, Y., Frascella, M., Garcia, A., Soska, R., Nair, A., ... Khanna, R. (2019). Improved efficacy of a next-generation ERT in murine Pompe disease. *JCI Insight*, 4(5). DOI: 10.1172/jci.insight.125358
- Yang, Z. & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12(9), 814-822. DOI: 10.1038/ncb0910-814
- Young, S. P., Stevens, R. D., An, Y., Chen, Y. T. & Millington, D. S. (2003). Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*, 316(2), 175-180. DOI: 10.1016/s0003-2697(03)00056-3
- Zaretsky, J. Z., Candotti, F., Boerkoel, C., Adams, E. M., Yewdell, J. W., Blaese, R. M. & Plotz, P. H. (1997). Retroviral transfer of acid alpha-glucosidase cDNA to enzyme-deficient myoblasts results in phenotypic spread of the genotypic correction by both secretion and fusion. *Hum Gene Ther*, 8(13), 1555-1563. DOI: 10.1089/hum.1997.8.13-1555
- Zellweger, H., Brown, B. I., McCormick, W. F. & Tu, J. B. (1965). A mild form of muscular glycogenosis in two brothers with alpha-1, 4-glucosidase deficiency. *Ann Paediatr*, 205(6), 413-437.
- Zhang, H., Kallwass, H., Young, S. P., Carr, C., Dai, J., Kishnani, P. S., ... Bali, D. (2006). Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease. *Genet Med*, 8(5), 302-306. DOI: 10.1097/01.gim.0000217781.66786.9b

- Zhang, Y., McNeill, E., Tian, H., Soker, S., Andersson, K. E., Yoo, J. J. & Atala, A. (2008). Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol*, 180(5), 2226-2233. DOI: 10.1016/j.juro.2008.07.023
- Zhou, T., Benda, C., Dunzinger, S., Huang, Y., Ho, J. C., Yang, J., ... Esteban, M. A. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*, 7(12), 2080-2089. DOI: 10.1038/nprot.2012.115
- Zhu, Y., Jiang, J. L., Gumlaw, N. K., Zhang, J., Bercury, S. D., Ziegler, R. J., ... Cheng, S. H. (2009). Glycoengineered acid alpha-glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations and motor function deficits in a mouse model of Pompe disease. *Mol Ther*, 17(6), 954-963. DOI: 10.1038/mt.2009.37
- Zopf, D. A., Levinson, R. E. & Lundblad, A. (1982). Determination of a glucose-containing tetrasaccharide in urine by radioimmunoassay. *J Immunol Methods*, 48(1), 109-119. DOI: 10.1016/0022-1759(82)90215-0

## 12 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Der Prozess der Autophagie: Zellbestandteile des Zytoplasmas werden in das Innere von Autophagosomen eingeschlossen. Autophagosome verschmelzen mit Lysosomen zu Autolysosomen, in denen die Zellbestandteile durch Hydrolasen in ihre Grundbausteine abgebaut werden. Diese werden zurück ins Zytoplasma sezerniert und dienen als neue Bausteine. Dieser Prozess dient der zellulären Homöostase. Quelle: Deutsches Ärzteblatt 2016; 113 (40).....9
- Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus für die adulte Form (LOPD, Symptombeginn >1.LJ). Quelle: (Kishnani et al., 2006, B 2006), Bildrechte wurden über Elsevier genehmigt.....13
- Abbildung 3: Häufige Symptome und Untersuchungsbefunde des LOPD. Quelle: Schüller et al., 2013, Diagnose und Therapie des Late-onset-Morbus-Pompe, Der Nervenarzt 84: 1467-1472. Bildrechte wurden über Springer Nature BV genehmigt. ....14
- Abbildung 4: Seahorse XFp AnalyzerAnalyzer von der Firma Agilent. Quelle: Agilent Technologies, Broschüre Agilent Seahorse XFp zAnalyzer – Generate Functional Metabolic Data on Limited Samples 2017. Die Bildrechte wurden von Springer Nature BV genehmigt.....24
- Abbildung 5: Seahorse XFp AnalyzerAnalyzer. Schematische Darstellung der Technologie: Die Zellen werden in die Wells der speziellen Seahorse XF Zellkultur-Mikroplatten ausgesäht. Über Ports werden nacheinander Reagenzien injiziert. In der Mikrokommer aus Zellen bzw. Zellsuspension und Reagenzien werden über Messsonden die Stoffwechselforgänge als veränderte Protonenkonzentration im extrazellulären Medium erfasst. Quelle: Broschüre von Agilent Entdecken Sie die wichtigsten Faktoren für Zellschicksal, - funktion und – fitness. Agilent Seahorse XF Analyseplattform 2021. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.  
31
- Abbildung 6: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Profil der glykolytischen Aktivität. Darstellung der Kit Injektionen und davon abhängig gemessene basale Glykolyse-Rate, maximale glykolytische Aktivität und glykolytische Reserve. Quelle: Agilent Technologies, Glycolysis Stress Test User Guide 2019. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.....32
- Abbildung 7: Agilent Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit Reagenzien. Quelle: Agilent Technologies, Glycolysis Stress Test User Guide 2019. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt.....34
- Abbildung 8: Vorbereitung der Stammlösungen. Quelle: Agilent Technologies, Glycolysis Stress Test User Guide 2019. Die Bildrechte wurden von der Firma Agilent erteilt. ....35
- Abbildung 9: Darstellung der variierenden Zelldichte in Urinproben kurz nach Urinzellisolation. Die Urinproben stammten von der weiblichen Kontrolle 1 und umfassten jeweils 100 ml. Die drei Proben wurden am gleichen Tag zu unterschiedlichen Tageszeiten entnommen und direkt im Anschluss nach gleichem Verfahren isoliert und kultiviert. Scale Bar 200 µm.....38

Abbildung 10: Mikroskopische Abbildung von Urinzellen kurz nach Zellisolation. A): Zellisolation aus einer Probe von Probandin 1, Aufnahme am vierten Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich vermutlich hauptsächlich um Plattenepithelzellen. B): Zellisolation aus einer Probe von Proband 2, Aufnahme am vierten Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich bei den dominierenden rundlichen Zellen vermutlich um Blutzellen. C): Zellisolation aus einer Probe von Proband 2, Aufnahme am dritter Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich bei den dominierenden rundlichen Zellen vermutlich um Blutzellen, Lipidtröpfchen und abgestorbenen Zellen. D): Zellisolation aus einer Probe von Probandin 5, Aufnahme am zweiten Tag nach Zellisolation. Nach morphologischem Vergleich mit Aufnahmen der Zelltypen aus der Literatur handelt es sich wahrscheinlich um abgestorbene Zellen, Plattenepithelzellen und einige Blutzellen. A)-D): Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .

3

9

Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen Urinzellkulturen. A): Urinzellkultur aus 100 ml Urinprobe der weiblichen Kontrolle 5 am dritten Tag nach Urinzellisolation. B): Urinzellkultur aus 200 ml Urinprobe der männlichen Kontrolle 2 am dritten Tag nach Urinzellisolation. A)-B): Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .....40

Abbildung 12: Mikroskopische Fotos von Urinepithelzell-Kolonien. A): Zellkultur aus einer Urinprobe von Kontrolle 3. Aufnahme am Tag 26 nach Urinzellisolation. Typ I Zellen sind mit Pfeil markiert. B): Zellkultur aus einer Urinprobe von Kontrolle 2. Aufnahme am Tag 26 nach Urinzellisolation. Typ II Zellen sind mit Pfeil markiert. A)-B): Scale-Bar: 100  $\mu\text{m}$ .....41

Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahmen einer Urinzellkultur an verschiedenen Tagen. Die Probe stammt von der Kontrolle 2. Die Aufnahmen zeigen die Urinzellkultur im zeitlichen Verlauf der Urinzellexpansion von Tag 1 bis Tag 43. A): Aufnahme am Tag 1 nach Urinzellisolation. Mikroskopisch zeigten sich viele nicht adhärenente Zellen. B): Tag 4 nach Urinzellisolation. Erste adhärenente Zellen, vermutlich handelt es sich um proliferierende Urinepithelzellen. C): Tag 7 nach Urinzellisolation; Proliferierende Zellen, welche eine Zell kolonie bilden. Weiterhin viele nicht adhärenente Zellen. D): Tag 15 nach Urinzellisolation. Es bildet sich eine dichte Zellkolonie. E): Wachsende Zellkolonie, welche nach bildmorphologischem Vergleich hauptsächlich Urinepithelzellen vom Typ II entspricht. F) -I): keine weitere Proliferation der Zellen, die Zellen werden zunehmend apoptotisch F): Tag 22 nach Urinzellisolation. G): Tag 27 nach Urinzellisolation. H): Tag 30 nach Urinzellisolation. I): Tag 38 nach Urinzellisolation J): Tag 43 nach Urinzellisolation. A)-F): Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .....42

Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahme von einer Urinzellkultur vor und nach Waschen mit DPBS. Die Urinzellisolation erfolgte aus einer 50 ml Urinprobe der weiblichen Kontrolle 4. A): Zellreiche Probe mit v.a. Plattenepithelzellen, Aufnahme an Tag 2 nach Zellisolation. B): Deutliche Zellreduktion nach Waschen des Wells. Aufnahme von Tag 7 nach Zellisolation A)-B): Scale Bar 200  $\mu\text{m}$ .....43

Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen von Urinepithelzell-Kolonien auf verschieden beschichteten Platten. Zur Urinzellisolation für die Zellkulturen wurde jeweils 30 ml Urin einer Probe von der männlichen Kontrolle 2 genutzt. Die Aufnahmen wurden an Tag 13 nach Urinzellisolation gemacht. A):Gelatine B):Kollagen C):Matrigel D):Polylysin A)-D): Scale-Bar: 100 µm.....	44
Abbildung 16: Graphische Darstellung der in Tabelle 5 aufgeführten Messwerte des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Pompe Myoblasten-Probe (P11) und einer Myoblastenprobe einer gesunden Kontrolle (K13). Darstellung der gemessenen glykolytischen Funktion als ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. Die gemessenen Werte der ECAR vor Reagenzinjektion kommen durch nicht-glykolytische Ansäuerung des umgebenden Mediums zustande. Nach der ersten Injektion von Glucose steigt die ECAR, die Messwerte entsprechen der basalen Glykolyserate der Zellen. Nach der Injektion von Oligomycin steigt die ECAR auf ihr Maximum, welches der glykolytischen Kapazität der Zellen entspricht. Durch Injektion von 2-DG fällt die ECAR auf den Wert, der durch die nicht-glykolytische Ansäuerung des Mediums erreicht wird. Die ECAR-Werte der gesunden Kontrolle K13 liegen in allen Messpunkten deutlich über denen des Pompe-Patienten P11. ....	48
Abbildung 17: Fotos der mikroskopischen Ansicht von Urinepithelzellen nach Zugabe von Trypsin zur Zellablösung. Beurteilung der Adhärenz nach Zentrifugation. A): nach erster Zentrifugation B): erhöhte Zelldichte nach zweiter Zentrifugation C): erhöhte Zelldichte nach dritter Zentrifugation D): erhöhte Zelldichte nach vierter Zentrifugation. ....	51
Abbildung 18: Graphische Darstellung der in Tabelle 7 aufgeführten Messwerte des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Urinepithelzellprobe von Patient 2 (P2). Darstellung der gemessenen glykolytischen Funktion als ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. Die gemessenen Werte der ECAR vor Reagenzinjektion kommen durch nicht-glykolytische Ansäuerung des umgebenden Mediums zustande. In den ersten 15 Min liegt die ECAR zwischen 100 und 200 mpH/min. Nach der ersten Injektion von Glucose steigt die ECAR in einem Zeitraum von 10 Min auf 350 mpH/min. Die ECAR entspricht der basalen Glykolyserate der Zellen. Nach der Injektion von Oligomycin 35 Min nach Beginn der Messung steigt die ECAR auf ihr Maximum von 500 mpH/min, welches der glykolytischen Kapazität der Zellen entspricht. Durch Injektion von 2-DG fällt die ECAR auf den Wert der durch die nicht-glykolytische Ansäuerung des Mediums erreicht wird. ....	53
Abbildung 19: Glykolytische Funktion Patient 5 und Proband 3. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	93
Abbildung 20: Glykolytische Funktion Patient 1 und Proband 1. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	94
Abbildung 21: Glykolytische Funktion Patient 6 und Proband 1. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	95

Abbildung 22: Glykolytische Funktion Patient 7 und Proband 4. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	96
Abbildung 23: Glykolytische Funktion Patient 5 und Proband 2. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	97
Abbildung 24: Glykolytische Funktion Patient 8 und Proband 11. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	98
Abbildung 25: Glykolytische Funktion Patient 6 und Proband 6. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	99
Abbildung 26: Glykolytische Funktion Patient 9 und Proband 2. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	100
Abbildung 27: Glykolytische Funktion Patient 10 und Proband 5. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	101
Abbildung 28: Glykolytische Funktion Patient 1 und Proband 10. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	102
Abbildung 29: Glykolytische Funktion Patient 4 und Proband 12. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	103
Abbildung 30: Glykolytische Funktion Patient 2 und Proband 7. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG. ....	104



## 13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Differentialdiagnosen des LOPD. Quelle: Schüller et al., 2013, Diagnose und Therapie des Late-onset-Morbus-Pompe, Der Nervenarzt 84: 1467-1472. ....	15
Tabelle 2:	Liste aller an Morbus Pompe erkrankten Patient*innen (P). Geschlecht w = weiblich, m = männlich, Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme, Probe.....	28
Tabelle 3:	Liste aller gesunden Kontrollen (K). Geschlecht w = weiblich, m = männlich, Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme, Probe.....	28
Tabelle 4:	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Urinzellkultivierung. Von insgesamt 104 Proben konnte in 13 Proben mikroskopisch Urinzellkolonien nachgewiesen werden. ....	37
Tabelle 5:	Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Pompe Patienten Myoblastenprobe (P11) und einer Myoblastenprobe einer gesunden Kontrolle (K13). In der Tabelle sind die Ergebnisse der zwölf Messungen als auf die Zellzahl normalisierten ECAR-Werte in mpH/Min/105Zellen der Wells E-D angegeben. Die Wells E-G wurden wie im Methodenteil unter 6.6 Seahorse XFp Analyse aufgeführt mit Myoblasten des Pompe Patienten P11 befüllt. Die Wells B-D wurden mit Myoblasten der gesunden Kontrolle K13 befüllt. Die drei Messungen zu den Messzeitpunkten 1-3 erfolgten vor Reagenzinjektion, die drei Messpunkte 4-6 erfolgten nach Injektion von Glucose, Messpunkte 7-9 erfolgten nach Injektion von Oligomycin und die Messpunkte 10-12 erfolgten nach Injektion von 2-DG. Aus den drei Messungen der Wels von P11 bzw. K13 wurden zu einem Messpunkt x jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Vergleicht man die Mittelwerte zwischen P11 und K13 der Messpunkte 1-12 fällt auf, dass die ECAR-Werte der Pompe-Proben in allen Messpunkten niedriger sind als die der gesunden Kontrolle. ....	47

Tabelle 6:	<p>Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Pompe Myoblasten-Probe (P11) und einer Myoblastenprobe einer gesunden Kontrolle (K13): Berechnung der Glykolyse, Glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. Unter Abwesenheit von Glucose oder Pyruvat im Medium entspricht die gemessene ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung des extrazellulären Mediums. Als Messwert wurde die letzte Messung vor Glucose-Injektion, zum Zeitpunkt Messpunkt 3, gewählt. Die in Tabelle 6 aufgeführten Werte der nichtglykolytischen Ansäuerung von P11 und K13 wurden aus den Mittelwerten der Wells B-D (für K13) und E-G (für P11) berechnet (siehe Tabelle 5) Die Glucose-Injektion führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Zur Berechnung der Glykolyse-Rate wurden für P11 der Mittelwert der maximalen Messwerte der Messpunkte 4-6 der Wells E-G bzw. für K13 der Wells B-D bestimmt. Um die alleinige Glykolyse-Rate der Zellen zu berechnen, wurde von den Werten die Messwerte der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Nach Oligomycin-Injektion lief die zelluläre Energiegewinnung ausschließlich über die zytoplasmatische Glykolyse ab. Die nun gemessene ECAR entspricht der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Für die Berechnung der glykolytischen Kapazität wurde von den Mittelwerten der maximalen Messwerte der Messpunkte 7-9 die ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. ....49</p>
Tabelle 7:	<p>Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Urinzellprobe nach Zellkultivierung von Pompe Patient P2. In der Tabelle sind die Ergebnisse als Rohdaten der zwölf Messungen als ECAR-Werte in mpH/Min angegeben. Durch die vorangegangene Zellkultivierung konnte nur Zellmaterial für die Befüllung eines Wells kultiviert werden. Die Messung verlief ohne Kontrolle. Die drei Messungen zu den Messzeitpunkten 1-3 erfolgten vor Reagenzinjektion, die drei Messpunkte 4-6 erfolgten nach Injektion von Glucose, Messpunkte 7-9 erfolgten nach Injektion von Oligomycin und die Messpunkte 10-12 erfolgten nach Injektion von 2-DG. ....52</p>
Tabelle 8:	<p>Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests einer Urinzellprobe nach Zellkultivierung von Pompe Patient P2. Berechnung der Glykolyse, glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. Als Messwert für die nicht-glykolytischen Ansäuerung wurde die letzte Messung vor Glucose-Injektion, zum Zeitpunkt Messpunkt 3, gewählt. Die Glucose-Injektion führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Zur Berechnung der Glykolyse-Rate wurde der maximale Messwert der Messpunkte 4-6 bestimmt. Um die alleinige Glykolyse-Rate der Zellen zu berechnen wurde der Messwert der nicht-glykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Nach Oligomycin-Injektion entsprechen die gemessenen ECAR-Werte der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Für die Berechnung der glykolytischen Kapazität wurde von dem maximalen Messwert der Messpunkte 7-9 die ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Die Differenz zwischen der glykolytischen Kapazität und der basalen Glykolyse-Rate entspricht der glykolytischen Reserve der Zellen. ....54</p>

- Tabelle 9: Zusammenfassende Darstellung der Seahorsemessungen mit Urinzellgemisch als Proben. Für In jeder einzelnen Messung wurde die glykolytische Aktivität (GA) der Probe eines/r Proband\*in (K) mit der eines/r Patient\*in (P) gemessen. Glykolytische Aktivität, gemessen als ECAR, konnte in einer Probe von P5, K4 und P7 gemessen werden. GA = Glykolytische Aktivität, KP = Kontrollprobe, PP = Patient\*innenprobe.....56
- Tabelle 10: Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung eines Pompe Patienten (P7) und einer gesunden Kontrolle (K4). In der Tabelle sind die Ergebnisse der zwölf Messungen als Rohdaten der gemessenen ECAR-Werte in mpH/Min der Wells E-D angegeben. Die Wells E-G wurden wie im Methodenteil unter 6.5.2 *Messung der glykolytischen Aktivität mittels Seahorse XFp zAnalyzer* aufgeführt mit Zellen des Urinzellgemischs des Pompe Patienten P7 befüllt. Die Wells B-D wurden mit Zellen des Urinzellgemischs der gesunden Kontrolle K4 befüllt. In beiden Proben konnte glykolytische Aktivität der Zellen gemessen werden. Die drei Messungen zu den Messzeitpunkten 1-3 erfolgten vor Reagenzinjektion, nach Injektion von Glucose zeigten sich wie erwartet sowohl in den Wells von P7 als auch K4 ein Anstieg der ECAR in den Messpunkten 4-6. Nach Injektion von Oligomycin zeigten sich in beiden Proben die maximalen Messwerte (Messpunkte 7-9). Die Injektion von 2-DG führte wie erwartet zu einem Abfall der ECAR in den Messpunkten 10-12. Aus den drei Messungen der Wells von P7 bzw. K4 wurden zu einem Messpunkt x jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Ein Vergleich der Messwerte zwischen P7 und K4 ist aufgrund der ungenauen Zellzahlbestimmung nur eingeschränkt möglich.....56
- Tabelle 11: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung von Pompe Patienten (P7) und der gesunden Kontrolle (K4). Berechnung der Glykolyse, Glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. Als Messwerte für die nicht-glykolytischen Ansäuerung wurden die Mittelwerte der letzten Messungen vor Glucose-Injektion, zum Zeitpunkt Messpunkt 3, gewählt. Die Glucose-Injektion führte zu einem messbaren Anstieg der ECAR, was der basalen Glykolyse-Rate der Zellen entspricht. Zur Berechnung der Glykolyse-Rate wurden für P7 der Mittelwert der maximalen Messwerte der Messpunkte 4-6 der Wells E-G bzw. für K4 der Wells B-D bestimmt. Um die alleinige Glykolyse-Rate der Zellen zu berechnen wurden von den Werten die Messwerte der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Nach Oligomycin-Injektion entsprechen die gemessenen ECAR-Werte der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Für die Berechnung der glykolytischen Kapazität wurde von den Mittelwerten der maximalen Messwerte der Messpunkte 7-9 die ECAR der nichtglykolytischen Ansäuerung subtrahiert. Die Differenz zwischen der maximalen glykolytischen Aktivität, der glykolytischen Kapazität, und der basalen Glykolyse-Rate entspricht der glykolytischen Reserve der Zellen. ....57

Tabelle 12:	Messergebnisse des Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung eines Pompe Patienten (P5) und einer gesunden Kontrolle (K3). Alle Messergebnisse der Probe von P5 liegen unterhalb von 5 mpH/Min. Alle Messergebnisse der Probe K3 liegen unterhalb von 0 mpH/Min. Aufgrund der negativen Werte sind die Messergebnisse nicht aussagekräftig, die Messung ist nicht verwertbar. ....	59
Tabelle 13:	Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Tests durchgeführt mit Urinzellproben ohne vorangegangene Zellkultivierung von Pompe Patienten (P5) und der gesunden Kontrolle (K3). Berechnung der Glykolyse, Glykolytischen Kapazität, glykolytischen Reserve und nicht-glykolytischen Ansäuerung des Mediums. ....	59

## 14 Anhang

### 14.1 Protokoll der Seahorse XFp Messung mit kultivierten Pompe-Urinepithelzellen

Im Folgenden ist das detaillierte Vorgehen der Seahorse-Messung mit kultivierten Urinepithelzellen aus einer Urinprobe eines männlichen Pompe-Patienten beschrieben.

Da in keiner der sechs Patienten-Proben die gewünschte Dichte an Urinepithelzellen durch Zellkultivierung erreicht wurde nutzte ich die einzige Probe mit Koloniewachstum. Für die Messung wurde die am 26.04.2018 gewonnene Probe von Patient 2 mit 130ml Volumen genutzt. Die Urinzellisolation und Urinzellexpansion erfolgte gemäß den in Methodenteil unter 7.1 Urinprobengewinnung und 7.3 Urinzellisolation beschriebenen Protokollschritten. Bis zum 18.05.2019 wuchsen drei Epithelzellkolonien.

Die Vorbereitungsschritte am Vortag der Messung erfolgten unter 7.6. Seahorse XFp Analyse beschrieben. Zur Aufbringung der Zellsuspension auf die vorbereitete Zellkulturplatte modifizierte ich das oben beschriebene Protokoll. Zunächst nahm ich das Medium von der 12-Well-Platte aus der Zellkultur ab und wusch die Probe einmal mit PBS. Anschließend gab ich 250 µl Trypsin in einer Verdünnung von 1:10 auf das Well und stellte die Platte für drei Minuten bei 37°C in einen Inkubator. Ich überprüfte unter einem Mikroskop, ob sich die Zellen gut ablösten. Ich fügte dem Well 3 ml RE Proliferationsmedium hinzu und überführte die Zellen mit dem Medium in ein 15 ml Falcon. Dieses wurde anschließend bei 1000g für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Ich pipettierte 50 µl der Zellsuspension vom Falconboden in ein Well der mit Gelatine beschichteten Zellkulturplatte. Aufgrund von zu wenig vorhandenem Zellmaterial konnte ich nur ein Well mit Zellsuspension befüllen, es gab keine Kontrolle. Um die Adhärenz der Zellen beurteilen zu können kontrollierte ich die Probe unter dem Mikroskop. Anschließend zentrifugierte ich die Zellkulturplatte bei 300 g für eine Minute um die Zelladhärenz am Wellboden zu erhöhen. Da die Zelldichte gering war nahm ich das Medium aus dem entsprechenden Well ab und fügte erneut 50 µl der Zellsuspension hinzu und zentrifugierte die Probe erneut. Diese Schritte wiederholte ich insgesamt viermal bis unter dem Mikroskop eine erhöhte Zelldichte feststellbar war (s. Abbildung 3). Im Folgenden pipettierte ich in jedes Well 180 µl Assaymedium. In jede umgebende Kammer pipettierte ich je 400 µl PBS. Anschließend wurde die Zellkulturplatte für 30 Minuten in einen Kohlenstoffdioxidfreien Inkubator bei 37°C gegeben um die Temperatur der Proben zu äquilibrieren.

Um die Stammlösungen anzusetzen fügte ich den Kit-Komponenten die entsprechenden Mengen an Assaymedium zu. Die Kassette wurde aus dem Inkubator genommen und die Ports wurden mit den entsprechenden Mengen der Stammlösungen befüllt.

Zum Start der Messung wurde der Seahorse XFp Analyzer gestartet, der Glycolysis Stress Test ausgewählt, die Kassette eingelegt und die Kalibrierung gestartet. Anschließend wurde die Zellkulturplatte eingesetzt und die Messung gestartet. Am Ende jeder Messung habe ich erneut die Zelladhärenz unter dem Mikroskop geprüft.

Die Urinepithelzellen ließen sich mittels Trypsinierung gut von der 12-Well-Zellkulturplatte ablösen. Nach einmaligem aufbringen der Zellsuspension und einmaligem Zentrifugieren war die mikroskopisch geprüfte Zelldichte zu gering für eine Messung. Die optimale Zellkonzentration liegt laut Benutzerhandbuchs zur Verwendung von Suspensionszellen zwischen  $1 \times 10^5$  und  $4 \times 10^5$  Zellen pro Well (Agilent Technologies, 2017, S. 1-2 Seeding Suspension Cells in Agilent Seahorse XFp Cell Culture Miniplates). Durch mehrfache Wiederholung des Auftragens der Zellsuspension und Zentrifugation konnte die Zelldichte erhöht werden.

## **14.2 Ausführliche Ergebnisse der Seahorse XFp Messungen mit Urinzellgemischproben**

Im Folgenden sind die Ergebnisse der zwölf Seahorse-Messungen beschrieben. In jeder Messung wurde je eine Probe eines/einer an Morbus Pompe erkrankten Patient\*in und eine Probe eines/einer gesunden Proband\*in als Kontrolle verwendet. Die Urinprobenvolumina umfassten minimal 80 ml und maximal 200 ml. Die Ergebnisse der Messungen sind in den folgenden zwölf Abbildungen dargestellt. Die roten Kurven zeigen die Messungen der Pompe-Patient\*innen Proben, die blauen Kurven die der gesunden Proband\*innen als Kontrolle. Die gemessene ECAR der drei Wells von Patient\*in bzw. Kontrolle werden in einem Messpunkt gemittelt dargestellt. Jede Kurve zeigt insgesamt zwölf Messpunkte. Die ersten drei Messpunkte geben die ECAR vor Glucose-Injektion an und entsprechen der nicht-glykolytischen Ansäuerung. Die Messpunkte vier bis sechs zeigen die ECAR nach Glucose-Injektion und entsprechen der basalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Die Messpunkte sieben bis neun zeigen die ECAR nach Oligomycin-Injektion, welche der glykolytischen Kapazität der Zellen entspricht. Die letzten drei Messpunkte zeigen die ECAR nach 2-DG-Injektion, wodurch die Glykolyse inhibiert wird.

Um eine Zellkonzentration von ca.  $1 \times 10^5$  Zellen/Well zu erreichen versuchte ich die Zellzahl in der Zellsuspension mittels Zellcounter zu bestimmen. Dazu fügte ich 10  $\mu\text{l}$  Trypan Blau zu 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension hinzugeben und gab 10  $\mu\text{l}$  der Mischung auf ein Zellzähler-Deckglas. In den Proben wurde folgende Lebendzellzahlen bestimmt:

K3 :  $2,14 \times 10^5$  Zellen/ml

P5:  $2,20 \times 10^5$  Zellen/ml

Anmerkung: Die Zellzahlen des Zellcounters scheinen nach mikroskopischer Überprüfung nicht exakt zu sein.

- Errechnen des zu pipettierenden Volumens an Zellsuspension zum Erhalt der erwünschten Zellzahl:
- 
- Gewünschtes Volumen (V) ist festgelegt: z.B. drei Proben (in Seahorse wird eine Probe immer in 3 Wells aufgetragen) a 50  $\mu\text{l}$  = 150  $\mu\text{l}$  -> aufrunden auf 200  $\mu\text{l}$
- Verdünnungsfaktor (F)  $F = (N(\text{ist})) / (N(\text{soll}))$
- Volumen Zellsuspension:  $V = (V(\text{gewünscht})) / F$
- Volumen Proliferationsmedium = 200  $\mu\text{l}$  – V (Zellsuspension)

Zellen K3.:  $F = 2,14$

1) 93,5  $\mu\text{l}$  Zellsuspension

200-93,4 = 106,5  $\mu\text{l}$  Assaymedium

2) Doppelte Menge an Zellsuspension 186  $\mu\text{l}$ , 200-186 = 14  $\mu\text{l}$  Assaymedium

3) Doppelte Menge an Zellsuspension 186  $\mu\text{l}$ , 200-186 = 14  $\mu\text{l}$  Assaymedium

Zellen P5:  $F = 2,2$

1) 91  $\mu\text{l}$  Zellsuspension

200-91 = 109  $\mu\text{l}$  Assaymedium

2) Doppelte Menge an Zellsuspension 182  $\mu\text{l}$ , 200-182 = 18  $\mu\text{l}$  Assaymedium

3) Doppelte Menge an Zellsuspension 182  $\mu\text{l}$ , 200-182 = 18  $\mu\text{l}$  Assaymedium

Es wurden 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension-Assaygemisch in die Wells B-G geben. Die Wells A und H dienten als Backgroundkontrollen. Die Platte wurde mittels Miniplates Carrier bei 300 g für 1Min bei RT zentrifugieren. Anschließend wurde die Adhärenz der Zellen mikroskopisch geprüft. Pro Well waren 3-5 Zellen sichtbar. Um die Zelldichte zu erhöhen wurde vorsichtig 50  $\mu\text{l}$  Medium pro Well abpipettiert und erneut 50  $\mu\text{l}$  des Zellsuspension-Assaygemisch hinzugegeben. Die Platte wurde bei 300 g für 1Min bei RT zentrifugiert. Die mikroskopisch überprüfte Zelldichte war zu gering. Um die Zellen in den Urinproben mehr zu konzentrieren wurden im dritten Durchgang die Reste der Urinproben zuvor erneut bei 300 g für 5 min zentrifugiert, es wurde ca. 300- 400  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen. Anschließend wurde das

Zellsuspensions-Assaymediumgemisch entsprechend Rechnung 3) erstellt, auf die Wells aufgetragen und zentrifugiert.

Die weiteren Schritte erfolgten nach dem Standardprotokoll.

In Abb. 19 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Im Kurvenverlauf der Kontrolle zeigt sich nach Glucose-Injektion kein Anstieg der ECAR, die Messwerte vor Glucose-Injektion sind höher. Nach Oligomycin-Injektion steigt die ECAR auf das Maximum, der maximalen glykolytischen Aktivität der Zellen. Nach 2-DG-Injektion zeigt sich ein Abfall der ECAR.

Die rote Kurve zeigt leicht höhere Werte der ECAR nach Glucose- und Oligomycin-Injektion. Die maximale ECAR wird nach 2-DG-Injektion erreicht, obwohl die Glykolyse inhibiert werden sollte. Insgesamt verläuft die Patienten-Kurve flacher als die Kontroll-Kurve. Die Kontroll-Kurve liegt mit allen Messpunkten unterhalb der Patienten-Kurve.

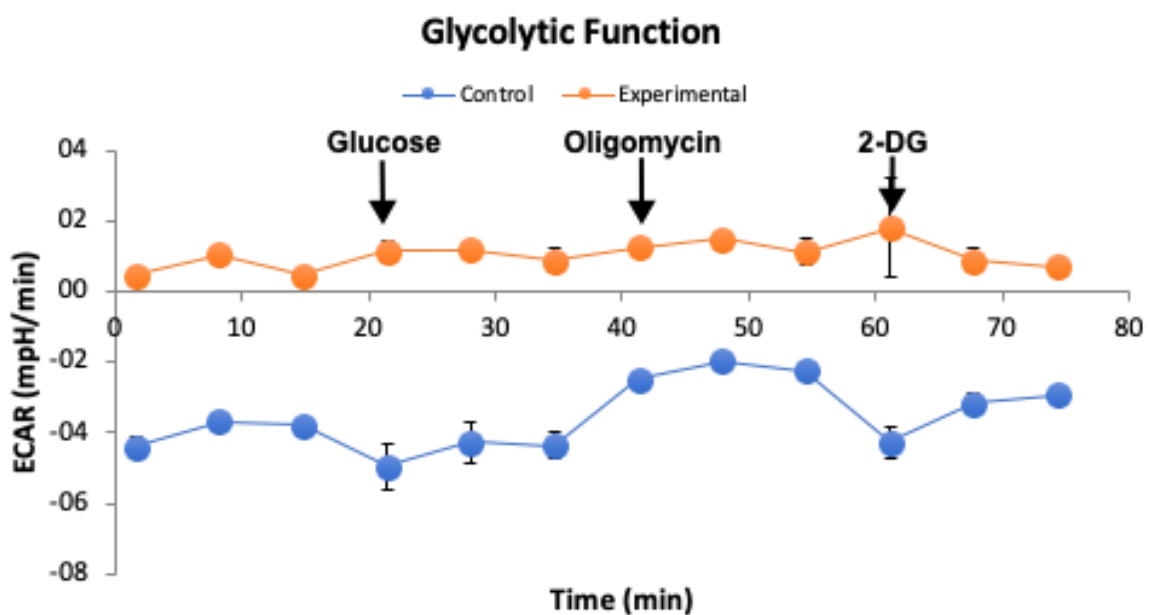


Abbildung 19: Glykolytische Funktion Patient 5 und Proband 3. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 1 ein Urinprobevolumen von 100 ml und als Kontrolle von Kontrolle 1 ein Urinprobevolumen von 200 ml verwendet. Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Alle drei



Wells der Kontrolle wiesen eine höhere Zelldichte im Vergleich zu den Wells der Patienten-  
Probe

Wie in Abb. 20 dargestellt ist im Kurvenverlauf der Kontrolle ist nach Glucose-Injektion ein Anstieg der ECAR messbar. Nach Oligomycin-Injektion sind die ECAR-Werte zunächst niedriger bis die ECAR am 9. Messpunkt das Maximum erreicht. Nach 2-DG-Injektion fällt die ECAR auf die Ausgangswerte, welche der nicht-glykolytischen Ansäuerung entsprechen.

Der Kurvenverlauf der Patienten-Kurve ist ähnlich. Insgesamt ist die glykolytische Funktion der Probe des Probanden höher.

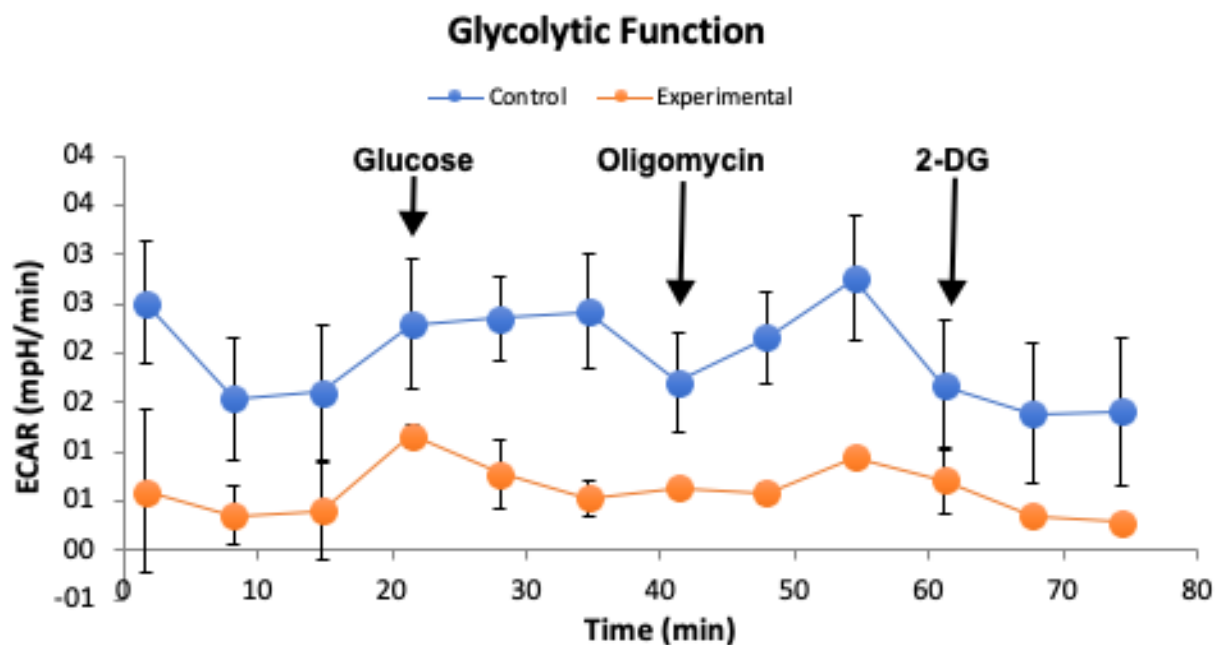


Abbildung 20: Glykolytische Funktion Patient 1 und Proband 1. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 6 und von Proband 1 ein Urinprobevolumen von 50 ml verwendet.

Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. In allen Wells konnte eine annähernd gleiche, hohe Zelldichte erreicht werden.

In Abb. 21 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt.

In beiden Kurven wird durch Glucose-Injektion kein relevanter Anstieg der ECAR erreicht. Nach Oligomycin-Injektion wird in der Probe des Patienten die maximale ECAR gemessen, die ECAR der Kontroll-Probe übersteigt die Werte der basalen glykolytischen Funktion nicht. Am ersten Messpunkt nach 2-DG-Injektion ist in beiden Kurven ein Abfall der ECAR messbar. Insgesamt verlaufen beide Kurven flach und zeigen damit eine geringe glykolytische Aktivität des Zellgemisches der Proben auf.

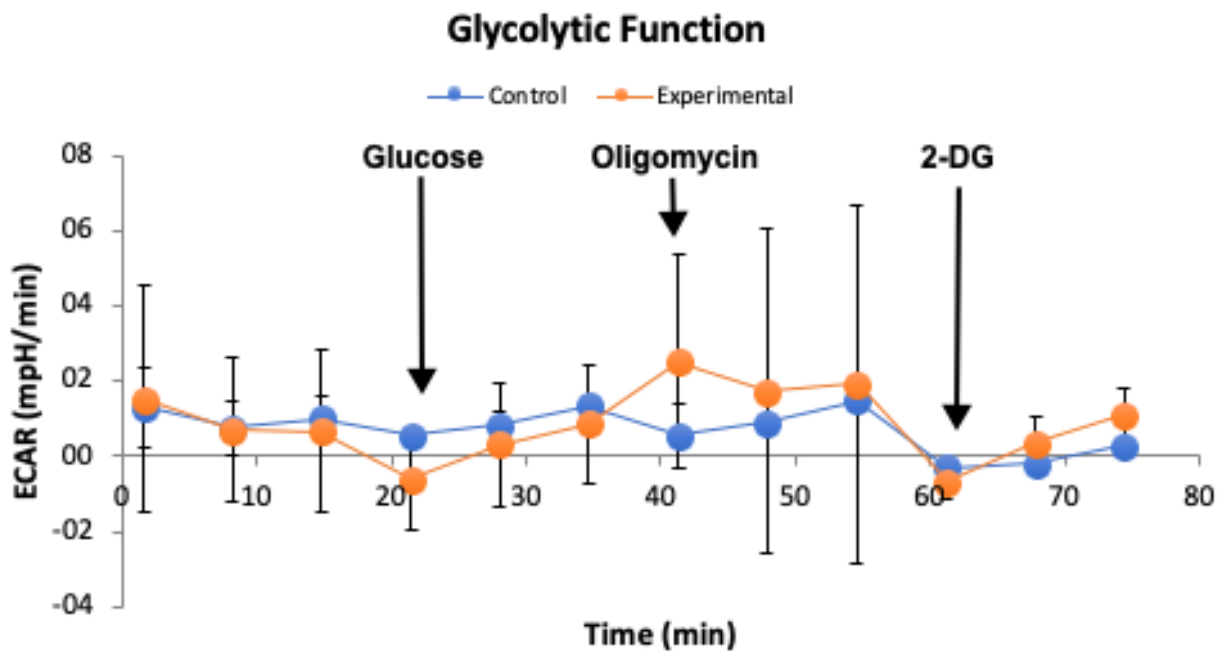


Abbildung 21: Glykolytische Funktion Patient 6 und Proband 1. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 7 und von Proband 4 ein Urinprobenvolumen von 150 ml verwendet.

Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Es gelang nicht die Zellkonzentrationen anzugleichen. In den drei Wells der Kontrolle war die Zellkonzentration höher.

In Abb. 22 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt.

Beide Kurvenverläufe entsprechen nicht dem erwarteten Kurvenverlauf des Glycolysis-Stress-Test. Die maximalen Werte der ECAR der Proben von Patient und Proband liegen am Anfang der Messung, vor Reagenz-Injektion. Weder durch Glucose- noch durch Oligomycin-Injektion

wurden höhere Werte erreicht. In dem Urinzellgemisch beider Proben scheinen zu wenig glykolytisch aktive Zellen vorhanden gewesen zu sein.

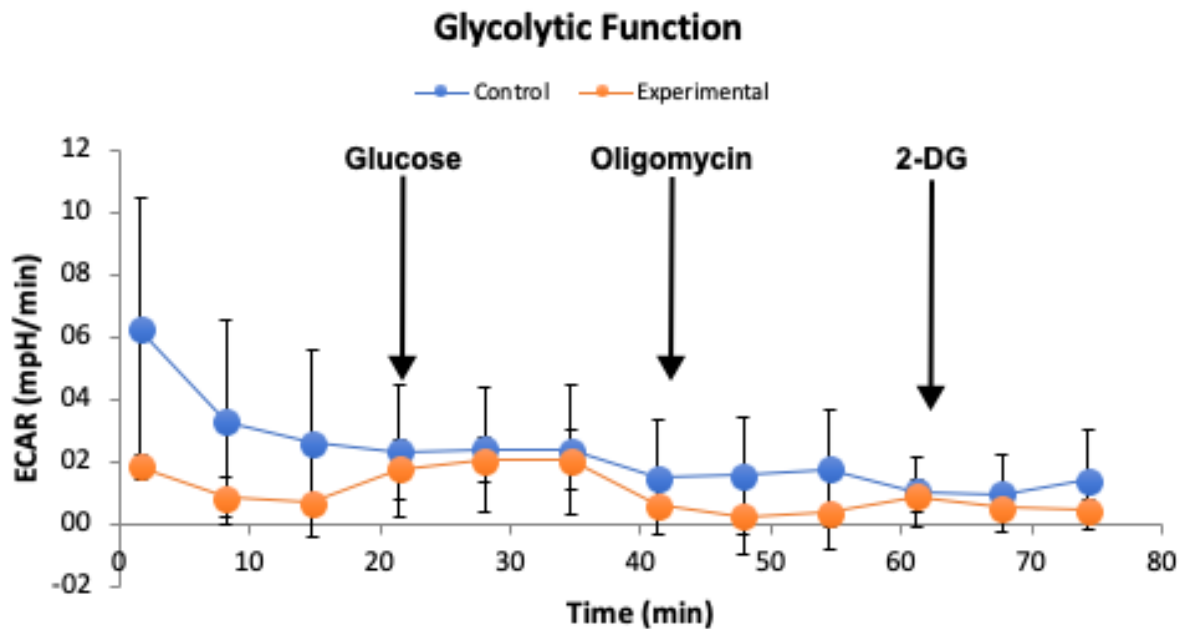


Abbildung 22: Glykolytische Funktion Patient 7 und Proband 4. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 5 und von Kontrolle 2 ein Urinprobevolumen von 150 ml verwendet.

Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Insgesamt war die Zellkonzentration in den sechs Wells gering

In Abb. 23 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt.

Im roten Kurvenverlauf sind die Messwerte der ECAR nach Glucose-Injektion höher, nach Oligomycin-Injektion steigen die Werte nicht. Die ECAR fällt nach 2-DG-Injektion. Die blaue Kurve verläuft bis 2-DG-Injektion auf der x-Achse mit einer ECAR von 0 mpH/min. Nach 2-DG-Injektion fällt die ECAR. Es scheinen keine glykolytisch Aktiven Zellen in der Probe vorhanden gewesen zu sein.

Insgesamt liegen die ECAR-Werte des Patienten unter denen der Kontrolle.

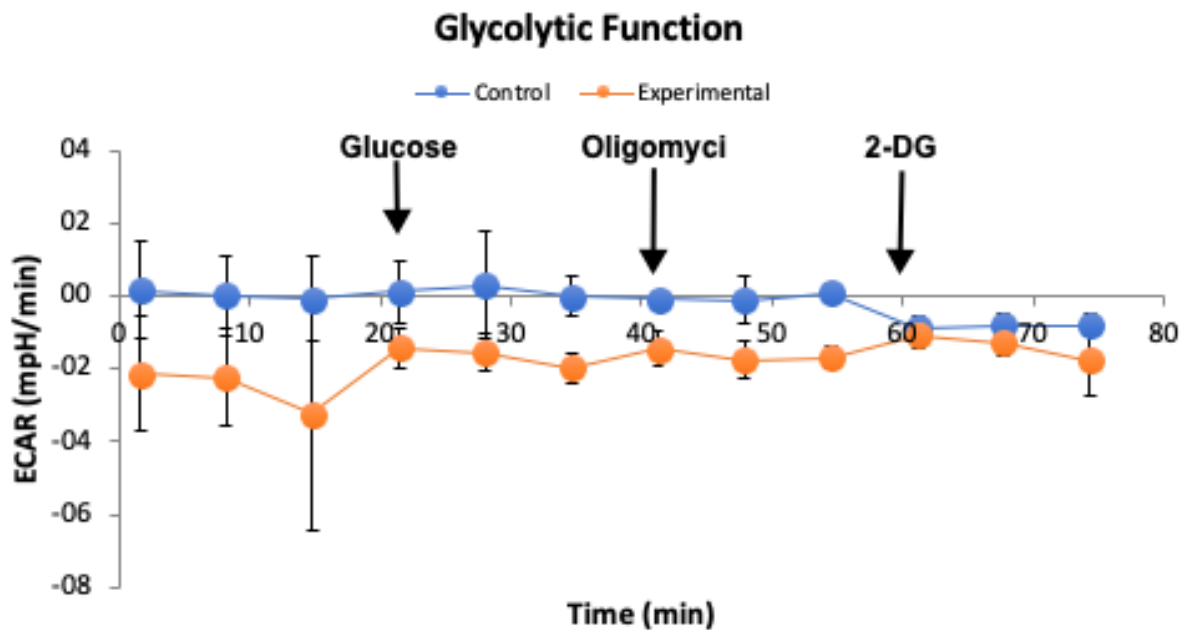


Abbildung 23: Glykolytische Funktion Patient 5 und Proband 2. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 8 ein Urinprobevolumen von 50 ml und von Proband 11 ein Urinprobevolumen von 100 ml verwendet.

Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Insgesamt war die Zellkonzentration in den sechs Wells hoch.

In Abb. 24 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Der Kurvenverlauf der Messungen der Patienten-Probe entspricht den Erwartungen. Nach Glucose-Injektion kommt es zum Anstieg der ECAR, nach Oligomycin-Injektion erreicht die Kurve am 8. Messpunkt ihr Maximum und nach 2-DG-Injektion fällt die ECAR. Im blauen Kurvenverlauf liegen die Messwerte der ECAR vor Glucose- und Oligomycin-Injektion höher, nach 2-DG-Injektion fällt die ECAR auf niedrigere Werte als die drei Ausgangswerte der Messung. Insgesamt liegen alle gemessenen ECAR-Werte der Patienten-Probe niedriger als die der Kontrolle.

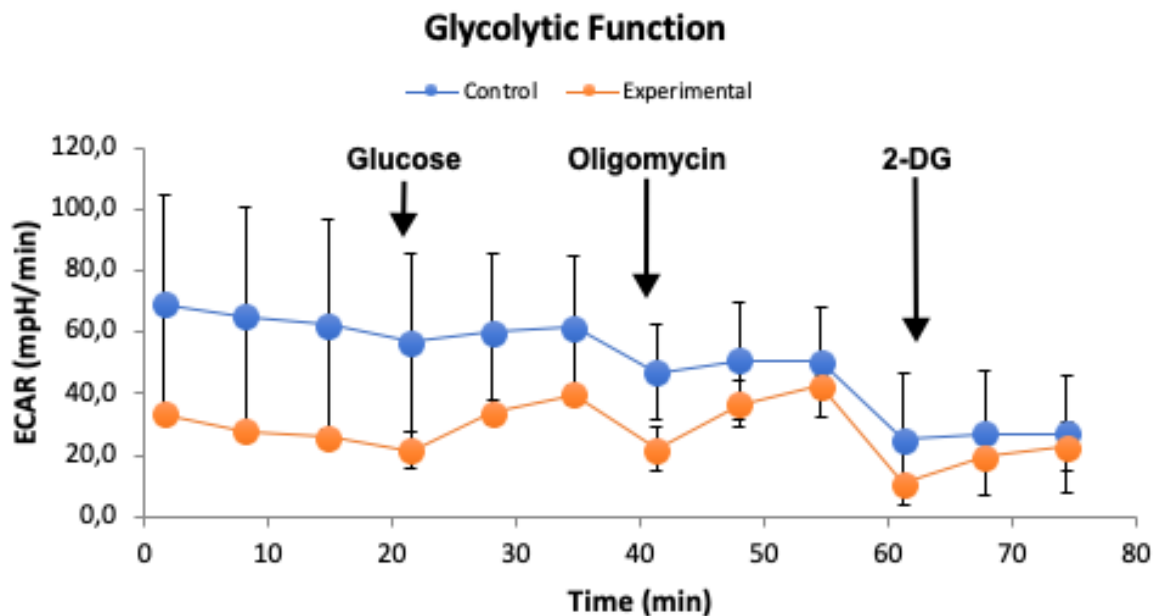


Abbildung 24: Glykolytische Funktion Patient 8 und Proband 11. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 6 und von Kontrolle 6 ein Urinprobenvolumen von 100 ml verwendet. Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Zellkonzentrationen konnten nicht ausreichend angeglichen werden. Zwei Wells der Pompe-Proben hatten eine sehr geringe Zelldichte, ein Well eine hohe Zelldichte. Zwei Wells der Kontroll-Proben hatten eine hohe Zelldichte, ein Well eine geringe Zelldichte. In Abb. 25 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. In der Patienten-Probe konnten nach Glucose-Injektion höhere ECAR-Werte gemessen werden, diese stiegen nicht nach Oligomycin-Injektion. Die ECAR fiel nach 2-DG-Injektion. Die ersten drei ECAR-Werte der Kontrolle sind höher als die der Patienten-Probe. Danach fallen die ECAR-Werte unter die der Patienten-Probe. Glucose- und Oligomycin-Injektion führten nicht wie erwartet zu einem Anstieg der ECAR.

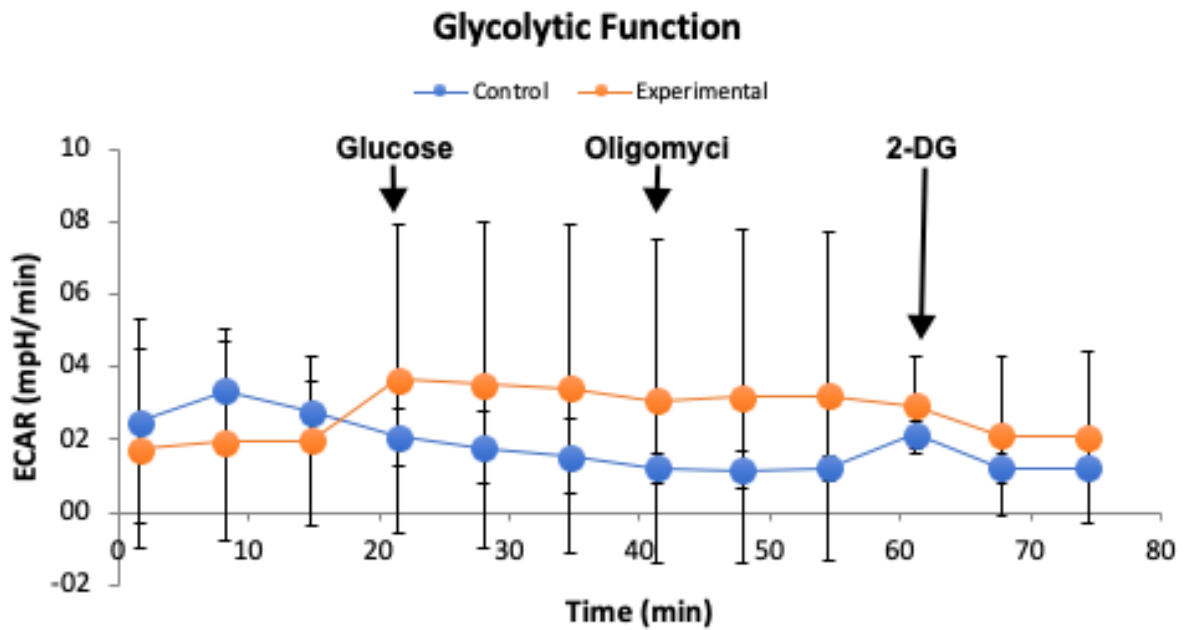


Abbildung 25: Glykolytische Funktion Patient 6 und Proband 6. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 9 ein Urinprobenvolumen von 50 ml und von Kontrolle 2 ein Urinprobenvolumen von 150 ml verwendet. Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Zellkonzentrationen war in allen sechs Wells ähnlich. In Abb. 26 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Beide Kurven starten auf einem ähnlichen Ausgangsniveau der ECAR. Nach Glucose-Injektion steigen zunächst beide Kurven steil an, fallen dann in den beiden folgenden Messzeitpunkten nach Glucose-Injektion und auch während der drei Messungen nach Oligomycin-Injektion. Nach 2-DG-Injektion fallen beide Kurven zunächst bevor die gemessene ECAR in den letzten beiden Messpunkten wieder steigt. Die glykolytische Funktion der Patienten-Zellen wäre nach Kurvenverlauf höher als die der Kontrolle. Beide Verläufe entsprechen jedoch nicht dem erwarteten Verlauf.

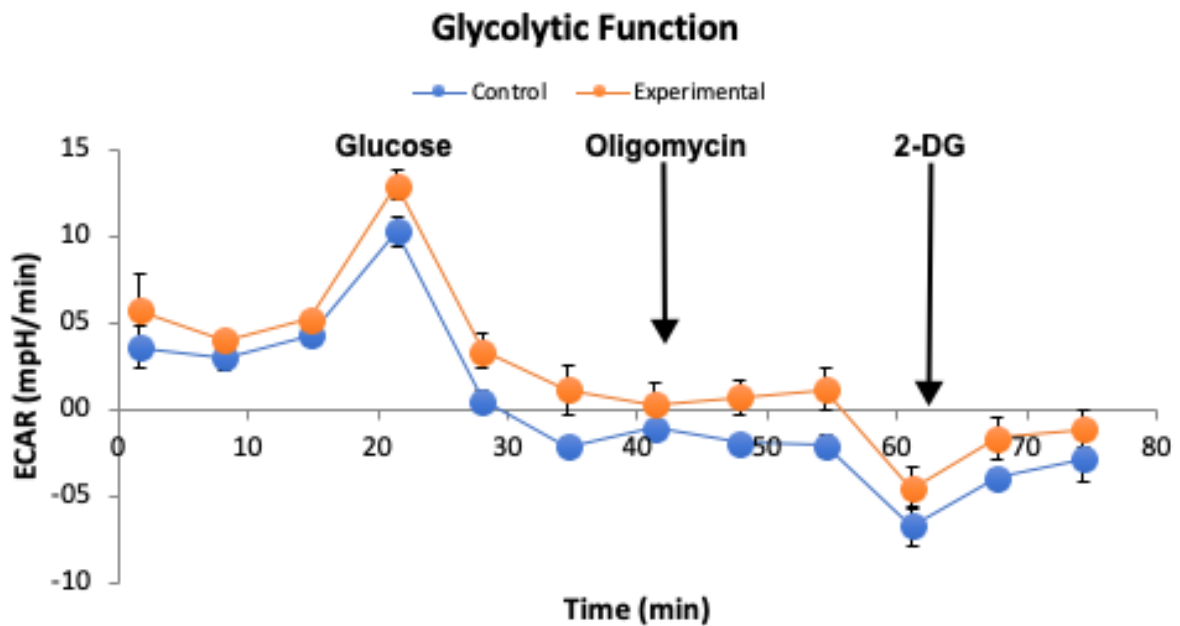


Abbildung 26: Glykolytische Funktion Patient 9 und Proband 2. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 10 ein Urinprobenvolumen von 100 ml und von Kontrolle 5 ein Urinprobenvolumen von 150 ml verwendet. Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Es konnten jedoch keine gleichen Zellkonzentrationen erreicht werden. Die Zellkonzentration in den drei Wells der Patienten-Probe waren hoch, die in den Wells der Kontrolle zeigten mikroskopisch eine mittlere Zelldichte. In Abb. 27 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Der Kurvenverlauf der Kontrolle ist flach und die gemessene ECAR bewegte sich während der gesamten Messung um 0 mpH/min. Es schienen nicht genügend glykolytisch aktive Zellen in der Probe vorhanden zu sein. Der Kurvenverlauf der Patienten-Probe entspricht dem erwarteten Kurvenverlauf mit einem Anstieg der ECAR nach Glucose-Injektion, dem Erreichen der maximalen glykolytischen Kapazität nach Oligomycin-Injektion und dem ECAR-Abfall auf Ausgangsniveau nach 2-DG-Injektion.

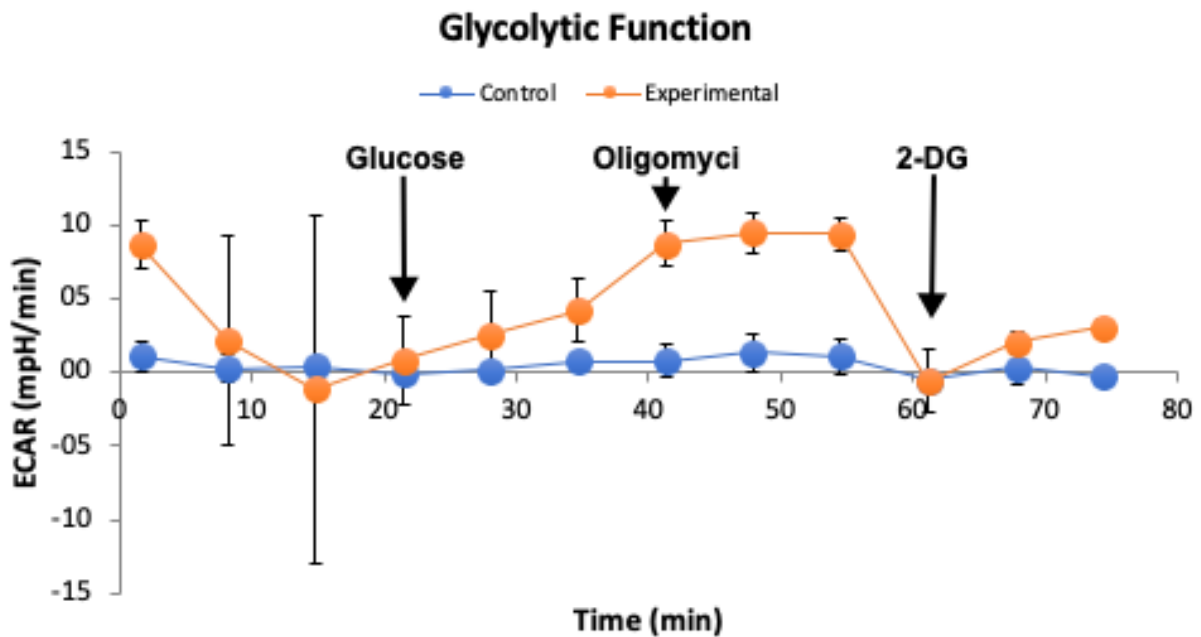


Abbildung 27: Glykolytische Funktion Patient 10 und Proband 5. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 1 und von Kontrolle 10 ein Urinprobevolumen von 100 µl verwendet. Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Es konnten jedoch keine gleichen Zellkonzentrationen erreicht werden. Die Zellkonzentration in den drei Wells der Patienten-Probe waren sehr gering, die in den Wells der Kontrolle hoch. In Abb. 28 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Die Kurve der Patienten-Probe verläuft flach und die gemessene ECAR bewegte sich während der gesamten Messung um 0 mpH/min. Es schienen nicht genügend glykolytisch aktive Zellen in der Probe vorhanden zu sein. Der Kurvenverlauf der Kontroll-Probe entspricht ebenfalls nicht dem erwarteten Verlauf. Die maximale ECAR wurde zu Beginn der Messung, von Glucose- und Oligomycin-Injektion gemessen. Im Verlauf fiel die ECAR.



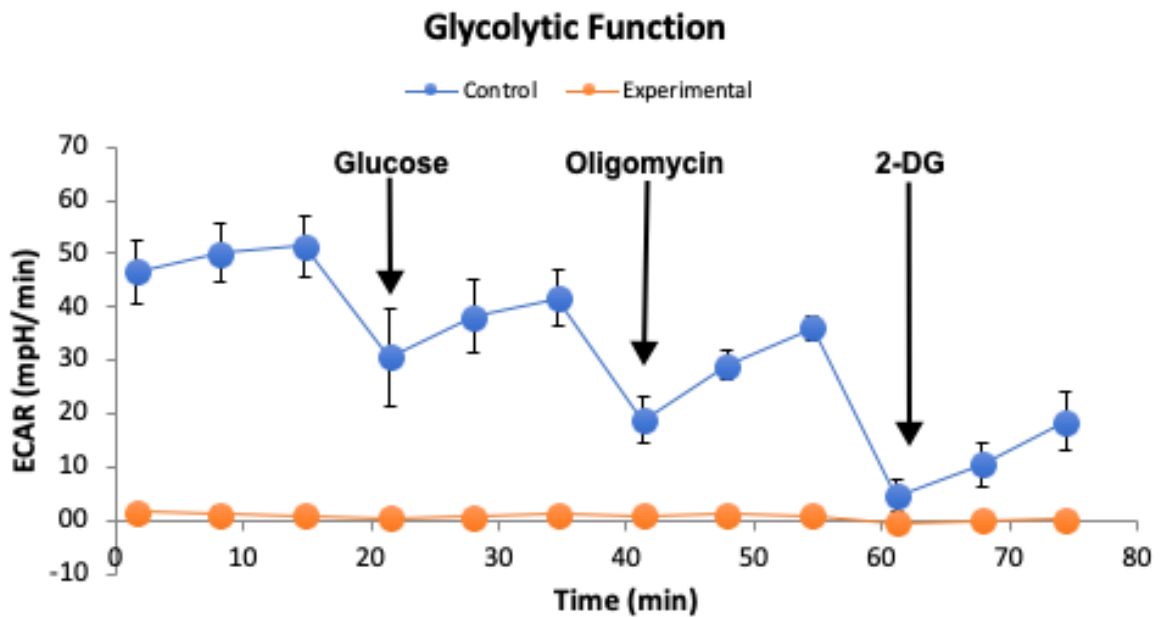


Abbildung 28: Glykolytische Funktion Patient 1 und Proband 10. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 4 ein Urinprobevolumen von 80 ml und von Kontrolle 12 ein Urinprobevolumen von 100 ml verwendet. Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. In allen sechs Wells war die Zellkonzentration sehr gering. In Abb. 29 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt.

Der Kurvenverlauf der Kontrolle ist flach und die gemessene ECAR bewegte sich während der gesamten Messung um 0 mpH/min. Es schienen nicht genügend glykolytisch aktive Zellen in der Probe vorhanden zu sein. Der Kurvenverlauf der Patienten-Probe entspricht nicht dem erwarteten Verlauf. Die zu Beginn gemessenen Werte liegen höher als die ECAR-Werte nach Glukose-Injektion und auf gleichem Niveau wie die ECAR-Werte nach Oligomycin-Injektion. Nach 2-DG-Injektion fielen die ECAR-Werte. Insgesamt liegt die glykolytische Funktion der Patienten-Probe unterhalb der Kontroll-Probe.

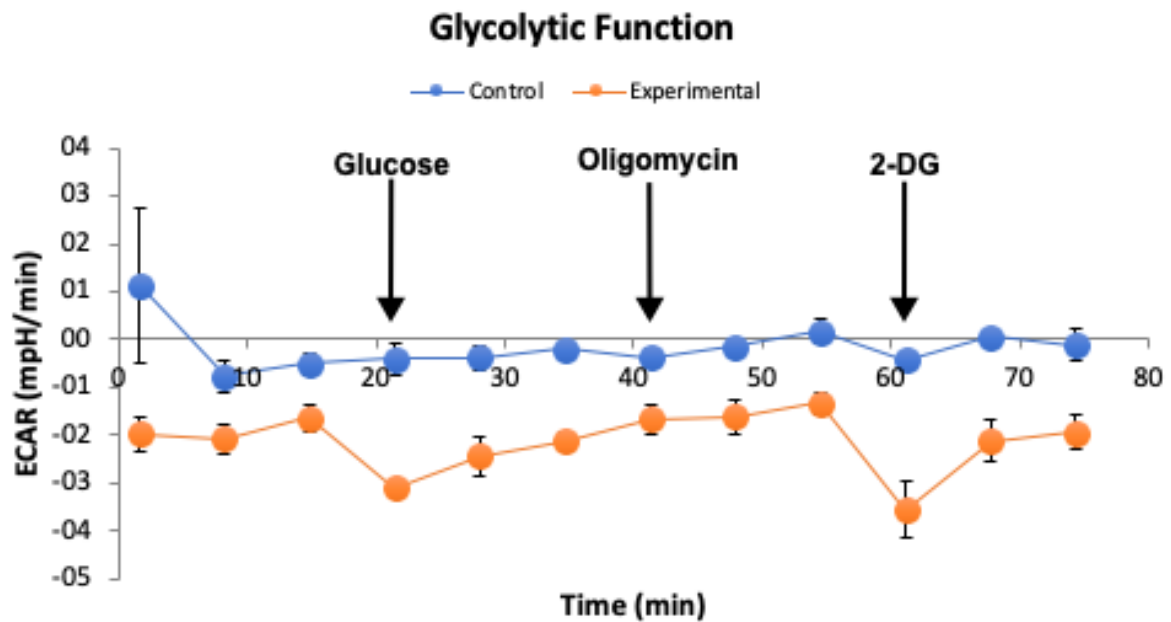


Abbildung 29: Glykolytische Funktion Patient 4 und Proband 12. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

Für die Seahorse-Messung wurde von Pompe-Patient 2 ein Urinprobevolumen von 100 ml und von Kontrolle 7 ein Urinprobevolumen von 80 ml verwendet.

Um die Zelldichte in den sechs Wells aneinander anzugleichen wurde wie oben beschrieben verfahren. Die mikroskopisch überprüfte Zelldichte war in allen sechs Wells sehr gering.

In Abb. 30 ist das Ergebnis der Messungen dargestellt. Der Kurvenverlauf der Kontrolle entspricht nicht dem erwarteten Kurvenverlauf. Die ECAR-Werte sind vor Reagenz-Injektion, nach Glucose- und Oligomycin-Injektion ungefähr auf gleichem Niveau. Nach 2-DG-Injektion fällt die ECAR. Der Kurvenverlauf der Patienten-Probe ist flach und die gemessene ECAR bewegte sich während der gesamten Messung um 0 mpH/min. Es schienen nicht genügend glykolytisch aktive Zellen in der Probe vorhanden zu sein.

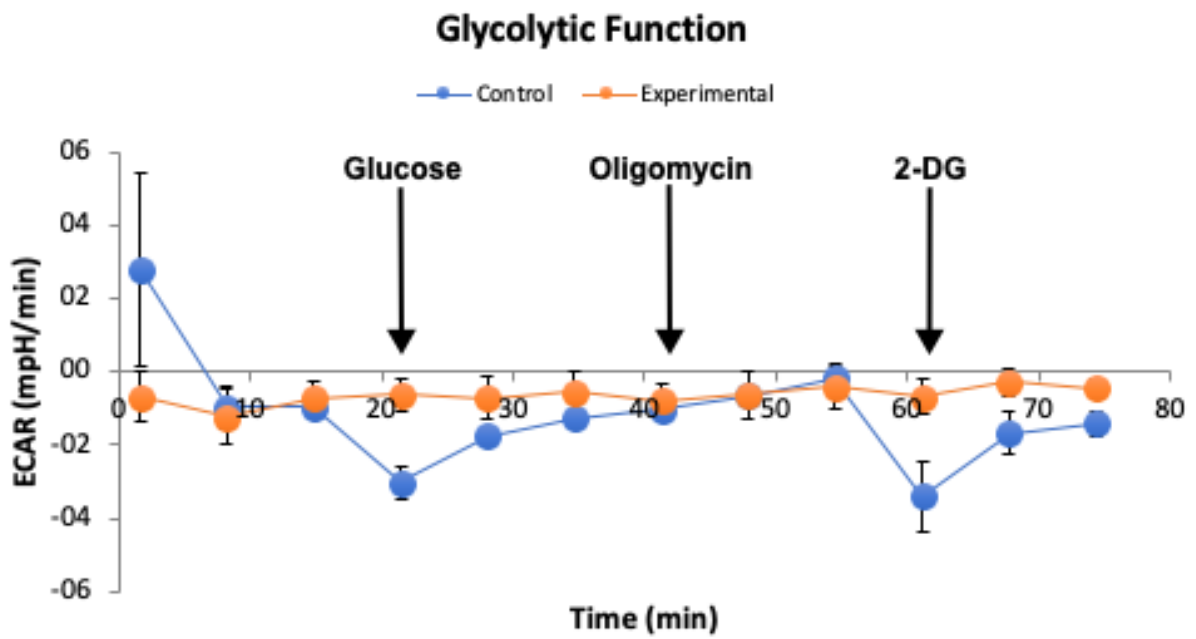


Abbildung 30: Glykolytische Funktion Patient 2 und Proband 7. Darstellung der gemessenen ECAR in Abhängigkeit zur zeitlichen Injektion von Glucose, Oligomycin und 2-DG.

## **15 Danksagung**

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Professor. Schoser für die Möglichkeit bei Ihm promovieren zu können, die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine stets sehr gute Betreuung und fachliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Sahra Limmer, Dr. Peter Meinke und Dr. Stefan Hintze für die hervorragende Betreuung im Laboralltag durch anregende wissenschaftliche Diskussionen, Weiterentwicklung von Ideen, Lösen von Problemen und die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten eingebettet in eine nährnde Erfahrung eines wunderbaren Teams.

Meinen Eltern, Stiefeltern, Großeltern, Geschwistern und Freunden möchte ich an dieser Stelle von Herzen dafür danken, mich auf meinem Lebensweg auf so wundervolle Weise unterstützt und bestärkt zu haben. An Eurer Seite konnte ich wachsen und mich entfalten, Ihr habt mich mit zu dem Menschen werden lassen, der ich heute bin.

## 16 Eidesstattliche Versicherung

Schulz, Anna Luisa

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „**Morbus Pompe – Messung der glykolytischen Aktivität an aus Urin gewonnenen Epithelzellen**“ 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.

Berlin, 10.01.2024

Anna Luisa Schulz

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin