Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Sektion Biochemie Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Braulke Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin Direktorin: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

Glutarazidurie Typ 1:

Untersuchungen zu Auswirkungen von "missense"-Mutationen auf Enzymexpression, Enzymsortierung, Enzymstabilität und den Abbau der Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase in der Zellkultur

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Benjamin Lohmöller

aus Neuenkirchen

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.05.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Chris Mühlhausen Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Jörg Heeren

Inhaltsverzeichnis

Einlei	tung	1
1.1 Glu	ıtarazidurie Typ 1	1
1.2 Glu	ıtaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH)	4
1.2.1	Pathogene Mutationen bei GA1-Patienten	5
1.3 Qu	alitätskontrolle mitochondrialer Proteine	6
1.3.1	Intramitochondriales Proteolytisches System	7
Frago	stollung	10
riage	stenung	
Mater	ial und Methoden	
3.1 Ma	terial	
3.1.1	Chemikalien	11
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
3.1.3	Arbeitsgeräte	14
3.1.4	Kits und Assays	
3.1.5	Enzyme	16
3.1.6	Plasmide, Bakterienstämme und Zelllinien	16
3.1.7	Medien und Zusätze	17
3.1.7	7.1 Medien für die Arbeit mit Bakterien	17
3.1.2	7.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur	17
3.1.8	siRNA	
3.1.9	Antikörper	
3.1.9	9.1 Primäre Antikörper	
3.1.9	9.2 Sekundäre und fluoreszenzmarkierte Antikörper	19
3.1.10	Toxine	19
3.1.11	Primer	19
3.1.12	TaqMan® Primer für die quantitative "Realtime"-PCR	21
3.1.13	Software	21
3.2 Mo	lekularbiologische Methoden	
3.2.1	Klonierung der GCDH-Mutanten	22
3.2.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	22
3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA	22
3.2.4	DNA-Sequenzierung	23
	Einlei 1.1 Glu 1.2 Glu 1.2.1 1.3 Qu 1.3.1 Frage Mater 3.1 Ma 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.1.2 3.2.2 3.2.3 3.2.4	Einleitung

	3.2.5	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelelektrophorese	. 23
	3.2.6	RNA-Isolierung	.23
	3.2.7	cDNA-Synthese	.24
	3.2.8	Quantitative "Realtime"-PCR	.24
3.3	Zel	lbiologische Methoden	.25
	3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	.25
	3.3.2	Trypsinieren von Zelllinien	. 25
	3.3.3	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	.26
	3.3.4	Transiente Transfektion von HeLa-Zellen	. 26
3	3.3.5	Transiente siRNA-Transfektion von HeLa-Zellen und Fibroblasten	.26
3	3.3.6	Latrunculin-Assay	. 27
3	3.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)	. 27
3	3.3.8	Metabolische Markierung von Proteinen mit [35S]-Methionin	. 28
	3.3.8	8.1 Metabolische Markierung von GCDH und GCDH-Mutanten in HeLa-Zellen	29
	3.3.8	8.2 Metabolische Markierung von GCDH und GCDH-Mutanten in Fibroblasten	29
3.4	Bio	chemische Methoden	. 30
3	3.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	. 30
3	3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	. 30
3	3.4.3	Western Blot-Analyse	.31
	3.4.4	Immunpräzipitation metabolisch markierter GCDH und GCDH-Mutanten	. 32
3	3.4.5	Fluorographie	. 34
4. E	Ergeb	nisse	35
4.1	Ana	alyse pathogener GCDH-Oberflächenmutationen	. 35
Z	4.1.1	Expressionsanalyse der GCDH-Oberflächenmutanten	. 36
Z	4.1.2	Analyse der Intrazellulären Lokalisation der GCDH-Oberflächenmutanten	. 38
Z	4.1.3	Untersuchung der speziellen mitochondrialen Morphologie der Mutante	
ŗ	p.Arg8	8Cys	.40
2	4.1.4	Stabilitätsstudien der GCDH-Mutanten	.43
4.2	l Ide	ntifizierung der am Abbau mutierter GCDH beteiligten Proteasen	.46
Z	4.2.1	Etablierung des CLPP und LONP1-"knockdowns" in Hela-Zellen und	
I	Fibrob	lasten	.46
Z	4.2.2	Effekt des CLPP- und LONP1-"knockdowns" auf die Expression von GCDH-	WT
ι	und -p	Arg402Trp	. 50
Z	4.2.3	Stabilität der GCDH in siRNA-Interferenzversuchen	. 52

5.	Di	iskussion	55
5	5.1	Analyse pathogener GCDH-Oberflächenmutanten	55
Į	5.2	Identifizierung der am Abbau mutierter GCDH beteiligten Proteasen	62
	5.	2.1 Herabregulation der Proteasen CLPP und LONP1 und die Auswirkung auf di	e
	G	CDH-Expression	63
6.	Zu	isammenfassung	67
7.	Su	ummary	59
8.	Li	teraturverzeichnis	71
9.	Ar	nhang	77
Ģ	9.1	Publikationen und Kongressbeiträge	77
Ģ	9.2	Lebenslauf	78
10	. I	Danksagung	79
11	. E	Eidesstattliche Versicherung	30

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
30HGA	3-Hydroxy-Glutarsäure
AAA ⁺ Proteasen	" <u>A</u> TPases <u>a</u> ssociated with various cellular <u>a</u> ctivities"
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CoA	Coenzym A
cDNA	"complementary DNA"
СТ	"cycle of threshold"
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DLST	Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
ECL	"enhanced chemiluminiscence"
E.coli	Escheria coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ETFB	Elektrontransfer-Flavoprotein-Beta-Untereinheit
FAD	Falvin-Adenin-Dinukleotid
FKS	Fötales Kälberserum
GA	Glutarsäure

GA1	Glutarazidurie Typ 1
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektometrie
GCDH	Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HeLa	Humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms (von Patientin Henrietta
	Lacks)
h	"hour"
HRP	Meerrettichperoxidase ("horseradish peroxidase")
HSP	Hitzeschockproteine
HWZ	Halbwertszeit
IC	"Inhibitor cocktail"
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
min	Minute
MnSOD	Mangansuperperoxiddismutase
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	"messenger RNA"
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NK	Negativkontrolle
nt	nicht transfiziert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ("phosphate-buffered saline")
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PFA	Paraformaldehyd
РРО	Diphenyloxazol
RNA	Ribonukleinsäure ("Ribonucleic acid")

rpm	"rounds per minute"
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecyl sulfate")
siRNA	"Small interfering RNA"
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TIM	"Translocase of the Inner Membrane"
ТОМ	"Translocase of the Outer Membrane"
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumenverhältnis
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
~	Ungefähr
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aminosäuren:

Für die Aminosäuren wurden in dieser Arbeit folgende Dreibuchstabencodes verwendet:

Alanin	Ala
Arginin	Arg
Asparagin	Asn
Asparaginsäure	Asp
Cystein	Cys
Glutamin	Gln

Glutaminsäure	Glu
Glycin	Gly
Histidin	His
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Lysin	Lys
Methionin	Met
Phenylalanin	Phe
Prolin	Pro
Serin	Ser
Threonin	Thr
Tryptophan	Trp
Tyrosin	Tyr
Valin	Val

Die in dieser Arbeit angegebene Nummerierung der Aminosäuren der GCDH bezieht sich immer auf das Vorläuferprotein und nicht auf die reife Form.

1. Einleitung

1.1 Glutarazidurie Typ 1

Die Glutarazidurie Typ 1 (GA1, OMIM 231670) ist eine autosomal rezessiv vererbte, neurodegenerative Stoffwechselerkrankung, die auf einen Defekt des mitochondrialen Matrixenzyms Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH, EC 1.3.8.6) zurückzuführen ist. Die GCDH ist am Abbau der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan beteiligt (1.2.). Bei einer Defizienz des Enzyms findet der Abbau der Aminosäuren nur noch insuffizient statt und es kommt zur Akkumulation der pathologischen Stoffwechselprodukte Glutarylcarnitin, Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxy-Glutarsäure (30HGA) in sämtlichen Körperflüssigkeiten und Geweben.

Die GA1 wurde erstmals 1975 von Goodman (Goodman et al. 1975) beschrieben. Sie gehört mit einer Inzidenz von 1:100.000 (Lindner et al. 2004) zu den seltenen Stoffwechselerkrankungen, die jedoch in konsanguinen Populationen wie z.B. der "Old Order Amish Community" (Pennsylvania, USA) mit einer Inzidenz um 1:300 deutlich gehäuft auftritt (Morton et al. 1991). Bis auf einen häufig geschilderten Makrocephalus zeigen die erkrankten Kinder zumeist bei der Geburt keine klinischen Auffälligkeiten (Bjugstad et al. 2000, Kölker et al. 2006). Nach der Geburt durchgeführte Magnetresonanztomographie-Untersuchungen zeigen regelmäßig eine fronto-temporale Hypoplasie mit einer Vergrößerung der Fissura sylvii (sylvische Furche) (Harting et al. 2009, Nunes et al. 2013, Wen et al. 2012). Die Kombination dieser Phänomene bezeichnen manche Autoren daher auch als "mikroenzephalen Makrozephalus" (Strauss et al. 2003, Twomey et al. 2003). Im Rahmen kataboler Situationen, wie nach fieberhaften Infektionen, Operationen oder auch nach Routineimpfungen, kann es bei betroffenen Patienten zu einer enzephalopathischen Krise kommen (Hoffmann et al. 1991). Während einer solchen Krise kommt es zu einer weiteren Anhäufung der toxischen Metabolite GA und 30HGA und meist innerhalb weniger Stunden zu einem rapiden, irreversiblen Untergang von Neuronen im Striatum. Das Striatum, der sog. Streifenkörper, ist ein Kerngebiet im zentralen Nervensystem (ZNS), das die zentrale Schaltstelle der Basalganglienschleife repräsentiert. Im Sinne einer Rückkopplung integriert es motorische und sensorische Informationen aus dem Cortex und subkortikalen Kerngebieten über den Thalamus und sendet diese zu den motorischen Cortexarealen zurück. Dieser Prozess ist wesentlicher Bestandteil in der Verarbeitung von komplexen Bewegungsmustern über das extrapyramidal-motorische System. So kommt es als Folge der bilateralen zentralen Striatum-Nekrose zu einer dystondyskinetischen Bewegungsstörung mit unterschiedlicher klinischer Ausprägung (Superti-Furga et al. 1997). Sie variiert von rumpfbetonter Muskelhypotonie bis zu diffusen Dyskinesien der Extremitäten sowie der Motorik im Gesichtsbereich mit einhergehenden Schluck- und Sprachstörungen, und kann bis zum kompletten Verlust der Willkürmotorik führen (Gitiaux et al. 2008, Strauss et al. 2003). Die kognitiven Fähigkeiten scheinen hingegen wenig beeinträchtigt zu sein (Hedlund et al. 2006, Jamiolkowski et al. 2016, Kölker et al. 2015).



Glutarazidurie Typ 1 Patient nach enzephalopathischer Krise

(A) 11 Monate altes Kind nach einer abgelaufenen enzephalopathischen Krise mit schwerer Verlaufsform. Das Kind zeigte den vollständigen Verlust der Willkürmotorik mit dystoner Fehlhaltung aller Extremitäten und zusätzlich ausgeprägten Störungen der Motorik im Gesichtsbereich und der Zunge.
(B) Dazugehöriges mangetresonanztomographisches Bild (T2-Wichtung) mit den typischen bildmorphologischen Veränderungen wie symmetrischen Hyperdensitäten im Bereich des Striatums, die einem zytotoxischen Ödem entsprechen (weiße Pfeile).

Der Zeitpunkt und der Schweregrad der neurologischen Defizite sind entscheidende prognostische Faktoren hinsichtlich der Mortalität der Patienten (Bjugstad et al. 2000,

Kölker et al. 2006, Kyllerman et al. 2004). Das höchste Risiko für derartige enzephalopathische Krisen besteht zwischen der Geburt und dem 36. Lebensmonat der betroffenen Kinder (Kölker et al. 2006). Da hervorgerufene neurologische Symptome irreversibel sind, ist eine frühzeitige Diagnosestellung von immenser Bedeutung. Nach einer Pilotphase wurde 2005 das "erweiterte Neugeborenenscreening" in Deutschland implementiert. Mittels Tandem-Massenspektometrie (MS/MS) wird die Konzentration von Glutarylcarnitin im Trockenblut des Neugeborenen gemessen (Chace et al. 2003). Eine Erhöhung deutet auf das Vorliegen einer GA1 hin, was über weiterführende Diagnostik bestätigt werden muss. Als erster Schritt werden die für GA1 spezifischen 3OHGA und GA im Blut und Urin über Gaschromatographie und anschließender massenspektometrischer Analyse (GC/MS) quantitativ bestimmt (Baric et al. 1999, Schor et al. 2002). Weitere diagnostische Verfahren zur Konfirmation der Diagnose beinhalten die Analyse des GCDH-Gens auf vorhandene Mutationen und GCDH-Enzymaktivitätsmessungen in Leukozyten oder Fibroblasten. diese Durch Untersuchungsmethoden ist es möglich, GA1-Patienten vor Ausbruch von Symptomen zu erkennen. Therapeutisch wird eine Lysin- und Tryptophan-arme Diät sowie eine Supplementation mit Carnitin durchgeführt, um die Entstehung der toxischen Metabolite möglichst gering zu halten und deren Ausscheidung durch eine Kopplung an Carnitin (Glutarylcarnitin) über den Urin zu unterstützen (Kölker et al. 2011, Mühlhausen et al. 2004, Viau et al. 2012). Von besonderer Wichtigkeit ist die sofortige Initiierung einer anabolisierenden Notfalltherapie im Falle einer potenziell gefährlichen katabolen Stoffwechselsituation. Dieses Behandlungsschema führt zu einer drastischen Reduktion neurologischer Komplikationen (Couce et al. 2013, Heringer et al. 2010, Jones et al. 2002, Kamate et al. 2012).

Entgegen dieser vielversprechenden Ergebnisse kommt es trotz früher Therapie bei $\sim 20-30\%$ der betroffenen Patienten weiterhin zum Auftreten einer enzephalopathischen Krise (Heringer et al. 2010, Kölker et al. 2006, Lee et al. 2013, Strauss et al. 2003). Die GA1 zeigt extrem variierende, sehr milde bis äußerst schwere klinische Verläufe, die keine direkte Korrelation zu dem vorliegenden *GCDH*-Genotyp aufweisen. Dies belegen Beobachtungen in Populationen mit einer spezifisch prädominierenden Mutation wie der bereits angesprochenen "Old Order Amish Community" oder auch unter betroffenen Geschwisterpaaren mit identischen Mutationen, die unterschiedliche

Krankheitsverläufe aufweisen (Amir et al. 1987, Anikster et al. 1996, Biery et al. 1996, Wang et al. 2013). Prognostisch wegweisender für den Schweregrad des klinischen Phänotypes ist das bereits erwähnte Auftreten einer enzephalopathischen Krise, das von diversen Faktoren, wie z.B. metabolischem Stress abhängig ist (Busquets et al. 2000), und vor allem das frühzeitige Erkennen der GA1 (Neugeborenenscreening) sowie die Einleitung einer präsymptomatischen Therapie (Heringer et al. 2010).

1.2 Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH)

GCDH ist ein mitochondriales, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängiges Matrixenzym, das die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-Coenzym A (CoA) über Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO₂ im Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan katalysiert (Gomes et al. 1981, Rao et al. 2006). Crotonyl-CoA wird über weitere enzymatische Schritte zu Acetyl-CoA abgebaut, das dann zur Energiegewinnung in den Citratzyklus einfließt, um Reaktionsäquivalente der Atmungskette zur ATP-Produktion zur Verfügung zu stellen.





Die GCDH spielt eine wesentliche Rolle im Abbauweg der Aminosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan. Sie katalysiert die oxidative, FAD-abhängige Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA. Ist aufgrund mutierter GCDH dieser Abbauweg defekt entstehen pathologische Stoffwechselprodukte. Glutarsäure und Glutarylcarnithin werden durch CoA-Abspaltung bzw. Veresterung mit Carnithin aus Glutaryl-CoA gebildet. Aus Glutaconyl-CoA bilden sich über noch nicht geklärte Stoffwechselwege 3-Hydroxy-Glutarsäure und Glutconsäure.

5

Das sieben Kilobasen umfassende humane GCDH-kodierende Gen ist auf dem Chromosom 19p13.2 lokalisiert und enthält 11 Exone (Biery et al. 1996, Greenberg et al. 1994). Als kernkodiertes Protein wird GCDH im Zytosol an freien Ribosomen in seiner 48 kDa Vorläuferform synthetisiert. Die ersten 44 N-terminalen Aminosäuren des aus 438 Aminosäuren bestehenden Proteins bilden die mitochondriale Signalsequenz. Über dieses Lokalisierungssignal kann GCDH mit den Proteinen des TIM/TOM-Komplexes der inneren und äußeren Mitochondrienmembran interagieren und in die mitochondriale Matrix transloziert werden, wo das Präpeptid durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten und GCDH in ihre reife Form prozessiert wird (Bolender et al. 2008, Goodman et al. 1995). Innerhalb der mitochondrialen Matrix ist GCDH als Homotetramer katalytisch aktiv (Lenich et al. 1986). In neuesten Studien konnte gezeigt werden, dass reife GCDH mit diversen anderen Proteinen im Mitochondrium interagiert. Zwei mitochondriale Interaktionspartner, die Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase (DLST) und die Elektrontransfer-Flavoprotein-Beta-Untereinheit (ETFB), wurden von Schmiesing et al. identifiziert (Schmiesing et al. 2014). Beide Proteine sind indirekt in den Glutaryl-CoA-Metabolismus involviert. DLST katalysiert die der GCDH vorausgehende Reaktion, und ETFB stellt als Elektronenakzeptor das Bindeglied zur Atmungskette dar. Diese Protein-Protein-Interaktionen legen eine Rolle der GCDH in einem Multi-Enzym-Komplex nahe, der innerhalb der mitochondrialen Matrix agiert (Schmiesing et al. 2014).

1.2.1 Pathogene Mutationen bei GA1-Patienten

Im *GCDH*-Gen sind derzeit mehr als 150 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen bekannt (Goodman et al. 1998, Mushimoto et al. 2011, Zschocke et al. 2000). Es handelt sich vornehmlich um "missense"- und "nonsense"-Mutationen (Hedlund et al. 2006). Zudem sind Mutationen mit Deletionen mehrerer Basenpaare sowie genetische Veränderungen im Intronbereich beschrieben worden (Bross et al. 2012, Greenberg et al. 1995). Die häufigste Mutation in der europäischen Bevölkerung ist die p.Arg402Trp mit einer Frequenz zwischen 20-30% aller GA1-assoziierten Allele (Busquets et al. 2000, Zschocke et al. 2000). Ähnlich dem Großteil aller identifizierten *GCDH*-Mutationen weist die homozygote p.Arg402Trp-Mutante keine enzymatische Restaktivität in Fibroblasten auf (Schwartz et al. 1998). Der Verlust der enzymatischen

Aktivität wird bei den bekannten GCDH-Mutanten durch folgende Mechanismen "missenense"-Mutationen führen analog anderen Acyl-CoA erklärt: a) zu Dehydrogenasen zu einer Fehlfaltung und damit zum verstärkten Abbau des mutanten Enzyms (Maier et al. 2009); b) Mutationen, die in der Nähe zum katalytischen Zentrum lokalisiert sind, behindern die enzymatische Reaktion; c) einzelne Mutationen betreffen Aminosäuren, die an der Homotetramerisierung beteiligt sind (Busquets et al. 2000, Keyser et al. 2008, Rao et al. 2007). Es sind aber auch Mutationen mit Restaktivitäten zwischen 10 und 30% in Patienten- gegenüber Kontrollfibroblasten gesunder Probanden gefunden worden (Christensen et al. 1997). Ein Beispiel für eine Mutation mit hoher Enzym-Restaktivität stellt die von Mühlhausen et al. identifizierte homozygote Mutation p.Met263Val dar, die trotz 30% GCDH-Restaktivität zu einem schweren klinischen Phänotyp führt (Mühlhausen et al. 2003). Die Ursachen für den schweren klinischen Verlauf bei derartig hoher enzymatischer Restaktivität sind unbekannt. Als mögliche Hypothese käme vor allem bei Mutationen, die an der Proteinoberfläche lokalisiert sind (wie im Fall p.Met263Val), gestörte Protein-Protein-Interaktionen oder Konformationsänderungen der GCDH (Fehlfaltung) in Frage, die zu einer gesteigerten Protein-Instabilität und somit zu einem erhöhten Abbau des Enzyms führen, oder durch eine gestörte Interaktion innerhalb heteromerer Proteinkomplexe zu einer verminderten Aktivität eines solchen Multienzymkomplexes führen. Für ein weiterführendes Verständnis der kompletten Pathogenese der bekannten GA1-Mutationen wäre daher die Analyse der enzymatischen Aktivität, der Proteinwechselwirkungen und des

1.3 Qualitätskontrolle mitochondrialer Proteine

intramitochondrialen Abbaus von Interesse.

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene intrazelluläre Organellen, die eine Vielzahl von wichtigen Funktionen im Stoffwechsel der Zelle einnehmen. Hauptaufgabe sind die Versorgung der Zelle mit Energie in Form von ATP, die mitochondriale Beta-Oxidation und der Abbau einiger Aminosäuren (DiMauro et al. 2003, Guda et al. 2007, Houten et al. 2016).

Diverse exogene Reize, z.B. chemisch-toxischer Art sowie endogene Stimuli wie Proteinfehlfaltung, DNA-Schäden oder Genmutationen können mitochondrialen Stress induzieren (Youle et al. 2012). Da die Zellintegrität unabdingbar mit der Unversehrtheit mitochondrialer Funktionen und Struktur assoziiert ist, muss die Zelle adäguat derartigen Störungen entgegenwirken. Hierfür besitzt das Mitochondrium ein Qualitätskontroll-System, das in unterschiedlichen Stufen auf verschieden schwere Störungen reagieren kann. Die erste Stufe besteht auf molekularer Ebene aus dem intramitochondrialen proteolytischen System. Innerhalb der Matrix und des Intermembranraumes agieren Chaperone und ATP-abhängige Proteasen (1.3.1), um fehlgefaltete Proteine zu stabilisieren, geschädigte Proteine zu degradieren oder entstandene Proteinaggregate aufzulösen (Baker et al. 2011). Kann der Schaden von den Chaperonen und Proteasen nicht mehr beseitigt werden, ist das Mitochondrium in der Lage über dynamische Prozesse mit anderen Mitochondrien zu verschmelzen ("Fusion") oder auch entgegengesetzt einzelne Teile abzuschnüren ("Fission"). Durch die Fusion verschiedener Mitochondrien können geschädigte DNA, Lipide, Proteinoder Membrankomponenten ausgetauscht und auf diese Weise funktionelle Beeinträchtigungen abgepuffert werden (Youle et al. 2012). Um jedoch zu verhindern, dass zu stark geschädigte Mitochondrien das ganze Netzwerk schwächen, können diese betroffenen Abschnitte von noch intakten Teilen abgetrennt und intrazellulär degradiert werden ("Mitophagie"). Dieser Verlauf ist entscheidend für das Schicksal der Zelle, da die Einleitung der Mitophagie verhindert, dass das nicht mehr intakte Mitochondrium proapoptotische Faktoren freisetzen kann (Maiuri et al. 2007). Ist nun das mitochondriale Netzwerk derartig schwer beschädigt, dass auch dieser Mechanismus nicht mehr ausreicht, um die mitochondriale Funktion und so die Physiologie der Zelle aufrecht zu erhalten, kommt es zum Loslösen proapoptotischer Proteine wie Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums und zum Einleiten der Apoptose, des programmierten Zelltods (Bernardi et al. 1999, Tatsuta et al. 2008).

1.3.1 Intramitochondriales Proteolytisches System

Wie unter 1.3 beschrieben, gehören die Chaperone zur ersten "Verteidigungslinie" des Mitochondriums. Diese sogenannten Hitzeschockproteine (Hsp), vornehmlich Hsp70, sorgen für die korrekte Faltung von Proteinen nach der Synthese im Mitochondrium bzw. nach dem Import ins Mitochondrium (Herrmann et al. 1994, Voos et al. 2002). Zudem verhindern die Chaperone die Aggregation fehlgefalteter Proteine, indem sie diese stabilisieren und erneut in ihrer Faltung unterstützen, oder für die Proteolyse

zugänglich machen (Wagner et al. 1994). Da das Mitochondrium aus verschiedenen Subkompartimenten besteht, muss es für jeden Teil spezifische Akteure geben, die sich um den Abbau von beschädigten oder fehlgefalteten Proteinen kümmern. Proteine der äußeren Membran, die für den Abbau bestimmt sind, werden ubiquitinyliert und über das zytosolische 26S-Proteasom abgebaut (Neutzner et al. 2007). Ebenso werden fehlerhafte Präproteine vor dem Import ins Mitochondrium über dieses System eliminiert (Habelhah et al. 2004, Tatsuta et al. 2008). In der inneren Mitochondrienmembran sind zwei unterschiedliche ATP-abhängige AAA⁺ Proteasen (,<u>A</u>TPases <u>a</u>ssociated with various cellular <u>a</u>ctivities^{cc}) lokalisiert. Die <u>i</u>-AAA Protease hat ihre aktive Domäne zum <u>I</u>ntermembranraum gerichtet, die <u>m</u>-AAA Protease hingegen zur <u>M</u>atrix. Lösliche Proteine des Intermembranraumes sowie Proteine der Atmungskette, die in der inneren Membran lokalisiert sind, stellen potenzielle Ziele der i-AAA Protease dar. Die m-AAA Protease hat als Hauptsubstrate Proteine der Atmungskette (Goard et al. 2014, Koppen et al. 2007).

Für die Proteinqualitätskontrolle innerhalb der Matrix sind vor allem die Proteasen LONP1 und die ClpXP zuständig, die evolutionär hochkonservierte Serinproteasen der AAA⁺ Superfamilie sind. Irreversibel geschädigte Proteine, die durch Chaperone nicht mehr in ihre native Form gefaltet werden können, werden von diesen beseitigt, bevor sie in der Matrix aggregieren. Charakteristisch für LONP1 und ClpXP ist die oligomere Ringstruktur der Proteine mit dem katalytisch aktiven Zentrum im Inneren, so dass native Proteine in der Regel nicht durch den schmalen Zugang in die Kammer gelangen und unabsichtlich degradiert werden können (Lupas et al. 1997, Ogura et al. 2001). Fehlgefaltete Proteine werden jedoch von Chaperon-ähnlichen Untereinheiten der Proteasen erkannt und unter ATP-Verbrauch im entfalteten Zustand ins proteolytische Zentrum befördert (Pickart et al. 2004). Es gibt kein Signal wie im Ubiquitin-26S-Proteasom System, das abzubauende Substrate markiert. Jedoch scheinen z.B. oxidative Schäden, die zur Veränderung der Tertiärstruktur führen, Erkennungsmerkmale für die Proteasen offenzulegen (Bayot et al. 2010). Oxidativ geschädigte Aconitase 2 wurde beispielweise als ein Substrat der humanen LONP1 identifiziert (Bota et al. 2002). Neben diesen Aufgaben in der Proteinquälitätskontrolle und Modulierung der respiratorischen Kapazität (Fukuda et al. 2007) erfüllt LONP1 noch eine regulierende Funktion in der mitochondrialen DNA-Homöostase, indem es direkt mit DNA und DNA-bindenden Proteinen assoziiert und die Expression von Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Lu et al. 2013, Lu et al. 2007).



Abb. 1.3 Schematische Darstellung der humanen mitochondrialen matrix AAA⁺ Proteasen Die m-AAA Protease, LONP1 und ClpXP repräsentieren die drei hauptverantwortlichen Proteasen für die Proteinqualitätskontrolle innerhalb der mitochondrialen Matrix und der inneren mitochondrialen Membran. Die m-AAA-Protease ("matrix <u>A</u>TPases <u>a</u>ssociated with various cellular <u>a</u>ctivities") ist an die innere Membran gebunden und exponiert ihre aktive Domäne Richtung Matrix. Im Menschen kommt sie sowohl in homo-, als auch in heterooligomerer Form vor. LONP1 liegt in der Matrix zum Einen in freier Form als oligomere Ringstruktur, zum Anderen assoziiert mit weiteren DNA-bindenden Proteinen gebunden an die mitochondriale DNA vor. ClpXP setzt sich aus den zwei Untereinheiten CLPP (proteolytische Untereinheit) und CLPX (AAA⁺ ATPase Domäne) zusammen (Goard et al. 2014).

Im Gegensatz zur LONP1 ist die ClpXP nur wenig charakterisiert. Sie ist ein Komplex aus zwei unterschiedlichen Proteinen: der proteolytischen Untereinheit CLPP und dem Chaperon CLPX, das Mitglied der AAA⁺ Familie ist und eine ATPase Domäne besitzt. Spezifische Bindungsmotive und endogene Substrate sind bis jetzt noch unbekannt. Jedoch legen Untersuchungen homologer Formen in Modellorganismen, wie z.B *E.coli*, eine Rolle in der Proteinqualitätskontrolle nahe (Flynn et al. 2003). Hinzu kommt, dass es Hinweise dafür gibt, dass ClpXP eine funktionelle Rolle in der "mitochondrial associated unfolded protein response" übernimmt. Analog zur "unfolded protein response" im endoplasmatischen Retikulum werden als Antwort auf Stressinduktion diverse Proteine der Proteinqualitätskontrolle hochreguliert (Zhao et al. 2002). CLPP agiert hier aber nicht nur als Effektor zur Degradation von fehlgefalteten Proteinen, sondern scheint auch in die retrograde Signaltransduktion involviert zu sein (Haynes et al. 2007). Wie dieser Prozess im Detail funktioniert, ist aber weiterhin nicht bekannt.

2. Fragestellung

Die Glutarazidurie (GA1) hereditäre. Typ 1 ist eine neurodegenerative Stoffwechselerkrankung, die über einen Defekt der mitochondrialen Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH) zu einem mangelhaften Abbau der Amniosäuren Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan und folglich zu einer Anhäufung der Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxy-Glutarsäure (3OHGA) in allen Geweben und Körperflüssigkeiten führt. Bei Betroffenen kann dies v.a. im Zeitfenster zwischen dem 3. und dem 36. Lebensmonat im Zuge kataboler Ausnahmesituationen, wie z.B. Infekten zu einer enzephalopathischen Krise führen. Dieser Zustand bedingt eine Zerstörung striataler Neurone und als Konsequenz dann das klinische Bild einer irreversiblen dyston-dyskinetischen Bewegungsstörung. Derzeit sind mehr als 150 verschiedene pathogene Mutationen im GCDH-Gen bekannt. Bisher konnte aber noch kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp der Krankheit hergestellt werden. Exemplarisch für die beschriebene Diskrepanz ist die homozygote Mutation p.Met263Val. Diese an der Oberfläche des GCDH-Proteins lokalisierte "missense"-Mutation ist trotz einer GCDH-Restaktivität von 30% mit einem schweren klinischen Phänotyp assoziiert. Es stellte sich somit die Frage, wie Mutationen, die nicht im katalytischen Zentrum lokalisiert sind, ihre pathogenen Effekte vermitteln. Daher wurden alle an der GCDH-Proteinoberfläche liegenden Mutationen identifiziert, die wie p.Met263Val-Mutation in silico keine unmittelbare Auswirkung auf das katalytische Zentrum oder die Homotetramerisierung der GCDH haben. Diese insgesamt 18 "missense"-Mutationen wurden im ersten Teil der Arbeit in Bezug auf ihre Expression, intrazelluläre Translokation und Stabilität charakterisiert

Für einzelne mutante GCDH-Proteine ist bereits bekannt, dass sie einem beschleunigten intramitochondrialen Abbau unterliegen, wie z.B der häufigsten bei Kaukasiern zu findenden Mutation p.Arg402Trp. Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher die hierfür verantwortliche mitochondriale Protease identifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
[³⁵ S]-Methionin	Amersham Pharmacia
	Biotech, Freiburg
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Eppelheim
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
BSA (bovine serum albumin)	Serva, Heidelberg
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Coomassie blue	Serva, Heidelberg
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Diphenyloxazol (PPO)	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DNA-Standard, 1 kb-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Set (ultrapure)	Amersham, Freiburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol Merck, Darmstadt Ethidiumbromid Sigma-Aldrich, München Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Roth, Karlsruhe Formaldehyd Merck, Darmstadt Glycerin Merck, Darmstadt Glycin Sigma-Aldrich, München Isopropanol Roth, Karlsruhe Kaliumchlorid (KCl) J.T. Baker, Griesheim Kanamycin Roth, Karlsruhe Luminol Roth, Karlsruhe Methanol Merck, Darmstadt Milchpulver Roth, Karlsruhe N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Roth, Karlsruhe Natrium-Acetat Merck, Darmstadt Natriumchlorid (NaCl) Roth, Karlsruhe Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) Merck, Darmstadt Natriumdodecylsulfat (SDS) Sigma-Aldrich, München Natriumhydrogencarbonat(NaHCO₃) Merck, Darmstadt Natriumhydroxid (NaOH) Roth, Karlsruhe Paraformaldehyd (PFA) Merck, Darmstadt Protaminsulfat Sigma-Aldrich, München Protein A Agarose GE Healthcare, München PAGERuler[™] Prestained Protein Ladder Fermentas, St. Leon-Rot Saccharose J.T. Baker, Griesheim Salzsäure (HCl) Merck, Darmstadt Tissue-Solubilizer (Solvable[™]) Perkin-Elmer, USA TriReagent® Sigma-Aldrich, München Tris Sigma-Aldrich, München Triton X-100 Tween-20 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial Hersteller Cellophanfolie Pütz Folien, TaunussteinD Deckgläser Glaswarenfabrik Karl Heckt KG Einmalküvetten Plastibrand, Wertheim Einwegmaterial für Zellkultur BD Falcon, Heidelberg Einweg-Schaber Sarstedt, Nümbrecht Filmkassetten Rego, Augsburg Filterschwämme Amersham Gel-Glasplatten Amersham Gewebekulturflaschen, -schalen Sarstedt, Nümbrecht Immersionsöl 518 C Zeiss, Oberkochen Kanülen Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Kryoröhrchen Nunc, Wiesbaden Linsenpapier MN 10 B Zeiss, Oberkochen Objektträger Engelbrecht, Kassel Protran[™] Nitrocellulosemembran Whatman GmbH, Dassel Pipettenspitzen Sarstedt, Nümbrecht Reaktionsgefäße Sarstedt, Nümbrecht Röntgenfilme Kodak, Stuttgart Spritzen Braun, Melsungen Sterilfilter VWR, Darmstadt

Sigma-Aldrich, München Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt

Stripes/Deckel für "Realtime"-PCR	Applied Biosystems,
	Darmstadt
Szintillationsröhrchen	Perkin-Elmer, Waltham,
	USA
Teflonkämme	Hoefer, Holliston, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel

3.1.3

Whatman-Papier	Whatman GmbH, Dassel	
3.1.3 Arbeitsgeräte		
Gerät	Тур	Firma
Absaugpumpe	Miniport	SMT
Autoklav	3850 EL	Systec, Wettenberg
Blockthermostat	Rotilabo H250	Roth, Karlsruhe
	TM130-6	HLC, Bovenden
β –Szintillations-Counter	β–Counter LS3801	Beckman Counter, Krefeld
Imager	ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München
Drehrad	Rotator	Neolab, Heidelberg
Eismaschine	AF 10	Scotsman, Herborn
Elektrophoresekammer	Agagel Midi Wide	Biometra, Göttingen
	SE600	Hoefer, Holliston, USA
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Geltrockner	GelAir Dryer	Bio-Rad, München
Horizontalschüttler	Rocky Fröbel	Labortechnik,
Inkubationsschrank	CO2-Inkubator	Sanyo, Bad Nenndorf
	Gasboy C20A	Labotect, Wiesbaden

Inkubationsschüttler Innova 4230 New Brunswick Scientific, Nalgene™ Cryo 1°C Kryo-Einfriergerät Nalgene, Roskilde,

Innova CO-170

New Brunswick Scientific,

		Dänemark
Magnetrührer	MSH-basic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope	Leica DM IRE2	Leica, Wetzlar
	Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Promicro	Whirlpool, Stuttgart
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, Giessen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten		Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Sterilbank	Herasafe	Heraeus, Hanau
	Gelaire	Flow Laboratories, USA
Stickstoff-Einfriertank	Airpege 55	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	Tpersonal	Biometra, Göttingen
	"Realtime", MX3000P™	Stratagene, USA
	Mastercycler, Gradient	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer	TE62 & TE22	Hoefer, Holliston, USA
UV-Transilluminator	Darkroom Evo III	Raytest, Straubenhardt
Vortex	Genie 2	Scientific Industries,
Waagen	AC100	Mettler Toledo, Giessen
	BP2100 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	C 10	Schütt Labortechnik GmbH,
		Göttingen
Zentrifugen	Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
	Speed Vac®	Savant
	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
	Minifuge RF	Heraeus, Hanau
	MC6 Centrifuge	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.4 Kits und Assays

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Gene JetTM RNA Purification Kit	Thermo Scientific,
	St Leon-Rot
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystem,
	Darmstadt
QIAplasmid® Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAplasmid® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit (50)	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN, Hilden
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam,
	Niederlande
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystem,
	Darmstadt
3.1.5 Enzyme	
DNase I	Sigma-Aldrich, München
Papain	Sigma-Aldrich, München
Phusion-Polymerase	New England Biolabs,

Frankfurt am Main

Schmiesing J.,

Keyser B.,

eigene Arbeitsgruppe

Sigma-Aldrich, München

Protease-Inhibitor-Cocktail

3.1.6 Plasmide, Bakterienstämme und Zelllinien

pcDNA6.2/V5/GW/TOPO

pcDNA6.2-pGCDH-Myc

Escherichia coli TOP 10F Rifr, F', proAB, laclqz_M15, Tn10, Tetr Invitrogen, Karslruhe

Menschliche Cervixkarzinomzellen (HeLa)

ATCC, Rockville, USA

Humane Fibroblasten:

Humane Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien angezüchtet, die GA1- und Kontroll-Patienten zu diagnostischen Zwecken abgenommen worden waren. Nach Abschluss der diagnostischen Untersuchungen wurden die übrig gebliebenen kultivierten Fibroblasten in anonymisierter Form asserviert und für die hier beschriebenen Forschungszwecke eingesetzt. Vor Beginn der Versuche wurde das Vorhaben und die Verwendung der Patientenfibroblasten für Forschungszwecke unter dem Kennzeichen WF-018/13 von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg geprüft und zustimmend bewertet.

3.1.7 Medien und Zusätze

3.1.7.1 Medien für die Arbeit mit Bakterien

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	10 g/l Bacto-Trypton;
	5 g/l Bacto-Hefeextrakt;
	8 g/l NaCl;
	pH= 7,2 mit NaOH

Vor Gebrauch Zugabe von Antibiotikum (100 µg/ml Carbenicillin; 50µg/ml Kanamycin). Zur Herstellung von LB-Agarplatten zusätzliche Zugabe von 15 g/L Agar.

3.1.7.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
DMEM ohne Methionin	PAA, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Österreich
Glutamat	Sigma-Aldrich, München
GlutaMax TM	GIBCO/BRL, Eggenstein
jetPEI [™] Transfektions-Reagenz	PEQLAB, Erlangen
Lipofectamin [™] 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem [®] -1 + GlutaMax [™]	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	

(10.000 U/ml Penicillin
und 10.000 μg/ml Streptomycin)
Phosphate Buffered Saline (PBS (10X; 100mM))
GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA
GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.8 siRNA

Die siGENOME wurden von der Firma Dharmacon bezogen.

Human LONP1 (NM_004793) D-003979-04

Human CLPP (NM_006012) D-005811-03/-04

Non-Targeting-siRNA D-001210-01

3.1.9 Antikörper

3.1.9.1 Primäre Antikörper

Name/Antigen	Spezies	Verdünnung	Referenz/Firma
α CLPP	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma-Aldrich,
			München
α GCDH	Kaninchen	WB 1:5000	Dr. M. Woontner,
			Denver, USA
α GFP	Maus	WB 1:1000	Roche, Mannheim
a LONP1	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma-Aldrich,
			München
a MnSOD	Kaninchen	IF 1:100	Upstate, USA
a Myc	Maus	WB/IF 1:1000	Sigma-Aldrich,
			München
β-Tubulin E7	Maus	WB 1:500	Developmental
			Studies Hybridoma
			Bank, University
			of Iowa, USA

3.1.9.2 Sekundäre und fluoreszenzmarkierte Antikörper

Name/Antigen	Verdünnung	Referenz/Firma
Ziege α Kaninchen IgG HRP-gekoppelt	WB 1:5000	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus IgG HRP-gekoppelt	WB 1:2000	Dianova, Hamburg
Esel α Maus Alexa Fluor 488	IF 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege α Kaninchen Alexa Fluor 546	IF 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
3.1.10 Toxine		
Texas Red-X Phalloidin	IF 1:50	Invitrogen, Karlsruhe
Latrunculin		Sigma-Aldrich,
		München

3.1.11 Primer

Primer	Sequence (5'->3')
Trp50Cys-for	CCCGAGTTTGACTGCCAGGACCCGCTG
Trp50Cys-rev	CAGCGGGTCCTGGCAGTCAAACTCGGG
Asn87Ala-for	ATCCTGTTGGCCGCTCGCAACGAAGTT
Asn87Ala-rev	AACTTCGTTGCGAGCGGCCAACAGGAT
Arg88Ala-for	CTGTTGGCCAATGCCAACGAAGTTTTT
Arg88Ala-rev	AAAAACTTCGTTGGCATTGGCCAACAG
Arg88Cys-for	CTGTTGGCCAATTGCAACGAAGTTTTT
Arg88Cys-rev	AAAAACTTCGTTGCAATTGGCCAACAG
Arg88His-for	CTGTTGGCCAATCACAACGAAGTTTTT
Arg88His-rev	AAAAACTTCGTTGTGATTGGCCAACAG
Arg88Leu-for	CCTGTTGGCCAATCTCAACGAAGTTTTTC
Arg88Leu-rev	GAAAAACTTCGTTGAGATTGGCCAACAGG

Arg88Lys-for	CCTGTTGGCCAATAAAAACGAAGTTTTTC
Arg88Lys-rev	GAAAAACTTCGTTTTTATTGGCCAACAGG
Arg88Met-for	CCTGTTGGCCAATATGAACGAAGTTTTTC
Arg88Met-rev	GAAAAACTTCGTTCATATTGGCCAACAGG
Asn89Ala-for	TTGGCCAATCGCGCCGAAGTTTTTCAT
Asn89Ala-rev	ATGAAAAACTTCGGCGCGATTGGCCAA
Glu90Lys-for	GCCAATCGCAACAAAGTTTTTCATCGG
Glu90Lys-rev	CCGATGAAAAACTTTGTTGCGATTGGC
Arg94Leu-for	GAAGTTTTTCATCTGGAGATCATTTCG
Arg94Leu-rev	CGAAATGATCTCCAGATGAAAAACTTC
Gly101Arg-for	ATTTCGGAGATGAGGGAGTTGGGTGTG
Gly101Arg-rev	CACACCCAACTCCCTCATCTCCGAAAT
Tyr113His-for	ACCATCAAAGGACATGGCTGTGCTGGG
Tyr113His-rev	CCCAGCACAGCCATGTCCTTTGATGGA
Cys115Tyr-for	AAAGGATATGGCTATGCTGGGGGTTTCG
Cys115Tyr-rev	CGAAACCCCAGCATAGCCATATCCTTT
Gly117Arg-for	TATGGCTGTGCTAGGGTTTCGTCTGTG
Gly117Arg-rev	CACAGACGAAACCCTAGCACAGCCATA
Ser119Leu-for	TGTGCTGGGGTTTTGTCTGTGGCCTAT
Ser119Leu-rev	ATAGGCCACAGACAAAACCCCAGCACA
Tyr155His-for	CCTATCTATGCCCATGGCAGCGAGGAA
Tyr155His-rev	TTCCTCGCTGCCATGGGCATAGATAGG
Arg161Gln-for	AGCGAGGAACAGCAGCAGAAGTACCTG
Arg161Gln-rev	CAGGTACTTCTGCTGCTGCTCCTCGCT

Pro217Leu-for	ATCACGAACTCGCTTATGGCCGATCTG
Pro217Leu-rev	CAGATCGGCCATAAGCGAGTTCGTGAT
Arg227Pro-for	GTAGTGTGGGGCTCCGTGTGAAGATGGC
Arg227Pro-rev	GCCATCTTCACACGGAGCCCACACTAC
Gly244Cys-for	AAGGGGATGCGGTGTCTCTCGGCCCCC
Gly244Cys-rev	GGGGGCCGAGAGACACCGCATCCCCTT
Pro248Leu-for	CGGGGTCTCTCGGCCCTCAGGATCCAGGGC
Pro248Leu-rev	GCCCTGGATCCTGAGGGCCGAGAGACCCCG
Met263Val-for	GGGCCTCAGCCACAGGCGTGATCATCATGGACGG
Met263Val-rev	CCGTCCATGATGATCACGCCTGTGGCTGAGGCCC
Pro278Ser-for	GAGAATGTGCTCTCTGGTGCATCCAGC
Pro278Ser-rev	GCTGGATGCACCAGAGAGCACATTCTC
Arg355His-for	CTGCAGCTCGGCCACTTGAAGGACCAG
Arg355His-rev	CTGGTCCTTCAAGTGGCCGAGCTGCAG

Die ersetzten Basentripletts, die für die mutierten Aminosäuren kodieren wurden grau hinterlegt.

Name	TaqMan®-Gene Expression Assay	
GCDH	Hs00240811_m1	
LONP1	Hs00998404_m1	
CLPP	Hs01101010_m1	
ß-Aktin	Mm00607939_s1	
3.1.13 Software		
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München	
CorelDraw® 11.6	Corel Coop., Unterschleißheim	

3.1.12 TaqMan® Primer für die quantitative "Realtime"-PCR

Endnote X3	Thomson Reuters (Frankfurt a. Main)
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software Inc, USA
Leica Confocal Software 2.6	Leica, Wetzlar
Microsoft Office Standard Edition 2013	Microsoft, Redmond, USA
MxPro Realtime-PCR 4.6.1	Stratagene Europe, Niederlande
Quantity One v 4.6.9	Bio-Rad (München)
Image LabTM	Bio-Rad (München)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Klonierung der GCDH-Mutanten

Die einzelnen Mutationen wurden mit Hilfe des "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" nach Angabe des Herstellers in das GCDH-Gen eingebracht.

3.2.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Zuerst wurden die chemokompetenten TOP10-*E.coli*-Zellen (100 µl) auf Eis aufgetaut, dann mit 5 µl Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Folgend auf einen Hitzeschock bei 42°C für 1 min und einer Inkubation auf Eis für 5 min wurden 250 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h auf dem Schüttler (220 rpm) bei 37°C geschüttelt. 50-150 µl Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die das spezifische Antibiotikum, für das ein Resistenzgen auf dem verwendeten Vektor existiert, enthielten. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden 5 ml LB-Medium (+Antibiotikum) mit je einer Kolonie angeimpft. Mit diesen Vorkulturen wurden die Plasmide präpariert und Glycerinkulturen angelegt. Zur Kontrolle wurden zuerst die Plasmide mit dem "GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit" (bis 20 µg DNA) isoliert und sequenziert.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Plasmid-DNA Isolierung wurde entweder das "GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit" (bis 20 µg DNA) oder das "QIAfilter Plasmid Midi Kit" (bis zu 100 µg DNA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Proben wurden von der Firma "Seqlab" (Sequence Laboratories, Göttingen) sequenziert.

Sequenzierungs-Ansatz: 0,6 µg Plasmid 20 pmol Primer ad 7 µl dH2O

3.2.5 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer40 mM Tris/HCl pH 8.520 mM Essigsäure2 mM EDTA

DNA-Ladepuffer 40% Saccharose 1 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2% (w/v) Agarosegele verwendet. Die benötigte Agarosemenge wurde in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 55°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 μ g/ml). Die Proben wurden zusammen mit DNA-Ladepuffer auf das Gel aufgetragen und bei 100-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid unter UV-Licht als Bande detektiert.

3.2.6 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das Medium eukaryotischer Zellen in 6 cm-Kulturschalen abgesaugt und die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden sie für 5 min bei RT mit 1 ml "TriReagent" inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform unter 15-sekündigen Vortexen gemischt. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min bei RT wurde das Gemisch für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Hierbei bildeten sich drei Phasen. Die obere, RNA enthaltende Phase, wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei die Interphase zu berühren, und wiederum in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 600 µl 70% Ethanol hinzugefügt und erneut gevortext. Das Gemisch wurde auf eine Säule des "GeneJet[™] RNA Purification Kit" gegeben und die Säule nach Herstellerangaben gewaschen. Am Ende wurde die RNA eluiert. Der RNA-Gehalt der Probe wurde mitttels Photometrie bei 260 nm gemessen. Die Qualität wurde im Agarosegel überprüft.

3.2.7 cDNA-Synthese

Um die RNA zu amplifizieren, muss diese zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.8 Quantitative "Realtime"-PCR

Für die quantitative Analyse der RNA-Expression wurde der "TaqMan®Gene Expression Assay" verwendet. Als Matrize für die PCR musste hierfür zunächst, wie unter 3.2.7 beschrieben, cDNA aus der isolierten RNA synthetisiert werden. Mit der quantitativen "Realtime"-PCR kann neben der Amplifizierung der cDNA diese auch parallel in Echtzeit quantifiziert werden. Hierbei wird über Fluoreszenzsignale die Produktzunahme gemessen. Die in dem Assay verwendeten "TaqMan"-Sonden haben am 5'-Ende ein Reporterfluorochrom und am 3'-Ende ein Quencherfluorochrom gekoppelt. Durch die räumliche Nähe der beiden Fluorochrome hemmt der Quencher den Reporter in der Emission des zu detektierenden Fluoreszenzsignals. Erst während der Elongation des Primers durch die "Taq"-DNA-Polymerase hydrolysiert diese durch ihre endonukleolytische Aktivität die Sonde. Durch die entstehende räumliche Trennung des Reporters vom Quencher kann nach spezifischer Anregung die Lichtemission des Reporters fluorometrisch gemessen werden. Es entsteht ein zur Konzentration des Amplifikats proportionales Signal. Initial ist aufgrund der zu geringen Produktmenge noch kein Anstieg der Signalstärke detektierbar. Erst mit Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation kann der sogenannte "cycle of threshold" (Ct-Wert) ermittelt werden. Die Auswertung der relativen Quantifizierung der RNA erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak et al. 2001). Zunächst wird mit dieser

Methode die Differenz zwischen dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens und einem Kontrollgen (β -Actin) berechnet. Durch den Vergleich der untersuchten Gruppen kann die relative Expression 2^{- $\Delta\Delta$ CT} ermittelt werden.

Hierbei gilt: $\Delta Ct = Ct_{Gen} - Ct_{\beta-Actin}$ und $\Delta \Delta Ct = Ct_{defiziente Zellen} - Ct_{Wildtyp-Zellen}$.

Die relative Expression der Kontrollzellen wurde gleich 1 gesetzt. Jede durchgeführte "Realtime"-PCR-Reaktion erfolgte in einem 20 µl PCR-Ansatz in Triplikaten. Der Nachweis der Fluoreszenzemissionen erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor MX3000PTM.

Ansatz "Realtime"-PCR:	10 μl <i>TaqMan</i>	B 2 x Universal PCR Master Mix
	7 µl dH2O	
	1 μl TaqMan®	Gene Expression Assay
	2 µl cDNA	
PCR:	95°C 10 min	
Denaturierung	95°C 30 sec	
Annealing/Elongation	60°C 1 min	40 Zyklen

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 85% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Alle drei Tage wurden die Zellen mit vorgewärmten Medien und Lösungen passagiert. HeLa-Zellen und Fibroblasten wurden in DMEM + GlutaMax[™] + 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

3.3.2 Trypsinieren von Zelllinien

Zunächst wurden die konfluenten Zellen mit PBS gewaschen, um das Trypsininhibierende FKS zu entfernen. Das PBS wurde wiederum abgesaugt und die Zellen wurden für 5 min mit 0,05% (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C bis zum Ablösen des adhärenten Zellrasens inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.3.3 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, in FKShaltigem Medium aufgenommen und bei 900 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 3 ml (75 cm²-Kulturflasche) Einfriermedium bestehend aus DMEM + 10% DMSO + 10% FKS aufgenommen und auf eine entsprechende Anzahl Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei - 80°C in einem "Nalgene[™] Cryo 1°C Freezing Container" eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung wurden die Kryoröhrchen für 1 min bei RT angewärmt, die Zellsuspension wurde in 5 ml kaltem Medium aufgenommen und für 5 min bei 900 g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Am nächsten Tag wurde erneut das Medium gewechselt um abgestorbene Zellen, Zelltrümmer und DSMO-Reste zu entfernen.

3.3.4 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion adhärenter HeLa-Zellen wurde mit dem Transfektionsreagenz jetPEI[™] nach Herstellerangaben durchgeführt. Die ausgesäten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90% kultiviert. Die zur Transfektion eingesetzte Menge vektorieller DNA richtete sich nach der verwendeten Größe der Kulturschale.

Kulturschale	DNA	jetPEI™
10 cm	10 µg	20 µl
6 cm	5,0 µg	10 µl
12-well	2,0 µg	4,0 µl
24-well	1,0 µg	2,0 µl

3.3.5 Transiente siRNA-Transfektion von HeLa-Zellen und Fibroblasten

Am Morgen des ersten Tages des Experimentes wurden p.Arg402Trp-Patienten- und Kontrollfibroblasten auf ø 6 cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Alle folgenden Transfektionen wurde nach dem Schema in Tabelle 1 durchgeführt. Der zeitliche

siRNA	Optimem	Lipofectamine 2000	Optimem	Total	Medium	Petrischale
125 pmol	387,5µl	10 µl	390 µl	800 μl	4,2 ml	6 cm Platte

Ablauf des Experimentes ist in Abb. 3.1 aufgeführt. Am Abend erfolgte die erste siRNA-Transfektion (für die verwendeten siRNA siehe 3.1.8).

Tabelle 1 Transfektionsschema für die siRNA-"downregulation"

48 h nach der ersten Transfektion folgte die zweite Transfektion. Die dritte und letzte Transfektion wurde 96 h nach der ersten durchgeführt. Am Folgetag wurden die Zellen für WB-Analysen bzw. Pulse-Chase Experimente vorbereitet (3.3.8).



Abb. 3.1 Zeitleiste der siRNA-Experimente

3.3.6 Latrunculin-Assay

Der Latrunculin-Assay beruht auf der Wirkung des Latrunculins, das als Makrolid-Toxin die Polymerisierung des Aktins verhindert und somit dessen Struktur innerhalb der Zelle zerstört. HeLa-Zellen wurden hierfür in 12-Well-Zellkulturschalen ausplattiert, die zuvor mit sterilen Deckgläschen bestückt wurden. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5 x 10⁴ Zellen/cm² ausgesät und am nächsten Tag wurde die transiente Transfektion der verwendeten vektoriellen Plasmid-DNA durchgeführt. 24 h später wurden die für die Latrunculin-Behandlung vorgesehenen Zellen mit 5 μ M Latrunculin, gelöst in DMEM-Medium, für 30 min inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und somit die Latrunculin-Reaktion gestoppt. Wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben, wurde mit der Fixierung der Zellen und der anschließenden Immunfluoreszenz-Analyse fortgefahren.

3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)

HeLa-Zellen wurden für die IFA in 12-Well-Zellkulturschalen ausplattiert, die zuvor mit sterilen Deckgläschen bestückt wurden. Die Zellen wurden in einer Dichte von
5×10^4 Zellen/cm² ausgesät und am nächsten Tag transient mit der entsprechenden vektoriellen Plasmid-DNA transfiziert. 24 h später wurde die IFA durchgeführt.

Die Zellen wurden zunächst dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 500 µl 4% Paraformaldehyd für 15 min bei RT fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Plasmazellmembranen wurden mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert und zur Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen für 1 h in PBS mit 2% BSA inkubiert. Nach Entfernen der Blockier-Lösung wurden die Deckgläschen aus der 12-well Platte herausgenommen und auf einen Streifen Parafilm gelegt. Nun wurden die einzelnen Deckgläschen mit den fixierten Zellen mit 200 µl Antikörperlösung (primärer Antikörper) in der spezifischen Verdünnung in PBS mit 2% BSA entweder für 2 h bei RT oder bei 4°C ü.N inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper in PBS mit 2% BSA für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min mit einer DAPI-Lösung (Verdünnung 1:1000) inkubiert. Wiederum wurden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit dH2O gewaschen, um dann mit Eindeckmedium (Aqua-Poly/Mount) auf Objektträgern fixiert zu werden. Über Nacht wurden die einzelnen Objektträger bei RT getrocknet. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden am konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (Vergrößerung: 63x, Leica DMIRE2) analysiert. Zur Doppelimmunfluoreszenzanalyse wurden die Einzelaufnahmen der Fluoreszenzsignale digital überlagert (Adobe Photoshop Software).

3.3.8 Metabolische Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin

Hungermedium	DMEM ohne Methionin und Glutamin	
	1 x GlutaMax™	
	1 x Penicillin/ Streptomycin	
	5% hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS	
"Pulse"-Medium	DMEM ohne Methionin und Glutamin	
	1 x GlutaMax™	
	1 x Penicillin/ Streptomycin	
	5% hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS	

	150 μ Ci/ml [³⁵ S]-Methionin
"Chase"-Medium	DMEM
	1 x GlutaMax™
	1 x Penicillin/ Streptomycin
	5% hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS
Lysispuffer	0,1% BSA
	1% Triton X-100
	1 x Protease-Inhibitor-Cocktail
	in 1xPBS

3.3.8.1 Metabolische Markierung von GCDH und GCDH-Mutanten in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden abends auf ø 3,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden am nächsten Morgen mit den entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert (3.3.4) und am folgenden Tag wurde mit der metabolischen Markierung begonnen. Zu Beginn wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann für 1 h bei 37°C mit jeweils 700 µl Hungermedium inkubiert. Währenddessen wurde das "Pulse"-Medium vorbereitet. Zur Überprüfung der Radioaktivität wurden 2 µl des "Pulse"-Mediums in 2 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität im β-Szintillationscounter gemessen. Das Hungermedium wurde dann durch das "Pulse"-Medium ersetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert ("Pulse"). Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und entweder lysiert (3.4.4) oder folgend mit 700 µl "Chase"-Medium für weitere 24 h inkubiert ("Chase"). Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und lysiert. Die lysierten Zellextrakte wurden dann zur Immunpräzipitation eingesetzt (3.4.4).

3.3.8.2 Metabolische Markierung von GCDH und GCDH-Mutanten in Fibroblasten

Fibroblasten wurden auf \emptyset 6 cm-Zellkulturschalen ausgesät und einer siRNA-"downregulation" unterzogen (3.3.5). Am Tag nach der letzten siRNA-Transfektion wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann für 1 h bei 37°C mit jeweils 1,4 ml Hungermedium inkubiert. Die Vorbereitung des "Pulse"-Mediums erfolgte wie unter 3.3.8.1 beschrieben. Anschließend wurde das Hungermedium durch jeweils 1,4 ml "Pulse"-Medium ersetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach dem "Pulse" wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und entweder lysiert (3.4.4) oder folgend mit 1,4 ml "Chase"-Medium für 4 h bzw. 24 h inkubiert ("Chase"). Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und lysiert. Die lysierten Zellextrakte wurden dann zur Immunpräzipitation eingesetzt (3.4.4).

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des "Bio-Rad Protein Assay". 5-10 μ l Proteinprobe wurden mit dH₂O auf 800 μ l aufgefüllt und pro Probe mit 200 μ l "Bio-Rad"-Reagenz versetzt. Zusätzlich wurde über eine Verdünnungsreihe mit Standard-BSA-Lösung (0-20 μ g) eine Eichgerade erstellt. Photometrisch wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm erfasst und anhand der Eichgerade die Proteinkonzentration ermittelt.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel:	4% (v/v) Acrylamid		
	100 mM Tris/HCl (pH 6,8)		
	0,1% (w/v) SDS		
	0,1% (w/v) APS		
	0,1% (v/v) TEMED		
Trenngel:	10% (v/v) Acrylamid		
	375 mM Tris/HCl (pH 8,8)		
	0,1% (w/v) SDS		
	0,016% (w/v) APS		
	0,08% (v/v) TEMED		
Solubilisierungspuffer (2x)	250 mM Tris/HCl (pH 6,8)		

	2% (w/v) SDS
	20% (v/v) Glycerin
	Coomassie Blue G
	(reduzierend: + 20 mM DTT)
Anodenpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8,6
	192 mM Glycin
Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8,6
	192 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in modifizierter Form nach Laemmli wurden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (1970). Für große Gele wurden 50 - 100 μ g Protein gelöst in Solubilisierungspuffer zunächst für 5 min bei 95°C gekocht und dann auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung in großen Gelen erfolgte bei RT und 55 mA/Gel für ~ 2 h. Zur Auftrennung von Proteinen in Mini-Gelen wurden 10 - 20 μ g Protein mit Solubilisierungspuffer aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte anfangs bei 85 V und sobald die Lauffront ins Trenngel überlief, wurde der Vorgang für weitere 45 min bei 180 V fortgesetzt.

3.4.3 Western Blot-Analyse

Transferpuffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% Methanol
Blockierpuffer:	1 x PBS
	0,2% Tween 20
	5% Milchpulver
Waschpuffer:	1 x PBS
	0,1% Tween 20

"Enhanced Chemilumineszenz" (ECL):

Lösung 1:	2,7 mM Luminol	
	0,44 mM p-Cumarinsäure	
	100 mM Tris/HCl (pH 8,5)	
Lösung 2:	10 µl 30% H2O2	
	0,1 mM Tris/HCl (pH 8,5)	

Zur Immundetektion spezifischer Proteine wurden die mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennten Proteine in der Western Blot-Analyse auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. In einer mit Transferpuffer gefüllten Elektroblot-Apparatur wurden große Gele für 2 h bei 900 mA und Mini-Gele für 1 h bei 400 mA geblottet. Im Anschluss wurde die Nitrocellulose-Membran unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Wippe inkubiert. Als erstes wurden unspezifische Antigenbindungsstellen für 1 h mit dem Blockierpuffer gesättigt. Die folgende Inkubation mit dem Primärantikörper verdünnt in Blockierpuffer erfolgte entweder ü.N. bei 4°C oder bei RT für 2 h. Nach dreimaligem, jeweils 10-minütigem Waschen der Membran mit Waschpuffer folgte eine Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (verdünnt in Blockierpuffer) für 1 h. Nach der Inkubation wurde erneut dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper und ihre Verdünnungen sind unter Abschnitt 3.1.9 nachzulesen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran unter Lichtausschluss mit der ECL-Lösung (Lösung 1 und 2 der ECL in einem Verhältnis 1:1) für 1 min inkubiert. Die entstehende Chemiluminiszenz wurde mit der ChemiDoc-Kamera aufgenommen. Zur Detektion weiterer Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran durch "Strippen" von den gebundenen Antikörpern befreit. Zum Strippen wurde die Membran zuerst zweimal 5 min mit dH₂O gewaschen und dann 5 min mit 0,2 M NaOH inkubiert und anschließend erneut zweimal mit dH₂O gewaschen. Jede weitere Immundetektion wurde mit einem Blockierungsvorgang begonnen.

3.4.4 Immunpräzipitation metabolisch markierter GCDH und GCDH-Mutanten

PIMM:

1% Triton X-100 0,5% Na-Desoxycholat 0,2% SDS

	10% BSA
	1 x Protease-Inhibitor-Cocktail
	in PBS
IMM:	1% Triton X-100
	0,5% Na-Desoxycholat
	in PBS
Neufeld-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 8,5)
	0,6 M NaCl
	0,1% SDS
	0,05% NP-40
Lysispuffer	0,1% BSA
	1% Triton X-100
	1 x Protease-Inhibitor-Cocktail
	in PBS

Nach metabolischer Markierung der Proteine ("Pulse") und anschließender Prozessierungs- und Sortierungszeit ("Chase") wurden die Zellen in 800 µl Lysispuffer lysiert, mit dem Einweg-Schaber von der Zellkulturschale geschabt und jede Probe einzeln in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Zur Triton Extraktion wurden die Proben 10 min auf Eis gelagert. Die DNA-Fällung erfolgte mit jeweils 10 µl 3% Protaminsulfat und einer weiteren 10-minütigen Inkubation auf Eis. Anschließend wurde die DNA bei 10.000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 200 µl PIMM pro Probe wurden hinzugefügt. Nach der Vorbereitung der Protein A-Agarose in zwei Waschschritten mit IMM wurde eine 50%-Lösung in IMM hergestellt. Jede Probe wurde mit 40 µl der Protein A-Agarose-Lösung versetzt und 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Protein A-Agarose und unspezifisch daran gebundene Proteine wurden bei 1000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde ü.N. mit 2 µl des entsprechenden Primärantikörpers auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden erneut 40 ul der Protein A-Agarose-Lösung zu jeder Probe hinzugefügt und es folgte eine weitere Inkubation auf dem Drehrad bei 4°C für 1 h. Die Protein A-Agarose mit den

präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexen wurde dann bei 1000 x g abzentrifugiert und wie folgt sequentiell gewaschen. Zwischen jedem Waschschritt erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 x g bei 4°C für 1 min:

- 1 x 800 µl Neufeldpuffer
- 1 x 800 µl IMM
- 1 x 800 µl IMM + 2 M KCL
- 2 x 800 µl 0,1 PBS

Die präzipitierten Proteine wurden anschließend durch fünfminütiges Erhitzen in zweimal Solubilisierungspuffer bei 95°C von der Protein A-Agarose getrennt. Mit Hilfe von SDS-PAGE (10% Acrylamid) wurden die Proteine aufgetrennt und anschließend mit Fluorographie analysiert.

3.4.5 Fluorographie

Die radioaktiv markierten Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde dann zunächst dreimal für 20 min in DMSO geschwenkt und ü.N. in 20% PPO/DMSO gelegt. Diese Schritte dienten einer Signalverstärkung der radioaktiv markierten Proteine in dem Polyacrylamid-Gel. Zweimal wurde das Gel dann für 30 min in dH₂O geschwenkt, bevor es zwischen zwei Cellophan-Folien für 3 h im Geltrockner getrocknet wurde. Die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse pathogener GCDH-Oberflächenmutationen

Für das Krankheitsbild der GA1 sind derzeit mehr als 150 pathogene Mutationen im GCDH-Gen bekannt (Busquets et al. 2000, Goodman et al. 1998, Mushimoto et al. 2011, Schwartz et al. 1998). Für einzelne dieser Mutationen besteht ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem biochemischen Phänotyp (GCDH-Enzymaktivität und Metabolitausscheidung). Es ist aber für keinen der genannten Parameter bisher gelungen, eine Korrelation zum klinischen Verlauf der Erkrankung herzustellen (Christensen et al. 2004). Ein Beispiel für die fehlende Korrelation stellt die homozygote "missense"-Mutation p.Met263Val dar, die mit einer GCDH-Restaktivität von 30% assoziiert und dennoch zu einem schweren klinischen Phänotyp führt (Mühlhausen et al. 2003). Der Aminosäurerest Met263 befindet sich an der Oberfläche des Proteins und sein Austausch zu Valin führt führt zu einer Veränderung des Musters heteromerer GCDH-Proteinkomplexe (Keyser et al. 2008). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass oberflächlich lokalisierte GCDH-Mutationen die heteromere Interaktion von GCDH mit anderen Proteinen beeinflussen und möglicherweise negativen Einfluss auf die Regulation der GCDH-Aktivität in vivo nehmen können. Um speziell den Einfluss pathogener GCDH-Oberflächenmutationen auf den klinischen Verlauf bei der GA1 besser verstehen zu können, wurden für diese Arbeit alle bei Patienten bisher beschriebenen Mutationen ("Human Gene Mutation Database", Uniprot) mittels 3D-Strukturanalyse in silico (PyMOL® Software Version 1.5) hinsichtlich ihrer Lokalisation im GCDH-Protein untersucht. Insgesamt wurden dabei 18 "missense"-Mutationen auf der Oberfläche des Proteins identifiziert, die in silico weder einen direkten Einfluss auf das katalytische Zentrum noch auf die Tetramerisierung des Proteins haben (Abb. 4.1-A/B). In der vorliegenden Arbeit wurden diese 18 Mutationen hinsichtlich Expression, intrazellulärer Translokation und proteolytischem Abbau untersucht.



Abb. 4.1 Übersicht pathogener GCDH-Oberflächenmutationen

(A/B) Mit Hilfe der Software PyMOL® und der bekannten Kristallstruktur des GCDH-Proteins (protein data bank:1SIQ) (Fu et al. 2004) wurden die ausgesuchten Aminosäuren auf der 3D-Struktur farblich gekennzeichnet. Die einzelnen Monomere des GCDH-Tetramers sind in verschiedenen Graustufen markiert. Proteinstruktur aus zwei jeweils unterschiedlichen Perspektiven. (C) Tabellarische Darstellung der zugehörigen "missense"-Mutationen.

4.1.1 Expressionsanalyse der GCDH-Oberflächenmutanten

Um den Einfluss der einzelnen "missense"-Mutationen zunächst auf die Expression des GCDH-Proteins zu überprüfen, wurden die ausgewählten Mutanten mittels "Quick-Change-Mutagenese" in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 6.2 kloniert. Diese wurden dann als Myc-Fusionsproteine transient für 24 h in HeLa-Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Proteine aus dem Zelllysat extrahiert, mittels Acrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und über einen Myc-spezifischen Western Blot analysiert.



Abb. 4.2 Expressions analyse von Wildtyp- und mutanter GCDH

(A) GCDH-WT und GCDH-Mutanten wurden transient als Myc-Fusions-Proteine in HeLa-Zellen für 24 h exprimiert. Zellproteine wurden extrahiert und Aliquots mit gleichen Proteinmengen (100 μ g) mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und über einen Myc-spezifischen Western Blot analysiert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde GFP co-exprimiert. Als Ladekontrolle fungierte β -Tubulin und als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte HeLa-Zellen (nt). (B) Die Intensitäten der 44 kDa-Banden wurden mittels Densitometrie ausgewertet und nach Normalisierung auf die Ladekontrolle auf das Signal der Wildtyp-GCDH (100%) bezogen. Das Balkendiagramm zeigt die relative Proteinexpression nach n=5 Versuchen. Signifikante Unterschiede wurden mittels One-Way-Anova, gefolgt vom "Dunnett's multiple comparisons test" ermittelt, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Sowohl Wildtyp-GCDH als auch die mutanten GCDH-Proteine konnten als immunreaktive 44 kDa Bande detektiert werden (Abb. 4.2). Dies entspricht dem Molekulargewicht der maturen GCDH-Form. Für die Quantifizierung der Expression wurden die Signalintensitäten densitometrisch berechnet und jeweils auf GFP/ß-Tubulin normalisiert. Indem GCDH-Wildtyp gleich 100% gesetzt wurde, konnten die restlichen Werte hierzu in Relation betrachtet werden. Für einen Großteil der mutanten GCDH-Formen konnte eine verminderte Expression beobachtet werden, die auf eine reduzierte Synthese der mutanten GCDH, auf einen verstärkten Abbau durch Proteasen oder beides hindeutet. Bei neun Mutanten konnten signifikante Abweichungen in der Expression gegenüber dem GCDH-Wildtyp festgestellt werden. Am stärksten waren die Mutanten p.Gly101Arg, p.Ser119Leu und p.Gly244Cys betroffen, die nur noch ein Signal von $14,7 \pm 5,1\%$, $15,8 \pm 9,3\%$ und $12,8 \pm 8,3\%$ des Wildtyps aufwiesen. Die Mutanten p.Gly117Arg, p.Pro217Leu, p.Arg227Pro, p.Pro248Leu, p.Met263Val und p.Arg355His zeigten mit einer Signalintensität zwischen 31-53% des Wildtyps ebenfalls eine signifikante Reduktion. Die Expression der GCDH-Mutanten p.Trp50Cys, p.Arg88Cys, p.Glu90Lys, p.Arg94Leu, p.Cys113His, p.Cys115Tyr, p.Tyr155His, p.Arg161Gln, sowie p.Pro278Ser zeigten keine signifikante Signaländerung (Abb. 4.2).

4.1.2 Analyse der Intrazellulären Lokalisation der GCDH-Oberflächenmutanten

Um eventuelle Einflüsse der einzelnen Mutationen auf den Transport des nukleär kodierten GCDH-Proteins in das Mitochondrium zu überprüfen, wurden Doppelimmunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Als mitochondrialer Marker fungierte dabei die Mangansuperperoxiddismutase (MnSOD).

Ergebnisse



Abb. 4.3 Intrazelluläre Lokalisation von Wildtyp- und mutanter GCDH

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA der Wildtyp- und mutanten GCDH, die C-terminal mit einem "Myctag" versehen war, transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörpern gegen GCDH-Myc (grün) und MnSOD (rot) in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Für die GCDH-Mutanten sind nur die "Merge"-Bilder gezeigt, die die Überlagerung beider Signale darstellen. Gelb indiziert die Kolokalisation der GCDH mit dem mitochondrialen Protein MnSOD. Detailaufnahmen der weißen Rechtecke sind ganz rechts (Wildtyp) oder jeweils unter den einzelnen Bilder (Mutanten) aufgeführt. Maßstab: Übersicht 15 µm / Vergrößerung 5 µm Das GCDH-Wildtyp-Protein zeigte eine nahezu vollständige Kolokalisation mit MnSOD. Ebenso ließ sich für die einzelnen GCDH-Oberflächenmutanten eine überwiegende bis vollständige Kolokalisation der beiden Signale ableiten, was auf eine intramitochondriale Lokalisation der GCDH-Mutanten schließen lässt. Auffällig bei den Untersuchungen war die Mutante p.Arg88Cys, die eine spezielle, von dem Wildtyp stark abweichende Morphologie zeigte. Anstatt einer normalen mitochondrialen Struktur wies die Mutante p.Arg88Cys ein tubuläres, Aktin-ähnliches Muster auf.

4.1.3 Untersuchung der speziellen mitochondrialen Morphologie der Mutante p.Arg88Cys

Die Mutante p.Arg88Cys zeigte als einzige die unter 4.1.2 beschriebene morphologische Varianz. Um die Relevanz des hydrophoben Cysteins an Position 88 in diesem Zusammenhang zu eruieren, wurden verschiedene Mutagenesen durchgeführt. An Position 87 und 89 wurde jeweils das polare Asparagin durch das hydrophobe Alanin substituiert und an Position 88 das basische Arginin einzeln durch die Aminosäuren Alanin (hydrophob/unpolar), Histidin (basisch), Leucin (hydrophob/unpolar), Lysin (basisch) und Methionin (hydrophob/unpolar) substituiert. Diese neuen Mutanten wurden in Bezug auf ihre Expression und ihre Morphologie hin untersucht. Die cDNAs der beschriebenen Mutanten wurden in HeLa-Zellen transient als Myc-Fusionsprotein transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion entweder geerntet, lysiert und die Proteinextrakte mittels WB analysiert (Abb. 4.4-A) oder fixiert und mittels Doppelimmunfluoreszenzanalyse untersucht (Abb. 4.4-B).



Abb. 4.4 Expression und Lokalisation verschiedener p.Arg88-GCDH-Mutationsvarianten

(A) HeLa-Zellen wurden mit der cDNA der angegebenen GCDH-Mutanten, die C-terminal mit einem "Myc-tag" versehen waren, transfiziert und für 24 h exprimiert. Anschließend wurden Aliquots mit gleichen Proteinmengen (100 μg) extrahiert und mittels SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und über einen Myc-spezifischen Western Blot analysiert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde GFP co-exprimiert. Als Ladekontrolle fungierte β-Tubulin und als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte HeLa-Zellen (nt). Die Intensitäten der 44 kDa-Banden wurden mittels Densitometrie ausgewertet und nach Normalisierung auf die Ladekontrolle auf das Signal der Wildtyp-GCDH (100%) bezogen. (B) HeLa-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mittels Antikörpern für GCDH-Myc (grün) und MnSOD (rot) in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Es sind nur die "Merge"-Bilder gezeigt, die die Überlagerung beider Signale darstellen. Gelb indiziert die Kolokalisation der GCDH mit dem mitochondiralen Protein MnSOD. Detailaufnahmen der weißen Rechtecke sind jeweils unter den einzelnen Bildern aufgeführt. Maßstab: Übersicht 15 μm / Vergrößerung 5 μm

Im Zuge der densitometrischen Auswertung des WB wurde die Intensität der Wildtypbande gleich 100% gesetzt. Es ergaben sich hierbei keine signifikanten Änderungen bezüglich der Expression der einzelnen Mutanten.

Um den Einfluss des Cysteins an Position 88 auf die mitochondriale Struktur und Lokalisation zu bewerten, wurden die einzelnen Mutanten mittels Immunfluoreszenz, wie 4.1.2 beschrieben, mikroskopisch untersucht. Die konzipierten unter Mutationsvarianten scheinen ebenso wie die p.Arg88Cys-Mutante den Transport der GCDH ins Mitochondrium nicht negativ zu beeinflussen, da für alle Mutanten eine nahezu vollständige Kolokalisation mit dem mitochondrialen Markerprotein MnSOD beobachtet werden konnte. Bezüglich der Morphologie zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Die Mutationen p.Arg88His, p.Arg88Leu, p.Asn87Ala und p.Asn89Ala zeigten keine auffälligen morphologischen Veränderungen. Hingegen ließ sich bei den Mutanten p.Arg88Ala, p.Arg88Lys und p.Arg88Met ein morphologisch vergleichbares Muster wie bei der Patientenmutation p.Arg88Cys beobachten (Abb. 4.4).

Zur Überprüfung, ob es sich bei den markierten Strukturen um das sich ähnlich darstellende Aktinskelett handelt, wurde ein Latrunculin-Assay durchgeführt. Das Toxin Latrunculin verhindert die Polymerisierung des Aktins und zerstört somit dessen Struktur innerhalb der Zelle. Es wurden HeLa-Zellen mit GCDH-Wildtyp und der Mutante p.Arg88Cys transient transfiziert. Nach 24 h wurde ein Teil der Zellen für 30 min mit 5 µM Latrunculin inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und es wurde eine Doppelimmunfluoreszenzanalyse durchgeführt.



Abb. 4.5 Latrunculinassay

HeLa-Zellen wurden mit der cDNA der Wildtyp- und p.Arg88Cys-GCDH, die C-terminal mit einem "Myc-tag" versehen war, transfiziert und für 24 h exprimiert. Ein Teil der Zellen wurde für 30 min mit 5 μ M Latrunculin inkubiert und der andere Teil blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert. GCDH wurde in grün mittels eines Myc-Antikörpers und das Aktinskelett mit Phalloidin in rot markiert. Zu sehen sind zusätzlich die überlagerten Signale ("Merge") sowie eine Detailaufnahme ganz rechts. Maßstab: Übersicht 15 μ m / Vergrößerung 5 μ m

Es konnte schließlich weder für die mit Latrunculin behandelten noch für die unbehandelten Zellen eine Kolokalisation zwischen der GCDH und dem Aktinskelett nachgewiesen werden. Die Zerstörung des Aktinskeletts durch das Latrunculin zeigte zudem keine Auswirkungen auf die Struktur des GCDH-Signals in den Wildtyp-und den p.Arg88Cys-überexprimierenden Zellen (Abb. 4.5). Die morphologische Varianz ist daher nicht mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft.

4.1.4 Stabilitätsstudien der GCDH-Mutanten

Die unter 4.1.1 beschriebene Expressionsanalyse der GCDH-Oberflächenmutanten zeigte im Vergleich zum Wildtyp verminderte Signale unterschiedlichen Ausmaßes für alle Mutanten. Um spezifischer die Stabilität und den Abbau der einzelnen Mutanten zu analysieren wurden "Pulse-Chase" Experimente durchgeführt. Hierfür wurden der GCDH-Wildtyp und die GCDH-Oberflächenmutanten in HeLa-Zellen überexprimiert.

Es erfolgte zuerst ein einstündiger "Pulse", währenddessen transfizierte HeLa-Zellen mit [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium inkubiert wurden. Daraufhin wurde die Hälfte der Proben direkt geerntet. Die zweite Hälfte wurde einem 24-stündigen "Chase" in nicht-radioaktivem Medium unterzogen. Nach der Proteinextraktion wurde GCDH-Myc immunpräzipitiert, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert.



Abb. 4.6 Stabilitätsanalyse von Wildtyp- und mutanter GCDH

Wildtyp- und mutante GCDH-Myc überexprimierende HeLa-Zellen wurden in einem einstündigen "Pulse" mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert. Im Anschluss wurde die eine Hälfte der Zellen direkt (-), die andere Hälfte nach einem 24 h "Chase" (24) in nicht-radioaktivem Medium geerntet. Darauffolgend wurden die einzelnen Mutanten und das GCDH-Wildtyp-Protein durch einen Myc-Antikörper immunpräzipitiert, über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert. Die Intensitäten der Banden wurden mittels Densitometrie ausgewertet und auf das GCDH-Wildtyp-Signal (100%) bezogen.

Es zeigte sich bei allen null Stunden-Werten (-) eine Doppelbande in Höhe von ~48 bzw. 44 kDa. Die 48 kDa-Bande entspricht dem Vorläuferprotein mit der integrierten mitochondrialen Signalsequenz, das im Mitochondrium zum reifen 44 kDa Polypeptid prozessiert wird. Nach 24 h hat die Prozessierung zum reifen GCDH-Protein bei allen untersuchten Proben stattgefunden. Nach densitometrischer Auswertung des Fluorogramms zeigte sich für fast alle Mutanten ein beschleunigter Proteinabbau. Der GCDH-Wildtyp zeigte nach 24 h 40-54% der anfänglichen Signalintensität, was mit vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe übereinstimmt (Keyser et al. 2008). Die **GCHD-Mutanten** p.Trp50Cys, p.Arg88Cys und p.Glu90Lys zeigten mit Signalintensitäten von 93%, 138% und 57% nach 24 h einen verlangsamten, bzw. mit dem GCDH-Wildtyp vergleichbaren Proteinabbau. Alle anderen GCDH-Mutanten zeigten einen moderat (p.Tyr113His, p.Tyr155His, p.Pro248Leu, p.Pro278Ser und p.Arg355His) bis stark (p.Arg94Leu, p.Gly101Arg, p.Cys115Tyr, p.Gly117Arg, p.Ser119Leu, p.Arg161Gln, p.Pro217Leu, p.Arg227Pro, p.Gly244Cys und p.Met263Val) beschleunigten Proteinabbau, der sich auf eine Reduktion des GCDH-spezifischen Signals nach 24 h von 10-26% (moderat) bzw. 0-9% (stark) bezieht.

Im Abschnitt 4.1 wurden 18 verschiedene Oberflächenmutationen hinsichtlich ihrer Expression, ihrer intrazellulären Translokation und ihres Synthese- bzw. Abbauverhaltens beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Mutationen in ihrer Expression zum Teil stark vermindert sind. In Bezug auf die intrazelluläre Lokalisation war für alle mutierten GCDH-Proteine eine Kolokalisation mit dem Mitochondrium zu beobachten. Die reduzierte Expression konnte dabei für die meisten Mutanten (p.Arg94Leu, p.Gly101Arg, p.Tyr113His, p.Cys115Tyr, p.Gly117Arg, p.Ser119Leu, p.Tyr155His, p.Arg161Gln, p.Pro217Leu, p.Arg227Pro, p.Gly244Cys, p.Pro248Leu, p.Met263Val, p.Pro278Ser und p.Arg355His) auf einen erhöhten intramitochondrialen Abbau zurückgeführt werden.

4.2 Identifizierung der am Abbau mutierter GCDH beteiligten Proteasen

Die GCDH ist ein kernkodiertes intramitochondriales Matrixprotein, das im Zytosol der Zelle synthetisiert und dann über eine Signalsequenz ins Mitochondrium transloziert wird (4.1.2). Wie in Abschnitt 4.1.4 gezeigt, können bestimmte Mutationen des GCDH-Proteins (p.Arg94Leu, p.Gly101Arg, p.Tyr113His, p.Cys115Tyr, p.Gly117Arg, p.Ser119Leu, p.Tyr155His, p.Arg161Gln, p.Pro217Leu, p.Arg227Pro, p.Gly244Cys, p.Pro248Leu, p.Met263Val, p.Pro278Ser und p.Arg355His) zu einem schnellen intramitochondrialen Abbau des Proteins beitragen. Zu diesen gehört auch die in Europa am häufigsten vorkommende Mutante p.Arg402Trp-GCDH, die eine Halblebenszeit von ~ 4 h im Vergleich zu ~ 34,5 h beim Wildtyp-Protein aufweist (Keyser et al. 2008).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der intramitochondriale Abbau mutanter GCDH, insbesondere der p.Arg402Trp-GCDH, weitergehend untersucht, um die am Abbau beteiligten Proteasen zu identifizieren. Das proteolytische System innerhalb des Mitochondriums ist Teil des "quality control"-Systems des Mitochondriums. Wie unter Kapitel 1.3 beschrieben, sind mehrere AAA⁺-Proteasen im Mitochondrium für diese Aufgabe zuständig. Als Hauptakteure für die Proteinqualitätskontrolle fehlgefalteter oder mutierter Proteine in der mitochondrialen Matrix gelten die Proteasen LONP1 und ClpXP. Im Kontrast zur LONP1 stellt ClpXP einen zusammengesetzten Komplex aus zwei unterschiedlichen Proteinen dar. CLPX agiert als Chaperon mit integrierter ATPase-Funktion, während CLPP die Serinprotease darstellt. Da der Schwerpunkt der im Folgenden beschriebenen Studien auf dem Abbauprozess mutanter GCDH lag, wurde für die Analyse dieses Prozesses die proteolytische Untereinheit CLPP des Proteinkomplexes ClpXP ausgewählt.

4.2.1 Etablierung des CLPP und LONP1-"knockdowns" in Hela-Zellen und Fibroblasten

Um spezifisch den Einfluss der Proteasen CLPP und LONP1 in Bezug auf den Abbau von Wildtyp- und mutierter GCDH zu beurteilen, sollte mittels RNA-Interferenz die Genexpression der beiden Proteasen herabreguliert und zeitgleich die Proteinexpression von Wildtyp- und mutierter GCDH analysiert werden. In Vorversuchen sollte dabei zunächst unabhängig von der Wildtyp- und mutanten GCDH-Expression die Effizienz der zu verwendeden siRNA für den "knockdown" von CLPP bzw. LONP1 auf mRNA und Proteinebene getestet werden.



Abb. 4.7 siRNA Interferenz-Vorversuche in HeLa-Zellen und Fibroblasten

(A) HeLa-Zellen wurden zweimal mit siRNA für CLPP oder LONP1 und als Negativkontrolle mit einer "non-targeting"-siRNA tansfiziert. Die HeLa-Zellen wurden bei der zweiten Transfektion mit der cDNA des GCDH-Wildtyps oder der Patientenmutation p.Arg402Trp kotransfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und mittels "Real Time"-PCR und Western Blot analysiert. (B) Die Fibroblasten wurden zweimal mit siRNA für CLPP oder LONP1 und als Negativkontrolle mit einer "non-targeting"-siRNA tansfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und mittels "Real Time"-PCR und Westernblot analysiert.

Für den "knockdown" von CLPP und LONP1 wurden vergleichend HeLa-Zellen und Fibroblasten verwendet. HeLa-Zellen, die im Vergleich zu Fibroblasten eine bessere Transfektionseffizienz aufweisen, wurden wie in Abb. 4.7-A beschrieben, 48 h nach der ersten CLPP bzw. LONP1 siRNA Transfektion ein zweites Mal mit siRNA und zeitgleich mit cDNA für Wildtyp- bzw. p.Arg402Trp-*GCDH* transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für "Realtime"-PCR bzw. Western Blot-Analyse geerntet. Als Kontrollen dienten HeLa-Zellen, die mit "non-targeting"-siRNA transfiziert wurden. Diese wurden zur Auswertung der Expression von CLPP und LONP1 gleich 100% gesetzt. Wie Abb. 4.8-A zeigt, reduzierte sich die mRNA-Expression von *CLPP* auf 11% in Wildtyp-*GCDH*-transfizierten HeLa-Zellen. Für *LONP1* konnte die mRNA-Expression auf 33% in Wildtyp-*GCDH*-transfizierten HeLa-Zellen reduziert werden. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ergab eine reduzierte Expression der CLPP in Wildtyp-*GCDH*-transfizierten HeLa-Zellen auf 35% und in den p.Arg402Trp-*GCDH*-transfizierten HeLa-Zellen auf 35% und in den p.Arg402Trp-*GCDH*-transfizierten

transfizierten HeLa-Zellen auf 30%. Die LONP1 Expression zeigte eine Reduktion in Wildtyp-*GCDH*-transfizierten HeLa-Zellen auf 30% und in p.Arg402Trp-*GCDH*-transfizierten HeLa-Zellen auf 37%.



Abb. 4.8 siRNA "knockdown" von CLPP und LONP1 in HeLa-Zellen

(A) In HeLa-Zellen wurden wie unter Abb. 4.7-A gezeigt mittels siRNA die mitochondrialen Proteasen CLPP und LONP1 herabreguliert. Als Negativkontrolle (NK) dienten HeLa-Zellen, die mit einer "nontargeting"-siRNA transfiziert wurden. Zusätzlich wurden die Zellen mit der cDNA für Wildtyp- bzw. p.Arg402Trp-*GCDH* transfiziert. Die Zellen wurden geerntet und RNA aus dem Zelllysat isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine "Realtime"-PCR mit spezifischen Primern für *CLPP* und *LONP1* durchgeführt. In der Auswertung wurden alle Werte auf die mRNA-Expression von Aktin normalisiert. Die Ergebnisse der Negativkontrolle wurden gleich 100% gesetzt und die Resultate der herabregulierten Zellen in Relation zur Negativkontrolle gestellt. (B) In HeLa-Zellen wurde wie oben beschrieben CLPP und LONP1 herabreguliert. Als Negativkontrolle dienten HeLa-Zellen, die mit einer "non-targeting"-siRNA transfiziert wurden. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Proteine extrahiert und Aliquots mit gleichen Proteinmengen (100 μ g) über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Expression wurde im Western Blot mit Protein-spezifischen Antikörpern (CLPP und LONP1) detektiert und densitometrisch ausgewertet. Die Intensitäten der Banden der CLPP-/LONP1-herabregulierten HeLa-Zellen wurden nach Normalisierung auf die Ladekontrolle auf das Signal der Negativkontrolle (100%) bezogen. Als Ladekontrolle fungierte β-Tubulin.

Für die Kontrollfibroblasten und Patientenfibroblasten, die die Mutation p.Arg402Trp tragen, konnte, wie in Abb. 4.7-B gezeigt, auf die Kotransfektion von Wildtyp- und

mutanter *GCDH* cDNA verzichtet werden. Der Versuchsaufbau war ansonsten dem der HeLa-Zellen entsprechend.



Abb. 4.9 siRNA "knockdown" von CLPP und LONP1 in humanen Fibroblasten

(A) In Fibroblasten wurden wie unter Abb. 4.7-B gezeigt mittels siRNA die mitochondrialen Proteasen CLPP und LONP1 herabreguliert. Als Negativkontrolle (NK) dienten Fibroblasten, die mit einer "nontargeting"-siRNA transfiziert wurden. Die Zellen wurden geerntet und RNA aus dem Zelllysat isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde eine "Realtime"-PCR durchgeführt mit spezifischen Primern für *CLPP* und *LONP1*. In der Auswertung wurden alle Werte auf die mRNA-Expression von Aktin normalisiert. Die Ergebnisse der Negativkontrolle wurden gleich 100% gesetzt und die Resultate der herabregulierten Zellen in Relation zur Negativkontrolle gestellt. (B) In Fibroblasten wurden wie oben beschrieben CLPP und LONP1 herabreguliert. Als Negativkontrolle dienten Fibroblasten, die mit einer "non-targeting"-siRNA transfiziert wurden. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Proteine extrahiert und Aliquots mit gleichen Proteinmengen (100 μ g) über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Expression wurde im Western Blot mit Protein-spezifischen Antikörpern (CLPP und LONP1) detektiert und densitometrisch ausgewertet. Die Intensitäten der Banden der CLPP-/LONP1herabregulierten Fibroblasten wurden nach Normalisierung auf die Ladekontrolle auf das Signal der Negativkontrolle (100%) bezogen. Als Ladekontrolle fungierte β-Tubulin.

Für die Fibroblasten konnten mit den HeLa-Zellen vergleichbare Werte erzielt werden. Die Transfektion mit der siRNA verringerte die mRNA-Expression von *CLPP* auf 7% in den Kontrollfibroblasten und 18% in Patientenfibroblasten. *LONP1* wies eine auf 15% in Kontrollfibroblasten und auf 26% in Patientenfibroblasten herabregulierte mRNA-Expression auf. Die densitometrische Auswertung der Western Blots ergab wiederum eine Verringerung der CLPP-Expression in Kontrollfibroblasten auf 50% und in den Patientenfibroblasten auf 35%. Für LONP1 konnte eine Reduktion der Expression in Kontrollfibroblasten auf 20% und in Patientenfibroblasten auf 10% beobachtet werden.

Im Vergleich von HeLa-Zellen und Fibroblasten lässt sich eine relativ gleichwertige Effizienz in der Herabregulation der einzelnen Proteasen beobachten. Die weiteren Experimente wurden mit den Fibroblasten fortgesetzt, da es sich hier im Vergleich zu den HeLa-Zellen um ein weniger artifizielles Zellmodell handelt. Um die Effektivität der siRNA-Transfektion zusätzlich zu steigern und somit die Expression der Proteasen weiter zu verringern, wurden in den folgenden Experimenten jeweils drei siRNA-Transfektionen durchgeführt (Abb. 4.10).



Abb. 4.10 siRNA interferenzversuch in Fibroblasten Kontroll- und Patientenfibroblasten wurden für weitere Versuche nach dem gezeigten Transfektionsschema dreimal mit siRNA für CLPP und LONP1 und einer "non-targeting"-siRNA als Negativkontrolle transfiziert und am sechsten Tag geerntet.

4.2.2 Effekt des CLPP- und LONP1-"knockdowns" auf die Expression von GCDH-WT und -p.Arg402Trp

Ziel der weitergehenden Untersuchung war es, den Effekt des "knockdowns" der Proteasen auf die Expression von Wildtyp- und mutanter GCDH zu bewerten. Die Proteine wurden hierfür aus dem Zelllysat aufgereinigt, im Anschluss über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot und entsprechender densitometrischer Auswertung analysiert.





(A) Die GCDH-Expression wurde sowohl unter LONP1-, als auch unter CLPP-Herabregulation untersucht. Als Negativkontrollen (NK) dienten Fibroblasten, die mit einer "non-targeting"-siRNA transfiziert wurden. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Proteine extrahiert und Aliquots mit gleichen Proteinmengen (100 μ g) über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt. Die Expression wurde im Western Blot mit einem GCDH-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle fungierte β -Tubulin. (B) Im Zuge der densitometrischen Auswertung wurden die Intensitäten der GCDH-Banden nach Normalisierung auf die Ladekontrolle jeweils auf das Signal der Negativkontrolle (100%) der Kontrollfibroblasten bezogen. (C) Die Effizienz des siRNA-"knockdowns" von CLPP und LONP1 wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern (CLPP, LONP1) analysiert. Als Ladekontrolle fungierte β -Tubulin. Signifikante Unterschiede wurden mittels One-Way-Anova, gefolgt vom "Dunnett's multiple comparisons test" ermittelt, * p<0,05, n=3.

Die Analyse der relativen GCDH-Expression ergab bei der Herabregulation von LONP1 eine signifikante Steigerung von ~ 127% in Kontrollfibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten, die unspezifisch mit "non-targeting"-siRNA transfiziert wurden. Für die Patientenfibroblasten ließ sich eine Steigerung der GCDH-

Proteinmenge bei spezifisch mit siRNA gegen LONP1-transfizierten Zellen im Vergleich zu unspezifisch transfizierten Zellen um 9% beobachten. Die mit siRNA gegen CLPP-transfizierten Kontrollfibroblasten zeigten eine Steigerung der relativen 8% verglichen mit den unspezifisch **GCDH-Expression** um transfizierten Kontrollfibroblasten. Die relative GCDH-Expression in den mit CLPP-transfizierten Patientenfibroblasten zeigte keinen Unterschied zu den unspezifisch transfizierten Patientenfibroblasten (Abb. 4.11-B). Die Herabregulation von CLPP und LONP1 wurde Western Blot analysiert. Die **CLPP-Expression** verringerte im sich in Kontrollfibroblasten auf $\sim 2\%$ und in den Patientenfibroblasten auf $\sim 17\%$ im Vergleich zu den jeweiligen Fibroblasten, die mit "non-targeting"-siRNA behandelt wurden. Für LONP1 zeigte sich in der Herabregulation eine Reduktion der Expression in den Kontrollfibroblasten auf ~ 7% und in den Patientenfibroblasten auf ~ 12% im Vergleich zu den jeweiligen Fibroblasten, die mit "non-targeting"-siRNA behandelt wurden (Abb. 4.11-C).

4.2.3 Stabilität der GCDH in siRNA-Interferenzversuchen

Um eine sensitivere Aussage bezüglich Expressionsveränderungen mutierter GCDH in siRNA-Interferenzversuchen tätigen zu können, wurden zusätzlich "Pulse-Chase"-Experimente durchgeführt, in denen das GCDH-Protein metabolisch radioaktiv markiert wurde. Dazu wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten nach dem unter Abb. 4.10 skizzierten Schema transfiziert. Am Tag nach der dritten Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde mit [³⁵S]-Methionin inkubiert und metabolisch markiert. Nach diesem "Pulse" wurde das radioaktive Medium durch nicht-radioaktives Medium ersetzt und die Zellen nach unterschiedlichen "Chase"-Zeiten geerntet (0 h/ 4 h/ 24 h). Folgend wurde GCDH immunpräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch analysiert.



Abb. 4.12 Stabilität der GCDH in siRNA-Interferenzversuchen

In einem "Pulse-Chase" Experiment wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten in einem einstündigen "Pulse" mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und entweder direkt (0 h) oder nach einem "Chase" von 4 h oder 24 h geerntet. Nachfolgend wurde GCDH immunpräzipitiert, über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und mit Hilfe von Fluorographie detektiert.

Es zeigte sich unter der Herabregulation von LONP1 in Kontrollfibroblasten ein Anstieg der GCDH-Expression beim 0 h- und 4 h-Wert sowie ein dezenterer Anstieg nach 24 h verglichen mit den "non-targeting"-siRNA transfizierten Fibroblasten. Bei den Patientenfibroblasten konnte für alle drei Zeitpunkte ein deutlicher Anstieg in der Expression des GCDH-Proteins im Vergleich mit den "non-targeting"-siRNA transfizierten Patientenfibroblasten beobachtet werden (Abb. 4.12-A). Im Gegensatz hierzu konnte sowohl in den Kontrollfibroblasten als auch in den Patientenfibroblasten kein Anstieg der GCDH-Expression zugunsten der CLPP-herabregulierten Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich vielmehr eine leichte Reduktion in der GCDH-Expression verglichen mit den "non-targeting"-siRNA transfizierten Fibroblasten (Abb. 4.12-B).

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine beschleunigte Degradation mutierter GCDH festgestellt werden konnte, wurde in Kapitel 4.2 dieser Abbauprozess anhand der Patientenmutation p.Arg402Trp näher untersucht. Die für diesen Schritt potenziell zuständigen Proteasen LONP1 und CLPP wurden mittels Literaturrecherche ausgesucht und explizit im Hinblick auf deren Rolle in diesem Prozess untersucht. Mit Hilfe spezifischer siRNA wurden die Proteasen in Fibroblasten effizient herabreguliert. Um den Effekt der jeweiligen Herabregulation der Proteasen auf die GCDH-Expression zu beurteilen, wurde in diesem Kontext das GCDH-Protein radioaktiv-metabolisch markiert und so dessen Expression über die Zeit analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass bei Herabregulation von LONP1 dem beschleunigten Abbau des mutanten p.Arg402Trp-GCDH-Proteins deutlich entgegengewirkt werden konnte.

5. Diskussion

5.1 Analyse pathogener GCDH-Oberflächenmutanten

Die Glutaryl-Coenzym A Dehydrogenase (GCDH) ist ein mitochondriales Matrixenzym. Bei einem Defekt des Enzyms durch eine Mutation im GCDH-Gen kommt es zur Glutarazidurie Typ 1 (GA1) mit einer Akkumulation der toxischen Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) in allen Körperflüssigkeiten und Geweben. Das klinische Bild der GA1 ist geprägt durch eine sich unterschiedlich stark manifestierende dyston-dyskinetische Bewegungsstörung bedingt durch degenerative Prozesse im ZNS, die v.a. das Striatum betreffen. Bei einem Großteil der Patienten werden die neurologischen Symptome durch eine enzephalopathische Krise meist während der ersten drei Lebensjahre getriggert. Es sind derzeit mehr als 150 verschiedene pathogene Mutationen im GCDH-Gen bekannt. Bislang ist es nicht gelungen, eine Korrelation zwischen dem vorliegenden Genotyp und dem klinischen Phänotyp herzustellen (Christensen et al. 2004). So beschreiben Busquets et al. mehrere "compound"-heterozygote Patienten mit dem Genotyp p.Val400Met/Arg227Pro, die stark unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen (Busquets et al. 2000). Ein Zusammenhang zwischen der GCDH-Restaktivität und der Metabolitausscheidung konnte festgestellt werden, jedoch ohne Korrelation zum individuellen klinischen Schweregrad der Erkrankung. Es wurden sowohl asymptomatische Patienten mit sehr geringer oder fehlender enzymatischer GCDH-Restaktivität und hoher GA-Ausscheidung beobachtet, wie auch schwer erkrankte Patienten, die eine GCDH-Restaktivität von 30% und geringe bis gar keine Ausscheidung von GA aufwiesen (Christensen et al. 1997).

Das funktionale GCDH-Protein ist als Homotetramer in der mitochondrialen Matrix aktiv. Jedes Monomer kann in drei Domänen mit einer spezifischen Sekundärstruktur unterteilt werden. Die aminoterminale Domäne besteht aus sechs α -Helices (Arg45-Glu172), in der Mitte befindet sich eine β -Faltblattstruktur (Leu173-Pro278) und carboxyterminal schließt sich wiederum eine vier α -Helices beinhaltende dritte Domäne (Gly279-Lys438) an. Jedes Monomer bindet am Übergang der β -Faltblattstruktur zur carboxyterminalen Domäne ein FAD-Molekül. In diesem Bereich der carboxyterminale Domäne ist zudem das aktive Zentrum mit der zentralen katalytischen Seitenkette Glu414 lokalisiert (Busquets et al. 2000, Fu et al. 2004). Entscheidend für die Tetramerisierung der GCDH ist die carboxyterminale Domäne, die auch an der Substrat- und FAD-Bindung wesentlich beteiligt ist (Westover et al. 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 18 an der Oberfläche des Proteins gelegene pathogene "missense"-Mutationen untersucht. Die ausgewählten Mutationen wurden mittels einer 3D-Strukturanalyse *in silico* (PyMOL® Software Version 1.5) identifiziert. Die gesuchten Mutationen sind an der Oberfläche des GCDH-Homotetramers lokalisiert und zeigen weder einen Einfluss auf die Tetramerisierung noch auf das aktive Zentrum. Gleiche Charakteristika wies die von Mühlhausen et al. (2003) identifizierte homozygote "missense"-Mutation p.Met263Val auf. Die an der Oberfläche lokalisierte Mutation führte trotz einer in Patientenfibroblasten gemessenen Restaktivität von 30% zu einem schweren klinischen Krankheitsverlauf.

Wie kann eine derartige Konfiguration der mutierten Aminosäurenreste zu einem schweren klinischen Phänotyp führen? Als erster experimenteller Ansatz, um weiterführende Erkenntnisse in Bezug auf die Pathogenität ausgewählter Mutationen zu erlangen, wurden die ausgesuchten Oberflächenmutanten zunächst hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisation, ihrer Expression und ihrer Stabilität analysiert.

Die GCDH ist ein kernkodiertes Protein, das im Zytosol an freien Ribosomen translatiert wird. Anhand einer spezifischen mitochondrialen Signalsequenz wird es zum Mitochondrium transportiert und über den TIM/TOM-Komplex in die Matrix transloziert (Chacinska et al. 2009). Dort wird das Präpeptid durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) in die mature Form prozessiert (Goodman et al. 1995). Anhand von Doppelimmunfluoreszenzanalysen zeigte sich für alle Mutanten eine Kolokalisation mit dem Mitochondrium (Abb. 5.1). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass alle untersuchten Mutationen somit keinen negativen Einfluss auf den Sortierungsprozess der GCDH ins Mitochondrium haben.

Erste morphologische Auffälligkeiten zeigte die Mutante p.Arg88Cys. Diese Mutante wies eine mit dem GCDH-Wildtyp vergleichbare Expression und Stabilität auf. Jedoch ließ sie als einzige eine spezielle, vom Wildtyp stark abweichende mitochondriale

57

Morphologie erkennen (Abb. 4.3). Inwiefern hierfür die Patientenmutation an Position 88 verantwortlich ist, sollte durch die Substitution unterschiedlicher Aminosäuren anstelle des Cysteins an Position 88 oder anstelle des Asparagins jeweils an den Positionen 87 und 89 weiter untersucht werden. Der jeweilige Austausch des Arginins an Position 87 und an Position 89 durch Alanin zeigte in der Immunfluoreszenz keine Besonderheiten. Dieses Ergebnis stellt die Bedeutung der Position 88 in den Vordergrund. Nun war anzunehmen, dass der Austausch von Aminosäuren mit vergleichbaren biochemischen Eigenschaften wie Cystein an der Position 88 die mitochondriale Struktur ähnlich verändern würde. Cystein ist eine hydrophobe Aminosäure mit einer schwefelhaltigen Seitenkette. Die Thiolgruppe ist v.a. wichtig zur Stabilisierung der Tertiärstruktur des Proteins durch die Ausbildung von Disulfidbrücken. Daher sind am häufigsten Cysteinreste innerhalb eines Proteins aufzufinden (Rose et al. 1985). Die ebenfalls hydrophoben Aminosäurenreste Alanin, Leucin und Methionin zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse in der Immunfluoreszenzanalyse. Die Substitution durch Alanin- und Methioninreste führte wie erwartet zu einer entsprechenden Veränderung der mitochondrialen Struktur, die hingegen bei der Mutante p.Arg88Leu nicht zu sehen war. Wird das Cystein durch die hydrophilen Aminosäurenreste Histidin oder Lysin ersetzt, zeigt erstere keine Veränderungen, wohingegen der intergrierte Lysinrest in der Immunfluoreszenz der p.Arg88Cys sehr ähnelt. Es ist zu konstatieren, dass die Position 88 wichtig für den Erhalt der korrekten mitochondrialen Struktur zu sein scheint. Die beobachtete strukturelle Veränderung kann jedoch keiner bestimmten biochemischen Eigenschaft der substituierenden Aminosäure zugeordnet werden.

Ähnlichkeit Aufgrund der der sich darstellenden Strukturen in den Immunfluoreszenzbildern mit dem intrazellulären Aktinskelett wurden in diesem Zusammenhang zusätzlich Experimente durchgeführt. In einem Latrunculinassay konnte die Hypothese, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen um das Aktinskelett handelt, widerlegt werden. Es zeigte sich keine Kolokalisation zwischen dem angefärbten Aktinskelett und dem GCDH-Signal in Wildtyp und p.Arg88Cysüberexprimierenden HeLa-Zellen. Zudem hatte die Inhibition der Aktinpolymerisierung keine Auswirkungen auf das GCDH-Signal in beiden Fällen. Weiterhin waren aber die spezifischen morphologischen Veränderungen zu erkennen. Eine andere mögliche Ursache könnte eine stark gesteigerte mitochondriale "fusion/fission"-Aktivität sein. Hierbei handelt es sich um einen Bestandteil des "quality control"-Systems des Mitochondriums (1.3). Dieses System hat zur Aufgabe, die Funktionsfähigkeit beteiligter Proteine und den fehlerfreien Ablauf der mitochondrialen Funktionen zu gewährleisten. Es reagiert auf unterschiedlichen Ebenen auf schädliche exogene und endogene Reize. Sind einzelne mitochondriale Abschnitte derartig geschädigt, dass sie ihrer Funktion nicht mehr nachkommen können, fusionieren diese mit anderen mitochondrialen Abschnitten, so dass der funktionstüchtige Teil den Schaden kompensiert. Alternativ können sie auch abgeschnürt und degradiert werden (Pernas et al. 2016, Youle et al. 2012). Vorstellbar ist in diesem Falle, dass es durch eine fehlerhafte Aggregation der Mutante p.Arg88Cys zu einer starken Aktivierung dieses Weges kommt. Erste durchgeführte Vorversuche, die in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt wurden, wiesen auf keine Beteiligung des "fusion/fission"-Apparates hin.

Die morphologischen Veränderungen konnten ebenso in elektronenmikroskopischen Untersuchungen dargestellt werden. Die p.Arg88Cys-Mutante zeigte in der Überexpression im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Veränderung in der mitochondrialen Ultrastruktur mit langen tubulären Formationen, bestehend aus sich stapelnden Cristae der inneren Membran (Schmiesing et al. 2017). Die äußeren Membranen waren teils rupturiert. Veränderungen in der Größe und Dichte der Mitochondrien proximaler Tubuluszellen wurden bereits in Experimenten mit GCDHdefizienten Mäusen unter induzierter metabolischer Krise beobachtet (Thies et al. 2013). Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu überprüfen, wie sich die Situation *in vivo* z.B. in Patientenfibroblasten homozygoter p.Arg88Cys GA1 Patienten darstellt. Dies wäre ein wichtiger Schritt, um Auswirkungen auf die endogene mitochondriale Morphologie zu analysieren und eventuelle Artefakte der Proteinüberexpression in den HeLa-Zellen auszuschließen.

Derartige Besonderheiten in der Morphologie, wie sie die p.Arg88Cys aufwies, konnten für keine weitere der untersuchten GCDH-Mutanten gezeigt werden. Wie erwähnt wurde neben der Struktur und intrazellulären Lokalisation zudem die Expression und Stabilität der einzelnen Mutanten analysiert. Hierbei zeigte sich, dass ein Großteil der untersuchten GCDH-Mutanten eine gegenüber dem Wildtypprotein verminderte Proteinmenge in transfizierten HeLa-Zellen aufweist. Hierzu zählen folgende Mutanten: p.Gly101Arg, p.Gly117Arg, p.Ser119Leu, p.Pro217Leu, p.Arg227Pro, p.Gly244Cys, p.Pro248Leu, p.Met263Val, p.Arg355His (Abb. 4.2). Die im Western Blot ermittelten "steady-state"-Proteinmengen können z.B. Folge eines gesteigerten Abbaus der mutierten GCDH sein. Um Hinweise auf die Ursache der reduzierten Proteinmenge zu erlangen, wurde im Anschluss an die Expressionsanalyse ein "Pulse-Chase"-Experiment durchgeführt. Hierbei zeigten die Mutanten p.Tyr113His, p.Tyr155His, p.Pro248Leu, p.Pro278Ser und p.Arg355His einen moderat und die Mutanten p.Arg94Leu, p.Gly101Arg, p.Cys115Tyr, p.Gly117Arg, p.Ser119Leu, p.Arg161Gln, p.Pro217Leu, p.Arg227Pro, p.Gly244Cys und p.Met263Val einen stark beschleunigten Proteinabbau nach 24 h im Vergleich zur Wildtyp-GCDH (Abb. 4.6). Eine derartige Instabilität mutierter Proteine aufgrund eines verstärkten Abbaus ist in der Literatur bereits für andere Krankheiten beschrieben (Maier et al. 2009, Muschol et al. 2004). Unklar sind jedoch zugrunde liegende Mechanismen. Die erhöhte Instabilität könnte durch strukturelle Veränderungen (Fehlfaltung) des Polypeptids, z.B. bedingt durch Änderungen der Polarität, erklärt werden (Busquets et al. 2000) (Strickler et al. 2006). In silicio Analysen der 18 an der Proteinoberflächen liegenden Mutation im 3-D Model zeigten zum Teil Veränderungen im Oberflächenpotential (Schmiesing et al. 2017). Um präzisere Aussagen zu strukturellen Veränderungen zu machen, wäre eine Kristallisation der einzelnen Mutanten anzustreben um die Raumstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen. Neben der rein strukturellen Aufklärung der Form und des Ausmaßes einer Fehlfaltung mutanter Proteine wären funktionelle Untersuchungen hilfreich. Analog zu den oben zitierten Arbeiten zu Auswirkungen von "missense"-Mutationen beim MCAD-Mangel und bei der PKU könnten die Thermostabilität und das Aggregationsverhalten mutanter GCDH untersucht werden. Insbesondere wären Analysen der spezifischen GCDH-Restaktivität der Mutanten weiterführend, also die Bestimmung der GCDH-Restaktivität pro mg aufgereinigtes, mutantes Protein, im Gegensatz zur üblichen Aktivitätsbestimmung pro mg Gesamt-Zellprotein, bei der nicht zwischen Effekten vorzeitiger Degradation und einer "echten" Aktivitätsminderung des exprimierten, mutanten Enzymes unterschieden werden kann. Leider sind zur Zeit derartige Aktivitätsmessungen technisch noch nicht möglich.

Oberflächen- mutanten	Proteinmenge, Differenz zum Wildtyp	Stabilität - Abbau	Lokalisation- intramitochondrial
p.Trp50Cys	+14%	unauffällig	√
p.Arg88Cys	+6%	unauffällig	√
p.Glu90Lys	-36%	unauffällig	√
p.Arg94Leu	-41%	stark仓	√
p.Gly101Arg	-85%***	stark①	√
p.Tyr113His	-45%	moderat℃	✓
p.Cys115Tyr	-29%	stark①	√
p.Gly117Arg	-72%*	stark仓	√
p.Ser119Leu	-84%***	stark仓	✓
p.Tyr155His	-40%	moderat℃	✓
p.Arg161Gln	-46%	stark仓	√
p.Pro217Leu	-47%*	stark仓	√
p.Arg227Pro	-60%**	stark仓	✓
p.Gly244Cys	-87%***	starkî	√
p.Pro248Leu	-64%***	moderat℃	√
p.Met263Val	-60%***	starkî	✓
p.Pro278Ser	-32%	moderat仓	✓
p.Arg355His	-69%***	moderat仓	✓

Abb. 5.1 Analyse der GCDH-Oberflächenmutanten

Ergebnisse der Expressionsanalyse, der Stabilität und der intrazellulären Lokalisation der untersuchten Oberflächenmutationen. Signifikante Unterschiede wurden mittels One-Way-Anova, gefolgt vom "Dunnett's multiple comparisons test" ermittelt, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Voruntersuchungen zum Oligomerisierungsverhalten der GCDH haben ergeben, dass GCDH zusätzlich zu Homo-Tetrameren auch heteromere Komplexe mit bislang unbekannten Interaktionspartnern bildet (Keyser et al. 2008). In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe war es gelungen, einige Interaktionspartner (u. a. die **Beta-Untereinheit** Elektronentransfer-Flavoproteins, ETFB. des sowie die Dihydrolipoamide S-succinyltransferase (DLST)) zu identifizieren (Schmiesing et al. 2014). den Ergebnissen wurde gefolgert, dass GCDH in einem Aus Multienzymkomplex organisiert ist, in dem unterschiedliche, sequentielle enzymatische Reaktionen abhängig von der Funktion des Gesamtkomplexes reguliert werden. Da sich die hier untersuchten Mutationen alle an der Oberfläche des GCDH-Polypeptids befinden, könnte der Austausch einzelner Aminosäuren auch zu Veränderungen in unterschiedlichen heteromeren Protein-Protein-Interaktionen führen, und so könnten letztlich auch Zusammensetzung und Funktion des postulierten Multienzymkomplexes betroffen sein. Erste Ergebnisse von durchgeführten Interaktionsstudien konnten die Hypothese bereits untermauern. Es zeigten sich bei einigen der Oberflächenmutanten ein verändertes bzw. gestörtes Homo-, wie auch Heterooligomerisierungsverhalten (Schmiesing et al. 2017).

Zusammenfassend konnte als Ursache der mutations-bedingt reduzierten Enzymaktivität bzw. reduzierten Proteinmenge ein vorzeitiger Abbau der meisten Mutanten nachgewiesen werden. Darüber hinaus ergeben sich aus Voruntersuchungen und den hier erhobenen Daten Hinweise, dass zusätzlich andere Faktoren, wie beispielsweise der Einfluss von Oberflächen-Mutationen auf das heteromere Interaktionsverhalten der GCDH, eine Rolle spielen müssen. Es bedarf weiterhin intensiver Forschung, um die komplizierten Zusammenhänge in der Pathogenese der GA1 zu ergründen. Die fehlende Korrelation zwischen dem Genotyp des erkrankten Kindes und dem klinischen Phänotyp stellen Kliniker/innen große vor Herausforderungen, da es nicht abzusehen ist, wie gravierend sich die Erkrankung beim Patienten niederschlägt. In dieser Arbeit konnten erste Schritte in der Charakterisierung an der GCDH-Oberfläche lokalisierter Patientenmutationen gemacht werden. Diese Informationen könnten für eine Datenbank genutzt werden, in der perspektivisch alle ihren **GCDH-Patientenmutationen** pathogenen mit biochemischen, molekularbiologischen und klinischen Charakteristika aufgelistet werden. Diese könnte ein nützliches Instrument darstellen, um das klinische Vorgehen individueller und effektiver zu gestalten. Zeigen gewisse Genotypen z.B. eine besonders schwere Reaktion auf eine katabole Krise, gilt es, von vornherein ein besonders enges Monitoring in den ersten Jahren zu gewährleisten und ein striktes Therapieregime konsequent umzusetzen. Mit der Integration der GA1 in das Neugeborenenscreening ist ein Grundstein in der Optimierung der Therapie der GA1 gelegt worden, da durch die direkte postnatale Selektion von Betroffenen ein frühzeitiger Therapiebeginn sichergestellt ist. Die dem Stoffwechsel-Screening zur Bestätigung der Diagnose folgende molekulargenetische Untersuchung des GCDH-Gens stellt zudem die Verbindung zu einer potenziellen Gendatenbank her.

Die GCDH ist ein in der Matrix des Mitochondriums aktives Enzym. Nur ein sehr geringer Teil der mitochondrialen Proteine wird im Mitochondrium selbst synthetisiert. Das mitochondriale Genom kodiert für 13 Proteine, die alle Bestandteile der Atmungskette darstellen. Die restlichen gewebeabhängig ~ 1000 mitochondrialen Proteine sind im Kern kodiert und werden im Zytosol an freien Ribosomen translatiert und über spezifische Signalsequenzen in das Mitochondrium transportiert (Calvo et al. 2016). Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte in dieser Arbeit, wie auch in früheren Publikationen, für etliche GCDH-Mutanten ein regulärer Transport ins Mitochondrium nachgewiesen werden (Keyser et al. 2008). Dies wird zudem durch die Beobachtung untermauert, dass in "Pulse-Chase"-Experimenten nach 24 h die durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase prozessierte reife Form des GCDH-Polypeptids gefunden wurde. Interessant ist dies v.a. im Zusammenhang mit den mutierten GCDH-Proteinen, die einem beschleunigten Abbau unterliegen. Demzufolge muss es sich bei dem gesteigerten Abbau um einen intramitochondrialen Prozess handeln. Das Mitochondrium ist in der Lage, mit Hilfe seines proteolytischen Systems fehlgefaltete Proteine in dem jeweiligen Kompartiment zu erkennen und zu degradieren. In der Matrix sind für diesen Prozess die AAA⁺ Proteasen LONP1 und ClpXP hauptverantwortlich, die somit potenzielle Kandidaten für den vorzeitigen Abbau mutierter GCDH darstellen (Quiros et al. 2015). In ersten Versuchsreihen wurde der Abbau mutierter GCDH am Beispiel der Mutante p.Arg402Trp im Detail untersucht. Dies ist die insgesamt am häufigsten vorkommende GCDH-Mutation, die 20% aller mutierten Allele in der kaukasischen Bevölkerung betrifft (Goodman et al. 1998). Die Mutante weist nur noch ~ 11% der Halblebenszeit der Wildtyp-GCDH auf und unterliegt weiterhin einer normalen Translokation ins Mitochondrium (Keyser et al. 2008).

In der Literatur sind bislang noch keine Arbeiten beschrieben, die die für den beschleunigten Abbau mutierter GCDH verantwortliche Protease identifizieren. Für die vorliegenden Studien wurden die beiden intramitochondrialen Matrixproteasen CLPP und LONP1 ausgewählt. Die Lon-Protease ist eine evolutionär stark konservierte Serinprotesase, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorzufinden ist. Sie ist u.a. entscheidend an der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle beteiligt (Goard et al. 2014). Vor allem scheint LONP1 als Effektor bei oxidativem Stress die Zelle bzw. das Mitochondrium vor der Akkumulation von geschädigten oxidierten Proteinen zu schützen (Bender et al. 2011). Die humane CLPP ist im Vergleich in der Literatur nur wenig beschrieben. Dies liegt auch daran, dass es im Gegensatz zur Lon-Protease keine homologe Protease in den Hefen der Laborstämme Saccharomyces cerevisiae und Saccharomyces pompe gibt und die meisten biochemischen Arbeiten dazu in Hefe durchgeführt wurden. Zwar zeigt die humane CLPP große Übereinstimmung mit dem bakteriellen Homolog und ist als proteolytische Untereinheit zusammen mit der chaperonartigen ATPase CLPX auch Teil eines heteromeren Proteinkomplexes. Jedoch weiß man, dass die humane ClpXP nicht die gleichen Substrate erkennt wie das ClpXP-System in E.coli (Yu et al. 2007). Die Substratspezifität ist von der ATPase CLPX abhängig, die sich in beiden Systemen unterscheidet (Kang et al. 2002). In Bakterien werden zur Degradierung vorgesehene Proteine durch spezifische Signalsequenzen, wie den SsrA-Tag, ähnlich dem zytosolischen Ubiquitin kovalent modifiziert und von der bakteriellen ClpX erkannt. Vergleichbare Modifikationen konnten bisher in Mitochondrien nicht gefunden werden. Wenngleich zurzeit daher wenig über die humane ClpXP bekannt ist, kann man dennoch aufgrund der Strukturähnlichkeit zu homologen Proteasen in anderen Modellorganismen, z.B. E.coli, auf mögliche Funktionen rückschließen. Diese beinhalten mitunter, wie bei LONP1, die Proteinqualitätskontrolle im Mitochondrium.

5.2.1 Herabregulation der Proteasen CLPP und LONP1 und die Auswirkung auf die GCDH-Expression

Um die Rollen der Proteasen CLPP, als proteolytische Untereinheit des ClpXP-Komplexes, und LONP1 beim Abbau mutierter GCDH weiter zu analysieren, wurden siRNA vermittelte "knockdown"-Experimente durchgeführt. In der Literatur sind unterschiedliche Beobachtungen beschrieben, wie die Zellen auf den "knockdown" von LONP1 reagieren. Es wird davon berichtet, dass die verringerte LONP1-Expression zu verminderter Zellteilung bis hin zum verfrühten Zelltod führen kann (Bota et al. 2005). Andere Ergebnisse weisen hingegen einen effizienten LONP1-"knockdown" für den
Beobachtungszeitraum von bis zu 14 Tagen auf (Kita et al. 2012, Lee et al. 2008). Für die in dieser Arbeit durchgeführten siRNA-Experimente wurde zunächst eine relativ kurze Versuchsdauer von 72 h angelegt. Diese wurde sukzessiv verlängert, so dass am Ende ein möglichst optimaler Versuchsaufbau mit einer effektiven Herabregulation der beiden Proteasen entwickelt werden konnte. Ergebnisse der ersten Western Blot-Analysen zeigten für CLPP keine wesentlichen Veränderungen in der GCDH-Expression. Die Herabregulation von LONP1 wies hingegen einen starken positiven Effekt auf die GCDH-Expression in den Kontrollzellen auf, der in geringerem Maße auch bei den Patientenzellen zu beobachten war. Der starke Anstieg der GCDH-Expression in den LONP1-herabregulierten Kontrollzellen kann derart interpretiert werden, dass diese Protease tatsächlich am Abbau der GCDH beteiligt ist. Kim et al. konnten Halblebenszeiten für mitochondriale Proteine in der Maus bestimmen, die von Stunden bis Monaten variieren (Kim et al. 2012). Jedes Protein hat seine individuelle Halblebenszeit und unterliegt dementsprechend einem konstanten Umsatz. Im Mitochondrium sind innerhalb des Intermembranraumes die mAAA- und iAAA-Proteasen und innerhalb der Matrix LONP1 und der ClpXP-Proteinkomplex für diese Aufgabe hauptverantwortlich zuständig (Quiros et al. 2015). Für den GCDH-Wildtyp konnte eine Halblebenszeit von ~34,5h beobachtet werden (Keyser et al. 2008). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass LONP1 im kontinuierlich stattfindenden Protein-"turnover" der GCDH innerhalb des Mitochondriums involviert ist. Der Unterschied zwischen den Kontroll- und Patientenfibroblasten könnte auf Probleme der Patientenzellen in der Zellkultur zurückzuführen sein. So waren die p.Arg402Trp-Patientenfibroblasten schwieriger zu kultivieren als die Kontrollzellen. Wichtig wäre hier, die Versuche erneut zu wiederholen, um Artefakte der Zellkultur auszuschließen und zusätzlich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen.

Im Verlauf der Studien wurde im Anschluss an den siRNA-"knockdown" eine "Pulse-Chase"-Analyse durchgeführt, um Auswirkungen auf die GCDH-Expression sensitiver und spezifischer bewerten zu können. Hierbei zeigte sich sowohl für die Kontroll- als auch für die p.Arg402Trp-Patientenfibroblasten eine eindeutige Steigerung der GCDH-Proteinmenge in den LONP1-"knockdown"-Zellen im Vergleich zu den mit der "nontargeting"-siRNA transfizierten Kontrollzellen. Fibroblasten, in denen CLPP herabreguliert wurde, wiesen auch in den "Pulse-Chase"-Experimenten keine ausgeprägte Veränderung in der GCDH-Proteinmenge auf. Zusammengefasst sprechen die in dieser Arbeit durchgeführten Studien LONP1 als verantwortliche Protease für den Abbau mutierter GCDH. Zu bedenken ist aber, dass die Versuche zunächst ausschließlich mit der p.Arg402Trp-Patientenmutation durchgeführt wurden. Sie ist die am weitesten verbreitete Mutation und zeigt einen extrem beschleunigten Abbau. Es wäre jedoch wichtig, diese Versuche mit anderen instabilen Patientenmutationen zu wiederholen. So kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein spezifisches Phänomen der p.Arg402Trp-Mutante handelt, und zudem ist es möglich die Ergebnisse in ihrer Reproduzierbarkeit zu validieren. Zusätzlich wäre vorstellbar, eine inaktive dominant-negative Mutante von LONP1 zu generieren. Es konnte für AAA⁺-Proteasen gezeigt werden, dass bei spezifischen Mutationen in der AAA⁺ Domäne die ATPase-Aktivität erlischt und es somit zu einem Funktionsverlust der Protease kommt (Ehses et 2009). Mit dieser dominant negativen Form könnten weitere GCDHal. Interaktionsversuche durchgeführt werden, um auf diese Weise über einen weiteren unabhängigen Weg die Rolle von LONP1 als GCDH-abbauende Protease zu untermauern.

Wie schon zuvor erwähnt, sind derzeit keine spezifischen Spaltmotive für LONP1 bekannt. Es ist davon auszugehen, dass die Protease nicht wie das zytosolische Proteasom ihre Substrate an speziellen Degradierungssequenzen erkennt. Wie für Pim1, den LONP1-Homolog aus Saccharomyces cerevisiae, als Serinproteasen mit Chymotrypsin-ähnlicher Spaltspezifität sind Spaltregionen mit hydrophoben Aminosäuren wahrscheinlich auch für LONP1 anzunehmen (Voos et al. 2013). Änderungen der Tertiärstruktur von oxidierten oder fehlgefalteten Proteinen führen z.T. zur Freilegung hydrophober, stark geladenener Areale. Diese scheinen LONP1 als Erkennungssignal zu dienen und so einen schrittweisen Substratabbau zu ermöglichen (Bota et al. 2002, Major et al. 2006). Andere Studien haben gezeigt, dass LONP1 auch selektiv Proteine degradiert, die sich nicht mehr in ihrer nativen Tetramerisierungsform präsentieren. Die mitochondriale Prozessierungspeptidase alpha (MPP-alpha) ist ein bekanntes Substrat von LONP1, das nur in ihrer monomeren Form von LONP1 degradiert wird. Zwar liegen die initial von LONP1 gespaltenen Sequenzen an der Oberfläche des Heterodimers, sie werden aber von der Protease nur dann zum Abbau erkannt, wenn die Alpha-Untereinheit getrennt von der Beta-Untereinheit der MPP

vorliegt (Ondrovicova et al. 2005). Ähnliches gilt für die Glutaminase C, von der angenommen wird, dass sie ebenso nur in ihrer monomeren Form von LONP1 abgebaut wird (Kita et al. 2012). Dies kann in der Struktur der Protease begründet sein. Durch die Ringstruktur mit dem aktiven Zentrum in ihrem Inneren dürfen die Substrate, wenn sie im gefalteten Zustand degradiert werden, eine bestimmte Größe nicht überschreiten. Es wird vermutet, dass, vermittelt durch die Bindung von ATP, es zu einer Konformationsänderung der Ringöffnung kommt und so Proteine in der Größenordnung der reifen MPP alpha (492 Aminosäuren und ~ 55 kDa) Zugang in das Innere der Protease finden (Ondrovicova et al. 2005). Für die in dieser Arbeit untersuchte GCDH-Patientenmutation p.Arg402Trp konnte gezeigt werden, dass diese ihre Fähigkeit tetramere Komplexe zu bilden, nahezu völlig verloren hat (Keyser et al. 2008). Da die reife GCDH mit 394 Aminosäuren und ~ 45 kDa sogar noch kleiner als die MPP alpha ist, ist ein vergleichbarer Mechanismus gut möglich. Dementsprechend würde LONP1 die mutierte GCDH in ihrer monomeren Form erkennen und folglich degradieren um zu vermeiden, dass toxische Aggregate im Mitochondrium entstehen.

Die potentielle Identifizierung der LONP1 als GCDH-abbauende Protease bietet erstmals Anknüpfungspunkte zur Entwicklung zukünftiger therapeutischer Strategien um den vorzeitigen Abbau von GCDH-Mutanten mit bestehenden Restaktivitäten zu modifizieren und somit den Verlauf der GA1 positiv zu beeinflussen.

6. Zusammenfassung

Bei der Glutarazidurie Typ 1 (GA1) akkumulieren, bedingt durch einen Defekt des mitochondrialen Matrixenzyms Glutaryl-Coenzym A -Dehydrogenase (GCDH), die toxischen Metabolite Glutarsäure (GA) und 3-Hydroxyglutarsäure (3OHGA) in Körperflüssigkeiten und Geweben. Bei GA1-Patienten kommt es während kataboler Stoffwechselsituationen zur krisenhaften neurotoxischen Degeneration des Striatums. Bis dato konnte keine Korrelation zwischen dem klinischen Phänotyp und dem vorliegenden Genotyp hergestellt werden. So zeigen Patientenmutationen mit Restaktivitäten von bis zu 30% durchaus schwerwiegende klinische Verläufe, wie z.B. die an der Oberfläche der GCDH lokalisierte homozygote Mutation p.Met263Val. Der Pathomechanismus ist bislang ungeklärt, vermutet wurden bislang Effekte oberflächlich lokalisierter Aminosäurenaustausche auf das Oligomerisierungsund Interaktionsverhalten der GCDH. Im ersten Teil der Arbeit wurden 18 ausgewählte pathogene Mutationen, die sich alle an der Oberfläche des GCDH-Proteins befinden, hinsichtlich ihrer Expression, intrazellulärer Lokalisation und ihrer Stabilität in der Zellkultur untersucht: a) Ein Großteil der GCDH-Mutanten zeigte, verglichen mit dem Wildtyp-Protein, eine verringerte Expression; b) Alle mutierten GCDH-Proteine wiesen eine Kolokalisation mit dem Mitochondrium auf; c) 15 der 18 untersuchten Mutanten zeigten einen beschleunigten intramitochondrialen Abbau als Ursache der unter a) beschriebenen reduzierten Proteinmenge.

In den Kolokalisationsstudien konnte bei der Mutante p.Arg88Cys in der Immunfluoreszenzanalyse zusätzlich eine tubuläre Variation der Struktur beobachtet werden. Diese scheint nach weitergehenden Analysen direkt mit Veränderungen an der Aminosäurenposition p.Arg88 verknüpft zu sein. Ein unmittelbarer Zusammenhang zu spezifischen Aminosäureresten konnte aber nicht gezeigt werden.

Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit war die Identifikation der am gesteigerten Abbau mutierter GCDH beteiligten Protease(n). Die hierfür als Kandidaten in Frage kommenden mitochondrialen Matrixproteasen LONP1 und CLPP wurden mittels siRNA-"knockdown" in Patienten- und Kontrollfibroblasten und nachfolgender metabolischer Markierung der GCDH in "Pulse-Chase"-Versuchen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die GCDH-Proteinmenge bei Herabregulation von LONP1 wesentlich anstieg. Diese Beobachtung liefert erstmalig Indizien für die am Abbauprozess beteiligte Protease und somit einen potenziell wertvollen Angriffspunkt für zukünftige therapeutische Strategien, um den vorzeitigem Abbau von GCDH-Mutanten mit bestehenden Restaktivitäten zu modifizieren.

7. Summary

The autosomal recessively inherited neurometabolic disorder glutaric aciduria type 1 (GA1) is caused by mutations in the gene encoding the mitochondrial matrix enzyme glutaryl-CoA dehydrogenase (GCHD). GCDH catalyses the oxidative decarboxylation of glutaryl-CoA in the degradation pathway of the amino acids lysine, hydroxylysine, and tryptophane. Deficiency of GCDH leads to the accumulation of the pathogenic dicarboxylates glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid in tissues and body fluids. GA1 patients are at risk of developing encephalopathic crises promoted by catabolic conditions such as infections, fever, diarrhoea or vomiting. A correlation between the genotype and the clinical phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency has not yet been identified. GCDH-mutations have been described with very high residual enzyme activity of up to 30%, leading to severe clinical features in patients, for instance irreversible destruction of striatal neurons with subsequent development of a dystonic / dyskinetic movement disorder. The GCDH-protein consists of four GCDH-monomers which build the active GCDH-homotetramer. Most patients displaying residual GCDHactivities ranging between 5 and 30% of healthy controls are hetero- or homozygous carriers of mutations which affect amino acid residues on the surface of the GCDHprotein. The underlying pathogenic mechanisms are still unknown.

In the first part of the thesis, 18 disease-causing GCDH-mutations affecting amino acid residues localised on the surface of the GCDH-protein were selected and analysed with respect to their effect on protein expression, intracellular sorting and protein stability.

More than half of the GCDH-myc surface mutants overexpressed in HeLa cells showed a significantly reduced steady state level in western blot analysis in comparison to the wild-type enzyme. To examine whether the disease-related mutations affect the correct sorting or localisation of GCDH into mitochondria, double-immunofluorescence stainings were performed in HeLa cells. Both wild-type and all mutant GCDH-myc completely co-localised with manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD - a mitochondrial marker protein). This indicates a correct targeting and import into mitochondria. The substitution of arginine 88 to cysteine led to a significantly changed mitochondrial morphology showing a tubular staining pattern. Other amino acid residues surrounding position 88 showed no comparable staining pattern, whereas alteration of residues on position 88 resulted in a similar staining pattern. This indicates that the position of the mutation residue is responsible for the development of the tubular staining. Pulse chase experiments with [³⁵S]-methionine labled GCDH-wild type and -mutant proteins with subsequent immunoprecipitation were performed to test whether the selected GCDH-mutants lead to a decreased stability and accelerated degradation of the mutant protein. The (large) majority of mutant proteins showed an increased degradation rate compared to the wild type protein. This data provides a first insight into the biochemical and molecular characteristics of pathogenic GCDH-surface mutations.

The second part of the thesis focused on the further analysis of the increased degradation, in particular the identification of the protease responsible for this process. Potential candidates are the mitochondrial matrix proteases LONP1 and CLLP, which play a decisive role in the protein quality control system of the mitochondria. The proteases were downregulated in patient and control fibroblasts via specific siRNA. The specific patient mutant p.Arg402Trp, the most common mutation among the Caucasian population, was selected for the knock down experiments since it shows a significantly reduced half life. Following the knock down experiments in control- and patient p.Arg402Trp-fibroblasts, the GCDH was metabolically labeled with [³⁵S]-methionine and analysed in pulse-chase experiments. As described above, the GCDH-wildtype and -mutant protein were immunprecipitated and further analysed via SDS-PAGE. The results showed a significant increase of the protein amount in the LONP1-downregulated cells. This gives first evidence to the responsible protease involved in the degradation of mutant GCDH-proteins.

8. Literaturverzeichnis

Amir, N., et al. (1987). "Glutaric aciduria type I: clinical heterogeneity and neuroradiologic features." <u>Neurology</u> **37**(10): 1654-1657.

Anikster, Y., et al. (1996). "Glutaric aciduria type I in the Arab and Jewish communities in Israel." <u>Am J Hum Genet</u> **59**(5): 1012-1018.

Baker, M. J., et al. (2011). "Quality control of mitochondrial proteostasis." <u>Cold Spring</u> <u>Harb Perspect Biol</u> **3**(7).

Baric, I., et al. (1999). "Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I." J Inherit Metab Dis **22**(8): 867-881.

Bayot, A., et al. (2010). "Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1." J Biol Chem **285**(15): 11445-11457.

Bender, T., et al. (2011). "Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease." <u>Mol Biol Cell</u> **22**(5): 541-554.

Bernardi, P., et al. (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." <u>Eur J Biochem</u> **264**(3): 687-701.

Biery, B. J., et al. (1996). "Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish." <u>Am J Hum Genet</u> **59**(5): 1006-1011.

Bjugstad, K. B., et al. (2000). "Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1." J Pediatr **137**(5): 681-686.

Bolender, N., et al. (2008). "Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins." <u>EMBO Rep</u> 9(1): 42-49.

Bota, D. A. and K. J. Davies (2002). "Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism." <u>Nat Cell Biol</u> **4**(9): 674-680.

Bota, D. A., et al. (2005). "Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death." Free Radic Biol Med **38**(5): 665-677.

Bross, P., et al. (2012). "Heterozygosity for an in-frame deletion causes glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in a patient detected by newborn screening: investigation of the effect of the mutant allele." J Inherit Metab Dis **35**(5): 787-796.

Busquets, C., et al. (2000). "Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct." <u>Pediatr Res</u> **48**(3): 315-322.

Busquets, C., et al. (2000). "Mutation analysis of the GCDH gene in Italian and Portuguese patients with glutaric aciduria type I." <u>Mol Genet Metab</u> **71**(3): 535-537.

Calvo, S. E., et al. (2016). "MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins." <u>Nucleic Acids Res</u> **44**(D1): D1251-1257.

Chace, D. H., et al. (2003). "Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns." Clin Chem 49(11): 1797-1817.

Chacinska, A., et al. (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." Cell **138**(4): 628-644.

Christensen, E., et al. (1997). "Compound heterozygosity in the glutaryl-CoA dehydrogenase gene with R227P mutation in one allele is associated with no or very low free glutarate excretion." J Inherit Metab Dis **20**(3): 383-386.

Christensen, E., et al. (2004). "Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis 27(6): 861-868.

Couce, M. L., et al. (2013). "Glutaric aciduria type I: outcome of patients with early-versus late-diagnosis." <u>Eur J Paediatr Neurol</u> **17**(4): 383-389.

DiMauro, S. and E. A. Schon (2003). "Mitochondrial respiratory-chain diseases." <u>N</u> Engl J Med **348**(26): 2656-2668.

Ehses, S., et al. (2009). "Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1." <u>J Cell Biol</u> **187**(7): 1023-1036.

Flynn, J. M., et al. (2003). "Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals." <u>Mol Cell</u> **11**(3): 671-683.

Fu, Z., et al. (2004). "Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions." <u>Biochemistry</u> **43**(30): 9674-9684.

Fukuda, R., et al. (2007). "HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells." <u>Cell</u> **129**(1): 111-122.

Gitiaux, C., et al. (2008). "Spectrum of movement disorders associated with glutaric aciduria type 1: a study of 16 patients." <u>Mov Disord</u> **23**(16): 2392-2397.

Goard, C. A. and A. D. Schimmer (2014). "Mitochondrial matrix proteases as novel therapeutic targets in malignancy." <u>Oncogene</u> **33**(21): 2690-2699.

Gomes, B., et al. (1981). "Mechanism of action of glutaryl-CoA and butyryl-CoA dehydrogenases. Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase." <u>Biochemistry</u> **20**(6): 1481-1490.

Goodman, S. I., et al. (1995). "Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in Escherichia coli." <u>Hum Mol Genet</u> **4**(9): 1493-1498.

Goodman, S. I., et al. (1975). "Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism." <u>Biochem Med</u> **12**(1): 12-21.

Goodman, S. I., et al. (1998). "Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations." <u>Hum Mutat</u> **12**(3): 141-144.

Greenberg, C. R., et al. (1994). "Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis." <u>Genomics</u> **21**(1): 289-290.

Greenberg, C. R., et al. (1995). "A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I." <u>Hum Mol Genet</u> 4(3): 493-495.

Guda, P., et al. (2007). "Reconstruction of pathways associated with amino acid metabolism in human mitochondria." <u>Genomics Proteomics Bioinformatics</u> **5**(3-4): 166-176.

Habelhah, H., et al. (2004). "Regulation of 2-oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase stability by the RING finger ubiquitin ligase Siah." J Biol Chem **279**(51): 53782-53788.

Harting, I., et al. (2009). "Dynamic changes of striatal and extrastriatal abnormalities in glutaric aciduria type I." <u>Brain</u> **132**(Pt 7): 1764-1782.

Haynes, C. M., et al. (2007). "ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in C. elegans." <u>Dev Cell</u> **13**(4): 467-480.

Hedlund, G. L., et al. (2006). "Glutaric acidemia type 1." <u>Am J Med Genet C Semin</u> <u>Med Genet</u> **142C**(2): 86-94.

Heringer, J., et al. (2010). "Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I." <u>Ann Neurol</u> **68**(5): 743-752.

Herrmann, J. M., et al. (1994). "Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA." J Cell Biol **127**(4): 893-902.

Hoffmann, G. F., et al. (1991). "Glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a distinct encephalopathy." <u>Pediatrics</u> **88**(6): 1194-1203.

Houten, S. M., et al. (2016). "The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation and Its Genetic Disorders." <u>Annu Rev Physiol</u> **78**: 23-44.

Jamiolkowski, D., et al. (2016). "Behavioural and emotional problems, intellectual impairment and health-related quality of life in patients with organic acidurias and urea cycle disorders." J Inherit Metab Dis **39**(2): 231-241.

Jones, P. M. and M. J. Bennett (2002). "The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry." <u>Clin Chim</u> <u>Acta</u> **324**(1-2): 121-128.

Kamate, M., et al. (2012). "Glutaric aciduria type I: A treatable neurometabolic disorder." <u>Ann Indian Acad Neurol</u> **15**(1): 31-34.

Kang, S. G., et al. (2002). "Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP." J Biol Chem **277**(23): 21095-21102.

Keyser, B., et al. (2008). "Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH)." <u>Hum</u> <u>Mol Genet</u> **17**(24): 3854-3863.

Kim, T. Y., et al. (2012). "Metabolic labeling reveals proteome dynamics of mouse mitochondria." <u>Mol Cell Proteomics</u> **11**(12): 1586-1594.

Kita, K., et al. (2012). "Diphenylarsinic acid promotes degradation of glutaminase C by mitochondrial Lon protease." J Biol Chem **287**(22): 18163-18172.

Kölker, S., et al. (2011). "Diagnosis and management of glutaric aciduria type I--revised recommendations." J Inherit Metab Dis **34**(3): 677-694.

Kölker, S., et al. (2006). "Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." <u>Pediatr Res</u> **59**(6): 840-847.

Kölker, S., et al. (2015). "The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype." J Inherit Metab Dis **38**(6): 1059-1074.

Koppen, M. and T. Langer (2007). "Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases." <u>Crit Rev Biochem Mol Biol</u> **42**(3): 221-242.

Kyllerman, M., et al. (2004). "Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1." <u>Eur J Paediatr Neurol</u> **8**(3): 121-129.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-685.

Lee, C. S., et al. (2013). "Promising outcomes in glutaric aciduria type I patients detected by newborn screening." <u>Metab Brain Dis</u> **28**(1): 61-67.

Lee, I. and C. K. Suzuki (2008). "Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease- lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1784**(5): 727-735.

Lenich, A. C. and S. I. Goodman (1986). "The purification and characterization of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase from porcine and human liver." J Biol Chem **261**(9): 4090-4096.

Lindner, M., et al. (2004). "Neonatal screening for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis 27(6): 851-859.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." <u>Methods</u> 25(4): 402-408.

Lu, B., et al. (2013). "Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease." Mol Cell 49(1): 121-132.

Lu, B., et al. (2007). "Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance." J Biol Chem **282**(24): 17363-17374.

Lupas, A., et al. (1997). "Self-compartmentalizing proteases." <u>Trends Biochem Sci</u> 22(10): 399-404.

Maier, E. M., et al. (2009). "Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening." <u>Hum Mol Genet</u> **18**(9): 1612-1623.

Maiuri, M. C., et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **8**(9): 741-752.

Major, T., et al. (2006). "Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease pim1." <u>Mol Cell Biol</u> 26(3): 762-776.

Morton, D. H., et al. (1991). "Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania." <u>Am J Med Genet</u> **41**(1): 89-95.

Mühlhausen, C., et al. (2003). "Severe phenotype despite high residual glutaryl-CoA dehydrogenase activity: a novel mutation in a Turkish patient with glutaric aciduria type I." J Inherit Metab Dis **26**(7): 713-714.

Mühlhausen, C., et al. (2004). "Maintenance treatment of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." J Inherit Metab Dis 27(6): 885-892.

Muschol, N., et al. (2004). "Transport, enzymatic activity, and stability of mutant sulfamidase (SGSH) identified in patients with mucopolysaccharidosis type III A." <u>Hum Mutat</u> **23**(6): 559-566.

Mushimoto, Y., et al. (2011). "Clinical and molecular investigation of 19 Japanese cases of glutaric acidemia type 1." <u>Mol Genet Metab</u> **102**(3): 343-348.

Neutzner, A., et al. (2007). "Outer mitochondrial membrane protein degradation by the proteasome." <u>Novartis Found Symp</u> **287**: 4-14; discussion 14-20.

Nunes, J., et al. (2013). "Brain MRI findings as an important diagnostic clue in glutaric aciduria type 1." <u>Neuroradiol J</u> **26**(2): 155-161.

Ogura, T. and A. J. Wilkinson (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function." <u>Genes Cells</u> 6(7): 575-597.

Ondrovicova, G., et al. (2005). "Cleavage site selection within a folded substrate by the ATP-dependent lon protease." J Biol Chem **280**(26): 25103-25110.

Pernas, L. and L. Scorrano (2016). "Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function." <u>Annu Rev Physiol</u> **78**: 505-531.

Pickart, C. M. and R. E. Cohen (2004). "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **5**(3): 177-187.

Quiros, P. M., et al. (2015). "New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **16**(6): 345-359.

Rao, K. S., et al. (2006). "Kinetic mechanism of glutaryl-CoA dehydrogenase." Biochemistry **45**(51): 15853-15861.

Rao, K. S., et al. (2007). "The effect of a Glu370Asp mutation in glutaryl-CoA dehydrogenase on proton transfer to the dienolate intermediate." <u>Biochemistry</u> 46(50): 14468-14477.

Rose, G. D., et al. (1985). "Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins." <u>Science</u> **229**(4716): 834-838.

Schmiesing, J., et al. (2017). "Disease-causing mutations affecting surface residues of mitochondrial glutaryl-CoA dehydrogenase impair stability, heteromeric complex formation and mitochondria architecture." <u>Hum Mol Genet</u> **26**(3): 538-551.

Schmiesing, J., et al. (2014). "Interaction of glutaric aciduria type 1-related glutaryl-CoA dehydrogenase with mitochondrial matrix proteins." <u>PLoS One</u> 9(2): e87715.

Schor, D. S., et al. (2002). "Quantification of 3-hydroxyglutaric acid in urine, plasma, cerebrospinal fluid and amniotic fluid by stable-isotope dilution negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **780**(1): 199-204.

Schwartz, M., et al. (1998). "The human glutaryl-CoA dehydrogenase gene: report of intronic sequences and of 13 novel mutations causing glutaric aciduria type I." <u>Hum</u> <u>Genet</u> **102**(4): 452-458.

Strauss, K. A., et al. (2003). "Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients." <u>Am J Med Genet C Semin Med Genet</u> **121C**(1): 38-52.

Strickler, S. S., et al. (2006). "Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship." <u>Biochemistry</u> **45**(9): 2761-2766.

Superti-Furga, A. and G. F. Hoffmann (1997). "Glutaric aciduria type 1 (glutaryl-CoA-dehydrogenase deficiency): advances and unanswered questions. Report from an international meeting." <u>Eur J Pediatr</u> **156**(11): 821-828.

Tatsuta, T. and T. Langer (2008). "Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing." <u>EMBO J</u> 27(2): 306-314.

Thies, B., et al. (2013). "Acute renal proximal tubule alterations during induced metabolic crises in a mouse model of glutaric aciduria type 1." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1832**(10): 1463-1472.

Twomey, E. L., et al. (2003). "Neuroimaging findings in glutaric aciduria type 1." <u>Pediatr Radiol</u> **33**(12): 823-830.

Viau, K., et al. (2012). "Glutaric acidemia type 1: outcomes before and after expanded newborn screening." <u>Molecular Genetics & Metabolism</u> **106**(4): 430-438.

Voos, W. and K. Rottgers (2002). "Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1592**(1): 51-62.

Voos, W., et al. (2013). "The role of AAA+ proteases in mitochondrial protein biogenesis, homeostasis and activity control." <u>Subcell Biochem</u> **66**: 223-263.

Wagner, I., et al. (1994). "Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria." <u>EMBO J</u> **13**(21): 5135-5145.

Wang, Q., et al. (2013). "Clinical and mutational spectra of 23 Chinese patients with glutaric aciduria type 1." <u>Brain Dev</u>.

Wen, P., et al. (2012). "[Analysis of clinical features and GCDH gene mutations in four patients with glutaric academia type I]." <u>Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi</u> **29**(6): 642-647.

Westover, J. B., et al. (2003). "Pathogenic mutations in the carboxyl-terminal domain of glutaryl-CoA dehydrogenase: effects on catalytic activity and the stability of the tetramer." Mol Genet Metab **79**(4): 245-256.

Youle, R. J. and A. M. van der Bliek (2012). "Mitochondrial fission, fusion, and stress." <u>Science</u> **337**(6098): 1062-1065.

Yu, A. Y. and W. A. Houry (2007). "ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases." <u>FEBS Lett</u> **581**(19): 3749-3757.

Zhao, Q., et al. (2002). "A mitochondrial specific stress response in mammalian cells." <u>EMBO J</u> **21**(17): 4411-4419.

Zschocke, J., et al. (2000). "Mutation analysis in glutaric aciduria type I." <u>J Med Genet</u> **37**(3): 177-181.

9. Anhang

9.1 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Schmiesing J, Lohmöller B, Schweizer M, Tidow H, Gersting S, Muntau A, Braulke T, Mühlhausen (2017). "Disease-causing mutations affecting surface residues of mitochondrial glutaryl-CoA dehydrogenase impair stability, heteromeric complex formation, and mitochondria architecture. " C HUM MOL GENET. 2017;26(3):538-551.

Lohmöller B, Braulke T, Mühlhausen, Schmiesing J (in prep.). "The mitochondrial matrix protein Glutaryl-CoA dehydrogenase is target of the ATP-dependent Lon protease."

Kongressbeiträge

- NDGKJ (Norddeutsche Gesellschaft f
 ür Kinder- und Jugendmedizin) Jahrestagung 03/2017 - Vortrag
- Retreat des Graduiertenkollegs 1459, Wismar 10/2013 Vortrag
- DGKJ (Deutsche Gesellschaft f
 ür Kinder- und Jugendmedizin) Jahrestagung, D
 üsseldorf 09/2013 - Poster
- Cell symposia; Mitochondria from Signaling to Disease, Lissabon 05/2013 -Poster

9.2 Lebenslauf

entfällt aus datenrechtlichen Gründen

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Chris Mühlhausen und Dr. rer. nat. Jessica Schmiesing für die Bereitstellung des spannenden Themas, die hervorragende Betreuung und die kritische Durchsicht meiner Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Jessica für Ihre großartige Unterstützung und für die tolle Zusammenarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Braulke möchte ich mich für die Betreuung und Förderung als Mentor im Rahmen des Mentoringprogramms bedanken.

Bei dem Graduiertenkolleg 1459 und Herrn Prof Thomas Braulke als Leiter bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und die exzellente wissenschaftliche Weiterbildung im Rahmen von Retreats, Seminaren und Kongressen.

Ein weiterer Dank gilt dem ganzen Team des "Braulke lab" für die harmonische und kollegiale Arbeitsatmosphäre, den regen Austausch und die Unterstützung bei den Problemen im Laboralltag.

Herzlichst möchte ich mich bei Hendrik und Helmut für die hilfreiche Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Zuletzt gilt ein großer Dank meiner Frau Helen für ihre Geduld und ihren Rückhalt.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: