

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-
Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. C. Klein

Untersuchungen zur Störung der Proteinfaltung und zur stabilisierenden Wirkung
niedermolekularer Verbindungen auf das Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Protein

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

vorgelegt von
Marcus Gertzen

aus
Paderborn

Jahr
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter: apl. Prof. Dr. med. Benedikt Schoser, FEAN

Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Søren W. Gersting

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | 3 |
| 1. EINLEITUNG | 5 |
| 1.1. NEUGEBORENENSCHREIBUNG | 5 |
| 1.2. DIE GLUTARAZIDURIE TYP 1 DURCH GLUTARYL-COA-DEHYDROGENASE MANGEL | 5 |
| 1.3. ENZYMATISCHE REAKTION UND STRUKTUR DER GLUTARYL-COA-DEHYDROGENASE | 7 |
| 1.4. STAND DER FORSCHUNG | 8 |
| 1.5. PROTEINFALTUNGSERKRANKUNGEN AM BEISPIEL DES ACADM-GENDEFEKTS | 9 |
| 2. ZIELE DER ARBEIT | 11 |
| 3. MATERIAL UND METHODEN | 12 |
| 3.1. MATERIALIEN | 12 |
| 3.1.1. CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL | 12 |
| 3.1.2. PUFFER | 13 |
| 3.1.3. VERWENDETE VEKTOREN | 13 |
| 3.1.4. MIKROORGANISMEN | 13 |
| 3.1.5. PROTEIN- UND DNA-MARKER | 14 |
| 3.1.6. VERWENDETE GERÄTE | 14 |
| 3.2. KULTIVIERUNG VON E. COLI | 15 |
| 3.2.1. MEDIEN UND FESTAGARPLATTEN | 15 |
| 3.2.2. GLYCERINKULTUREN | 15 |
| 3.3. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN | 15 |
| 3.3.1. ANZUCHT DER HAUPTKULTUREN VON GLUTARYL-COA-DEHYDROGENASE WILDTYP UND VARIANTEN SOWIE ZELLERNTEN | 15 |
| 3.3.2. LYSE DES BAKTERIENPELLETS MITTELS ULTRASCHALL | 16 |
| 3.3.3. LITHIUMDODECYLSULFAT (LDS)-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE) | 16 |
| 3.3.4. BLUE-NATIVE POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (BN-PAGE) | 16 |
| 3.3.5. COOMASSIE-FÄRBUNG | 17 |
| 3.3.6. WESTERNBLOT UND IMMUNDETEKTION | 17 |
| 3.4. ANALYTIK | 18 |
| 3.4.1. BESTIMMUNG VON KONZENTRATION UND REINHEIT DER DNA | 18 |
| 3.4.2. BESTIMMUNG DER OPTISCHEN DICHTEN EINER E. COLI KULTUR | 18 |
| 3.4.3. BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD | 18 |
| 3.4.4. AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE | 19 |
| 3.4.5. GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE (SIZE-EXCLUSION-CHROMATOGRAPHY, SEC) | 19 |
| 3.4.6. RIGHT-ANGLE LIGHT SCATTERING (RALS) | 20 |
| 3.4.7. DIFFERENTIAL SCANNING FLUORIMETRY (DSF) | 20 |
| 3.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 21 |
| 3.5.1. ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE – SITE DIRECTED MUTAGENESIS (SDM) DES GCDH-WILDTYPS | 21 |
| 3.5.2. LR-REAKTION | 22 |
| 3.5.3. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE | 24 |
| 3.5.4. CHEMISCHE TRANSFORMATION VON XL1-BLUE- UND BL21 (DE3)-ZELLEN | 24 |
| 3.5.5. ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA | 24 |
| 3.5.6. SEQUENZIERUNG DER PLASMIDE NACH SANGER | 25 |
| 3.6. ZELLKULTUR | 25 |
| 3.6.1. MEDIEN UND ANTIBIOTIKA | 25 |
| 3.6.2. TRANSFEKTION VON COS-7 ZELLEN | 25 |
| 3.6.3. ERNTE UND LYSE DER COS-7 ZELLEN | 26 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4. ERGEBNISSE | 27 |
| 4.1. ERMITTLUNG EINER KLINISCH UND BIOCHEMISCH-STRUKTURELL RELEVANTEN SERIE VON 14 GLUTARYL-COA-DEHYDROGENASE-MUTATIONEN | 27 |
| 4.2. REINIGUNG DER FUSIONSPROTEINE VON MBP-GCDH-WILDTYP UND 12 VARIANTEN AUS BL21(DE3) ZELLEN | 28 |
| 4.2.1. UNTERSUCHUNG DES OLIGOMERISIERUNGS- UND AGGREGATIONSVERHALTENS DER MBP-FUSIONSPROTEINE VON GCDH-WILDTYP UND 12 VARIANTEN NACH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE | 28 |
| 4.2.2. UNTERSUCHUNG DES OLIGOMERISIERUNGS- UND AGGREGATIONSVERHALTENS DER MBP-FUSIONSPROTEINE VON WILDTYP UND 14 VARIANTEN MITTELS GRÖBENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE | 30 |
| 4.3. UNTERSUCHUNG DES AGGREGATIONSVERHALTENS VON GEREINIGTEM MBP-GCDH-WILDTYP UND 8 GEREINIGTEN VARIANTEN MITTELS RALS | 33 |
| 4.3.1. ETABLIERUNG DES RALS-ASSAYS FÜR DEN GCDH-WILDTYP | 33 |
| 4.3.2. AGGREGATIONSVERHALTEN VON GCDH-WILDTYP UND GCDH-VARIANTEN | 34 |
| 4.4. UNTERSUCHUNG DER THERMISCHEN ENTFALTUNG VON GEREINIGTEM MBP-GCDH- WILDTYP UND 8 GEREINIGTEN GCDH-VARIANTEN | 36 |
| 4.4.1. ETABLIERUNG DES DSF-ASSAYS FÜR DEN GCDH-WILDTYP | 36 |
| 4.4.2. ANALYSE DER TEMPERATURABHÄNGIGEN ENTFALTUNG DER MBP-GCDH-VARIANTEN | 38 |
| 4.4.3. UNTERSUCHUNG DER NATIVEN FLUORESZENZ IM GRUNDZUSTAND VON WILDTYP UND VARIANTEN UND NACH ZUGABE VON FAD | 42 |
| 4.4.4. UNTERSUCHUNG DER THERMISCHEN ENTFALTUNG VON WILDTYP UND VARIANTEN NACH ZUGABE VON FAD | 43 |
| 4.5. KLONIERUNG DER EUKARYOTEN EXPRESSIONSKONSTRUKTE DES GCDH-WILDTYPS SOWIE VON 14 GCDH-VARIANTEN | 45 |
| 4.5.1. ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE ZUR GENERIERUNG VON 14 VARIANTEN GCDH EXPRESSIONSPASMIDEN ZUR ANALYSE DER EUKAROYTEN EXPRESSION | 45 |
| 4.5.2. LR-REKOMBINATIONSDIAGRAMM VON GCDH-WILDTYP UND VARIANTEN IN DEN ZIELVEKTOR PEF DEST51 | 46 |
| 4.6. UNTERSUCHUNG DES EXPRESSIONS-, AGGREGATIONS- UND OLIGOMERISIERUNGSVERHALTENS DES GCDH-WILDTYPS UND VON 14 GCDH-VARIANTEN IN COS-7-ZELLEN | 48 |
| 4.6.1. UNTERSUCHUNG DES EXPRESSIONSNIVEAUS VON GCDH-WILDTYP UND VON 14 GCDH-VARIANTEN IN COS-7-ZELLEN | 48 |
| 4.6.2. UNTERSUCHUNG DES AGGREGATIONS- UND OLIGOMERISIERUNGSVERHALTENS VON GCDH- WILDTYP UND VON 14 GCDH-VARIANTEN IN COS-7-ZELLEN | 50 |
| 4.7. VERGLEICH DES PRO- UND EUKARYOTEN EXPRESSIONS-, AGGREGATIONS- UND OLIGOMERISIERUNGS- VERHALTENS VON GCDH-WILDTYP UND VARIANTEN | 51 |
| 5. DISKUSSION | 54 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 64 |
| REFERENZEN | 65 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 76 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 77 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 78 |
| DANKSAGUNG | 79 |
| EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | 80 |

1. Einleitung

1.1. Neugeborenencreening

Ende des 20. Jahrhunderts konnte durch die Einführung der Tandemmassenspektrometrie ein länderübergreifendes, erweitertes Neugeborenencreening etabliert werden. Dies konnte die Prognose vieler Stoffwechselerkrankungen aufgrund einer früheren Detektion bei meist unauffälligem perinatalem Phänotyp und damit verbundenem früherem Therapiebeginn, deutlich verbessern (Parini *et al.*, 2011). In Industrienationen wie Deutschland, Großbritannien und der Schweiz beschränkt sich das Neugeborenencreening auf eine kleinere Anzahl von Erkrankungen. In Deutschland sind dies die 17 Erkrankungen konnatale Hypothyreose, das Adrenogenitale Syndrom, der Biotinidasemangel, die klassische Galaktosämie, die Phenylketonurie, die Tyrosinämie Typ 1, die Ahornsirupkrankheit, der Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-(MCAD)-Mangel, der Long-Chain-3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase- (LCHAD)-Mangel, der (Very-)Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-(VLCAD)-Mangel, der CPT I-Mangel, der CPT II-Mangel, der CACT-Mangel, die Isovalerialanazidämie, die Cystische Fibrose, der schwere kombinierte Immundefekt (SCID) und die Glutarazidurie Typ 1 (GA1) (Brockow *et al.*, 2019; Nennstiel *et al.*, 2019). In den USA hingegen ist das erweiterte Neugeborenencreening dezentral für jeden Staat organisiert und beinhaltet z. B. für den Staat New York laut Website des *Department of Health* (letzter Zugriff am 26.06.2020) 52 von der Norm abweichende biochemische Zustände. Kriterien für die Aufnahme einer Erkrankung in das Neugeborenencreeningprogramm sind unter anderem eine signifikante Inzidenz in der zu screenenden Population, eine klare Definition des klinischen und biochemischen Phänotyps, eine signifikante Morbidität und/oder Mortalität der unbehandelten Erkrankung, Behandelbarkeit und ein besseres Outcome bei Behandlung sowie eine sichere, einfache und suffizient sensitive Diagnostik mit einem spezifischen Bestätigungstest. Außerdem sollten Diagnostik, Therapie und Therapieergebnis kosteneffektiv im Vergleich zu einer nicht erfolgten Therapie sein (Scaturro *et al.*, 2013). Die Entnahme der Blutprobe, die zur Durchführung des Neugeborenencreenings notwendig ist, sollte nicht vor der 36. und nicht nach der 72. Lebensstunde erfolgen.

1.2. Die Glutarazidurie Typ 1 durch Glutaryl-CoA-Dehydrogenase Mangel

Die Glutarazidurie Typ 1 (OMIM #231670) ist eine angeborene, neurometabolische Erkrankung mit einer länderspezifischen Inzidenz von 1:30.000 bis 1:100.000 Neugeborenen pro Jahr. Die Erkrankung wird durch eine Defizienz an Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH, EC 1.3.99.7) hervorgerufen und durch homozygote oder compound-heterozygote Mutationen im *GCDH*-Gen (*GCDH*; 608801) auf Chromosom 19p13 verursacht (Kyllerman *et al.*, 1980; Hoffmann *et al.*, 1994; Lindner *et al.*, 2006). Aktuell wurden 235 pathogene Mutationen veröffentlicht und in der *Leiden Open Variation Database* gelistet (letzter Zugriff am 26.06.2020). Die GCDH ist Teil des Aminosäurekatabolismus von Lysin und Tryptophan. Ein Mangel an GCDH-Protein führt im Körper zu einer Akkumulation von Lysin, Tryptophan, Glutarsäure (GA), 3-Hydroxy Glutarsäure (3-OHGA) und Glutaryl-Carnitin. Klinisch ist perinatal in ca. 75 % der Fälle eine Makrozephalie das einzige Symptom der Erkrankung (Bjugstad *et al.*, 2000). Weitere Erstsymptome sind unspezifisch und bestehen vor allem in Hypotonie und Irritabilität (Baric *et al.*, 1998). Dennoch können selbst in diesem

weitgehend asymptomatischen Stadium bereits charakteristische Veränderungen, wie beispielsweise eine Affektion der Basalganglien, eine fronto-temporale Atrophie/Hypoplasie oder subdurale Hygrome mittels neuroradiologischer Bildgebung nachgewiesen werden (Neumaier-Probst *et al.*, 2004). Typischerweise folgt im symptomatischen Stadium im Rahmen einer unspezifischen Infektionserkrankung im Alter zwischen 6 - 18 Monaten eine akute enzephalopathische Krise mit epileptischen Anfällen sowie mit choreathetotischer Bewegungsstörung auf dem Boden einer striatalen Degeneration (Hedlund *et al.*, 2006). Allerdings wurde auch ein schleichender Beginn von Dystonien mit einer asymptomatischen Latenzphase ohne enzephalopathische Krise beobachtet und als sogenannter *insidious-onset* bezeichnet (Kölker *et al.*, 2015a). MR-morphologisch zeigen diese Patienten im Vergleich zu Betroffenen mit einer *a priori* enzephalopathischen Krisen eine limitierte Affektion des dorsolateralen Putamens. Allerdings konnte diese Verlaufsvariante teilweise mit einer eingeschränkten Therapieadhärenz in Verbindung gebracht werden und schloss eine enzephalopathische Krise im Verlauf der Erkrankung nicht aus (Boy *et al.*, 2019). Eine signifikante Anzahl der Patienten scheint eine Neigung zu subduralen und retinalen Hämorrhagien nach Minimaltraumata zu haben, weswegen es in der Vergangenheit zu polizeilichen Ermittlungen von Kindesmisshandlung kam (Strauss *et al.*, 2003a; Zielonka *et al.*, 2015). Unbehandelt entwickeln 90 % der Mutationsträger oben erwähnte enzephalopathische Krise, häufig begleitet von metabolischer Dekompensation mit Hyperammonämie und Hypoglykämie sowie hoher Morbidität und Mortalität (Baric *et al.*, 1998). In der Folge verlieren die Patienten sämtliche motorische Fähigkeiten (sitzen, stehen, laufen) und entwickeln eine schwere dyston-dyskinetische Bewegungsstörung. Bemerkenswerterweise bleiben die kognitiven Fähigkeiten der Patienten weitestgehend intakt (Boy *et al.*, 2015).

Bis heute besteht die Therapie in einer lysinarmen Diät und einer intensivmedizinischen Behandlung während kataboler Krisen (wie z. B. einer unspezifischen Infektionserkrankung). Außerdem erfolgt die Supplementierung von L-Carnitin, um die Ausscheidung organischer Säuren zu fördern (Boy *et al.*, 2017). Hierdurch können in 65 - 95 % der Fälle enzephalopathische Krisen vermieden werden. Ein negativer Einfluss auf die Entwicklung der Betroffenen (z. B. aufgrund des Fehlens von bestimmten Aminosäuren) ergab sich bei Betroffenen bis zum Alter von 6 Jahren nicht (Boy *et al.*, 2013). Nach Eintreten einer enzephalopathischen Krise und der Entwicklung des oben beschriebenen dystonisch-dyskinetischen Bewegungsbildes zeigte der Therapiebeginn mit einer lysinarmen Diät allenfalls diskrete Effekte, was die Bedeutung einer frühen Detektion von unerkannten Mutationsträgern mittels Neugeborenen-Screening vor allem bezüglich des neurologischen *outcomes* hervorhebt (Hoffmann *et al.*, 1991; Kölker *et al.*, 2006; Kölker *et al.*, 2011; Boy *et al.*, 2018). Interessanterweise konnte in der Vergangenheit eine Verbesserung biochemischer Parameter durch Supplementierung von Riboflavin, dem Vorläufer des GCDH-Kofaktors Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), gezeigt werden (Chalmers *et al.*, 2006). Allerdings besteht aktuell noch keine klare Evidenz für ein verbessertes neurologisches *outcome* der Patienten (Kölker *et al.*, 2011). Für eine initial hinsichtlich *outcome* vielversprechende Ergänzung der Diät mit Arginin (Kölker *et al.*, 2012), das im Mausmodell kompetitiv die zerebrale Aufnahme von Lysin inhibieren konnte (Sauer *et al.*, 2011), besteht zum aktuellen Zeitpunkt keine ausreichende Evidenz. Diät, intensivmedizinische Behandlung und Supplementierung mit L-Carnitin sind eher unspezifische Therapiestrategien und verhindern in circa 15 % der Fälle die schwerwiegenden neurologischen Symptome nicht (Kölker *et al.*, 2006; Kölker *et al.*, 2007). Außerdem besteht durch die Therapie keine verlässliche Vorhersage zur Prävention von späteren Langzeitkomplikationen (Tuncel *et al.*,

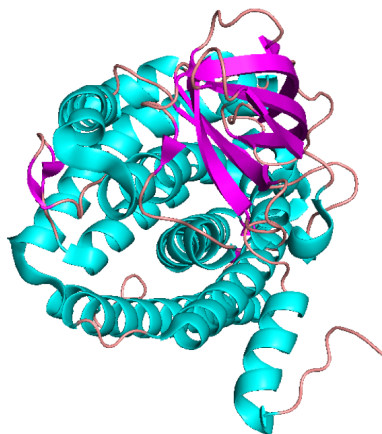
2018) betreffend anderer Organe, als dem zentralen Nervensystem. In diesem Kontext sind eine vorbeschriebene Beteiligung des peripheren Nervensystems (Herskovitz *et al.*, 2013), oder der Niere (Kölker *et al.*, 2015b) zu nennen. Darüber hinaus bedeuten eine lebenslange lysinarme Diät sowie regelmäßige intensivmedizinische Behandlungen einen hohen Verlust an Lebensqualität für die Patienten, weswegen ein tieferes Verständnis der Pathogenese der Erkrankung und des molekularen Phänotyps zur Entwicklung kausaler Therapiestrategien von hohem Interesse sind.

1.3. Enzymatische Reaktion und Struktur der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase

Die GCDH katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO₂ im Katabolismus von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan. Dem finalen und somit aktiven Enzym geht ein *precursor* Protein voraus, das aus 482 Aminosäuren besteht. Dieses wird in das Mitochondrium importiert und dort zum maturen Protein mit 438 Aminosäuren prozessiert. Die GCDH ist ein Homotetramer, welches ein nicht-kovalent gebundenes Flavin-Adenosin-Dinukleotid pro Monomer als Koenzym beinhaltet (Christensen *et al.*, 2004). Es hat eine atomare Masse von 192 kDa und kann als Dimer aus Dimeren gesehen werden. Jedes Monomer besteht aus 3 Domänen: einer N-terminalen Alpha-Domäne (α D_N, 45 - 172), einer mittleren Beta-Domäne (β D, 173 - 281) und einer C-terminalen Alpha-Domäne (α D_C, 282 - 438) (Fu *et al.*, 2004).

Struktur des GCDH-Enzyms

A)



B)

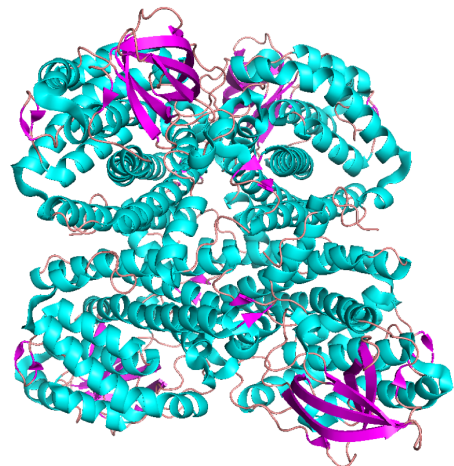


Abbildung 1: Struktur des GCDH-Monomers und Tetramers. GCDH-Monomer (A) mit einer atomaren Masse von 48 kDa. Die Beta-Faltblatt Domäne (pink) und die N- sowie C-terminalen Alpha-Domänen (beide türkis) sind farblich voneinander abgesetzt. GCDH-Tetramer (B) mit einer atomaren Masse von 192 kDa, das aus vier GCDH-Monomeren zusammengesetzt ist und als Dimer aus Dimeren beschrieben werden kann (Fu *et al.*, 2004).

1.4. Stand der Forschung

Obwohl die GA1 bereits 1975 erstmalig beschrieben wurde (Goodman *et al.*, 1975), ist die Pathogenese der Erkrankung bis heute nicht vollständig verstanden. Ein Erklärungsmodell ist die direkte Exotoxizität von GA und 3-OHGA, die einen Untergang neuronaler Zellen induziert. Dennoch sind beide Metabolite relativ milde Exotoxine, weswegen darüber hinausgehend die sekundäre Induktion von oxidativem Stress durch Exotoxizität und/oder die Beeinflussung des Energiestoffwechsels der Zelle als Ursache des neuronalen Zelluntergangs diskutiert werden (Jafari *et al.*, 2011). Es besteht die Hypothese, dass GA und 3-OHGA zwei essentielle anaplerotische Transportprozesse hemmen und so die neuronale Aufnahme sowie den astrozytischen Ausstrom von Succinat reduzieren, was folglich zu einer Unterbrechung des Tricarboxylsäure-Zyklus und so zu neuronalem Zelltod durch Energiemangel führt (Lamp *et al.*, 2011). Auch ein Zelltod von Astrozyten durch 3-OHGA mit daraus resultierender Glutamin-Synthetase-Defizienz und sekundärer Hyperammonämie, die zum Zelltod anderer Neurone führt, wurde in einem 3D *in vitro* Modell mit neuronalem Gewebe von Ratten beschrieben (Jafari *et al.*, 2013). Parallel kommt es zu einem Ungleichgewicht von Gamma-Amino-Buttersäure-(GABA)erger und glutamaterger Neurotransmission, was die oben beschriebenen epileptischen Anfälle erklären könnte. Zudem gelten GABAerge, striatale Neurone als besonders vulnerabel hinsichtlich Neurotoxinen (Kölker *et al.*, 2004). Eine andere Hypothese beschreibt den Zelltod von Astrozyten unter Glucosemangel, bei relevant erhöhten Konzentrationen von GA durch Inhibition der Glutamatdehydrogenase und somit der Glutaminolyse. Diese gilt unter Glucosemangel als relevanter Nebeneinstieg in den Tricarboxyl-Zyklus des Astrozyten. Die Folge ist das vollständige Erliegen des Tricarboxyl-Zyklus und somit der Zelltod (Komatsuzaki *et al.*, 2018). Darüber hinaus scheint 3-OHGA die pränatale Entwicklung von Gefäßen zu beeinträchtigen, was zu erhöhter Vulnerabilität von Endothelstrukturen und folglich vaskulärer Dysfunktion führt. Dies ist im Einklang mit den oben erwähnten neuroradiologisch detektierbaren Hygromen, die bereits im präsymptomatischen Stadium der Erkrankung zu beobachten sind (Mühlhausen *et al.*, 2004). Zudem konnte im Mausmodell anhand von Neuronenaggregaten von *GCDH* $-/-$ Mäusen in zwei Altersstufen (neonatal und frühkindlich) unter metabolischem Stress von 10 mM L-Lysin - analog zum Erkrankungsbild der GA1 – erhöhte Werte für GA und 3-OHGA erhoben werden. Hierunter konnte zudem eine Erhöhung von Ammonium in den neonatalen Media, morphologische Veränderungen von Zellaggregaten sowie eine Reduktion von Chemokinen detektiert werden, was als möglicher Beitrag für den Neuronenschaden von GA1 Patienten gewertet wurde (Cudré-Cung *et al.*, 2019). Schmiesing *et al.* konnten eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität, der Protein-Protein-Interaktion und der Stabilität von mitochondrialen Enzymen bei Protein-Glutarylisierung im Mausmodell nachweisen (Schmiesing *et al.*, 2018). Bei dem Vorgang der Glytarylisierung handelt es sich um eine nicht-enzymatische, posttranslationale Modifikation von Proteinen, die beim Vorliegen eines Überschusses an Glutaryl-CoA erfolgt, wie es im Falle der GA1 zu beobachten ist (Tan *et al.*, 2014). Seminotti *et al.* konnten eine Störung der Energie- und Redoxhomöostase in striatalen Neuronen von *GCDH* $-/-$ Mäusen unter inflammatorischen Bedingungen, induziert durch Chinolinsäure und einer lysinreichen Kost darstellen (Seminotti *et al.*, 2016). Andere Mausmodelle konzentrierten sich auf die *stroke-like* Symptomatik der Erkrankung im Zuge der striatalen Nekrose. Applikation von 3-Nitropropionsäure (NPA) führte hierbei zu einem abrupten Zusammenbrechen der Blut-Hirn-Schranke, zu einer Endothel- und Astrozytenschwellung mit Lumenverkleinerung und somit zu sekundären Mikrothromben. Die Folgen waren oxidativer Stress und eine lokal

entzündliche Reaktion, was zu einer Schädigung ausschließlich maturierenden, neuronalen Gewebes führte, wobei 3-OHGA als das relevante Zytotoxin angesehen wurde. Das Ausmaß der striatalen Schädigung glich demjenigen der GA1 weitgehend. Allerdings gaben die Autoren als Limitierung der Studie den spekulativen Charakter dieses Ansatzes sowie bisher unbekannte Wechselwirkungen *in vivo* an (Strauss *et al.*, 2003a). Obwohl auch die Störung von Interaktionen mit anderen mitochondrialen Matrixproteinen wie der Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase (DLST) und der Beta-Untereinheit des Elektron-Transfer-Flavoproteins (ETF_B) mit Beeinflussung der mitochondrialen Architektur diskutiert werden (Schmiesing *et al.*, 2014; Schmiesing *et al.*, 2017), scheint darüber hinaus Proteinfaltung und die Beeinträchtigung der Tertiärstruktur des Proteins durch *missense* Mutationen eine Rolle in der Krankheitsentstehung der GA1 zu spielen (Keyser *et al.*, 2008).

1.5. Proteinfaltungserkrankungen am Beispiel des *ACADM*-Gendefekts

Der Medium-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MCADD, MIM #201450) wird hervorgerufen durch Mutationen im *ACADM*-Gen (MIM #607008). Die Erkrankung führt zu einem Defekt der mitochondrialen Beta-Oxidation von Fettsäuren und hat eine Prävalenz zwischen 1 : 8.380 (Rocha *et al.*, 2014) und 1 : 14.000 (Kennedy *et al.*, 2010). Die Patienten kommen asymptotisch zur Welt, jedoch weisen sie während kataboler Krisen und Perioden der Nahrungskarenz ein hohes Risiko für die Entwicklung hypoketotischer Hypoglykämien, epileptischer Anfälle und hepatischer Dysfunktion auf, was zu Koma und Versterben der Patienten führen kann (Gregersen *et al.*, 2004). Aktuell wird die Erkrankung durch das Neugeborenenenscreening mittels Tandem-Massenspektrometrie frühzeitig detektiert. Falls diese jedoch nicht verfügbar ist (wie z. B. in bestimmten Entwicklungsländern) ist der MCAD-Mangel aufgrund der zunächst diskreten klinischen Symptomatik in bis zu 25 % der Fälle letal (Wilcken *et al.*, 1994). Die Familien der Patienten werden instruiert, Phasen der längeren Nahrungskarenz zu vermeiden und bei intermittierender Erkrankung ein Krankenhaus zur Glukoseinfusion aufzusuchen (Yusupov *et al.*, 2010).

Strukturell handelt es sich bei der MCAD um ein homotetrameres Protein, das aus drei strukturellen Domänen, einer N-terminalen Alpha-Domäne, einer mittleren Beta-Domäne sowie einer C-terminalen Alpha-Domäne besteht (Kim *et al.*, 1993). In der Familie der Fettsäuren Acyl-CoA Dehydrogenasen zeigt das MCAD-Enzym ein relativ weites Spektrum an Substratbindung mit der höchsten Affinität zu Octanoyl-CoA und verwendet FAD als katalytischen Redoxfaktor (Kim *et al.*, 2004). Das MCAD-Enzym weist eine hohe Homologie und strukturelle Ähnlichkeit mit dem GCDH-Protein auf. Darüber hinaus konnte für das MCAD-Protein mutationsinduzierte Proteinfehlfaltung gezeigt werden, wobei der molekulare Phänotyp abhängig von der strukturellen Region ist, in der die betreffende *missense* Mutation lokalisiert ist (Maier *et al.*, 2009). Interessanterweise führen Mutationen im *ACADM*-Gen zu thermischer Instabilität und *loss-of-function* des Proteins. Dies erklärt den lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf während Fieberepisoden, der auch bei Patienten mit GA1 zu beobachten ist. Somit konnte der MCADD der Klasse der sogenannten Proteinfaltungserkrankungen zugeordnet werden, bei denen *missense* Mutationen zu einem Funktionsverlust des betreffenden Proteins führen (Maier *et al.*, 2009; Jank *et al.*, 2014). Für diese weiterhin wachsende Klasse von Erkrankungen, in die unter anderem auch die Phenylketonurie (Gersting *et al.*, 2008) und die familiäre Amyloid-Polyneuropathie einzuordnen sind (Hammarström *et al.*, 2003), konnte in der Vergangenheit die Möglichkeit

der Therapieergänzung mittels pharmakologischer Chaperone beschrieben werden. Pharmakologische Chaperone binden spezifisch fehlgefaltetes Protein, fördern dessen konformelle Stabilisierung und verhindern hierdurch die vorzeitige Degradation. Hierdurch kommt es zu einer Erhöhung der funktionellen intrazellulären Proteinkonzentration (Muntau *et al.*, 2014). Inzwischen konnten bereits drei pharmakologische Chaperone als Therapeutikum zugelassen werden; für die Behandlung der Phenylketonurie steht seit 2008 Sapropterin-Dihydrochlorid zur Verfügung (Somaraju *et al.*, 2015), für die familiäre Amyloid-Polyneuropathie wird Tafamidis als pharmakologisches Chaperon eingesetzt (Coelho *et al.*, 2013) und seit Mai 2016 ist europaweit Migalastat zur Therapie der lysosomalen Speicherkrankheit Morbus Fabry (Germain *et al.*, 2016) zugelassen. Für den MCADD existiert aktuell kein klinisch zugelassenes pharmakologisches Chaperon, allerdings wird FAD als Kandidat diskutiert (Nasser *et al.*, 2004), was aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der GCDH mit dem MCAD-Enzym auch für die GA1 von hohem Interesse ist.

2. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Prüfung der Hypothese, ob es sich bei der GA1 um eine Proteinfaltungserkrankung handelt und ob sich hieraus ein therapeutischer Ansatz im Sinne einer Korrektur der Proteinfehlfaltung mittels pharmakologischen Chaperonen ergibt. Hierfür wurden im Rahmen der Promotionsarbeit verschiedene Methoden etabliert, mit welchen das GCDH-Protein analysiert werden sollte. Hierbei handelt es sich um Größenausschlusschromatographie (SEC), differential scanning fluometry (DSF), Flavin Adenin Dinukleotid (FAD) Fluoreszenz, right-angle light scattering (RALS) und blue-native PAGE. Dieses Methodenspektrum ermöglichte eine tiefgehende Charakterisierung von vierzehn (missense-induzierten) GCDH-Varianten, um die Fragen zu beantworten (i) ob Mutationen im GCDH-Gen Proteinfehlfaltung und Proteininstabilität induzieren (ii) welchen Einfluss Proteinvarianten auf die Schwere der Erkrankung haben und (iii) ob die vierzehn Varianten durch ihren natürlichen Kofaktor FAD stabilisiert werden könnten. Die Beantwortung dieser drei Fragen würde ein tieferes Verständnis des Pathomechanismus der GA1 ermöglichen, woraus langfristig ein neuer kausaler therapeutischer Ansatz der Erkrankung abgeleitet werden könnte.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel

| Produkt | Hersteller |
|-------------------------------------------------------------|----------------------|
| Agarose, Electrophoresis Grade | Biozym |
| Amersham™ Hybond™ p 0.45 PVDF | GE Healthcare |
| Amersham™ Protran™ Supported 0.45 µm NC | GE Healthcare |
| Amicon® Ultra Centrifugal Filters | Merck |
| Ampicillin (gelöst in 50 % Ethanol) | Serva |
| Antioxidant NuPAGE® | Invitrogen |
| Aqua bidest | Apotheke der LMU |
| Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate | Bio-Rad |
| Bovine Gamma Globulin (BGG) Standard Set | Bio-Rad Laboratories |
| Chloramphenicol (gelöst in Aqua bidest.) | Sigma-Aldrich |
| <i>Complete-Mini EDTA-free</i> | Roche AG |
| <i>Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution</i> | Bio-Rad Laboratories |
| DTT | Fluka |
| Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) | Merck |
| Ethanol | Apotheke der LMU |
| Essigsäure | Apotheke der LMU |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH |
| Glycerin 10 % | Apotheke der LMU |
| Glucose | Braun |
| Gel loading solution | Sigma-Aldrich |
| HCl | Apotheke der LMU |
| Hefeextrakt | Oxoid |
| Hepes Natriumsalz | Sigma-Aldrich |
| IPTG | Fermentas |
| Kaliumhydrogenphosphat (KHPO ₄) | Merck |
| Maltose | Serva |
| Methanol | Apotheke der LMU |
| NaCl Salz | Merck |
| <i>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)</i> | Invitrogen |
| <i>NuPAGE® MOPS LDS Running Buffer (20x)</i> | Invitrogen |
| <i>NativePAGE™ Sample Buffer (4x)</i> | Invitrogen |
| <i>NativePAGE™ Running Buffer (20x)</i> | Invitrogen |
| <i>NativePAGE™ Cathode Buffer (20x)</i> | Invitrogen |
| <i>Dulbecco's PBS (1x)</i> | PAA |
| Protein Assay-Farbstoffkonzentrat | Bio-Rad Laboratories |
| <i>QIAprep spin Miniprep Kit (250)</i> | Qiagen |
| Riboflavin | Sigma-Aldrich |
| <i>Sample Reducing Agent NuPAGE (10x)</i> | Invitrogen |
| <i>SYPRO® orange protein gel stain</i> | Invitrogen |
| Trypton | Oxoid |

| | |
|------------------------------------------|------------|
| 4-12 % NuPAGE® Bis-Tris-Gele 20 well | Invitrogen |
| 4-16 % NativePAGE™ Bis-Tris-Gele 10 well | Invitrogen |

3.1.2. Puffer

| Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kaliumphosphatpuffer | 10 mM Kaliumphosphat, pH: 7,0 1 mM DTT aqua bidest |
| Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin | 10 mM Kaliumphosphat, pH: 7,0 1 mM DTT 10 % Glycerin aqua bidest |
| Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin und Maltose | 10 mM Kaliumphosphat, pH: 7,0 1 mM DTT 10 % Glycerin 10 mM Maltose aqua bidest |
| HEPES Puffer | 20 mM Hepes, pH: 7,0 0,2 M NaCl aqua bidest |

3.1.3. Verwendete Vektoren

| Vektor | Codierte Resistenz | Größe | Hersteller |
|---------------|--------------------|----------|---------------------|
| pMal-c2X DEST | Ampicillin | 6,646 kb | New England Biolabs |
| pEF DEST51 | Ampicillin | 7,5 kb | Invitrogen |

3.1.4. Mikroorganismen

| Stamm | Hersteller |
|---------------------------|------------|
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | Stratagene |
| <i>E. coli</i> DH5α | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | Stratagene |

3.1.5. Protein- und DNA-Marker

| Produkt | Hersteller |
|-----------------------------------------------|------------|
| <i>1 kb DNA Ladder</i> | Invitrogen |
| <i>PAGE-Ruler prestained protein standard</i> | Fermentas |
| <i>NativeMark unstained protein standard</i> | Invitrogen |

3.1.6. Verwendete Geräte

| Gerät | Handelsname | Hersteller |
|------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Chromatographiesäulen | HiLoad 16/60 Superdex 200 high load | GE Healthcare |
| | MBPTrap HP | GE Healthcare |
| Chemilumineszenz Messgerät | Diana | Raytest |
| Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät | FLUOStar Optima | BMG Labtech GmbH |
| Fluoreszenz-Spektrophotometer | CARY Eclipse | Varian, Agilent Technologies |
| FPLC-System | ÄKTApurifier | GE Healthcare |
| Küvettenhalter | Peltier-Thermostatted Holder | Multicell Varian, Agilent Technologies |
| Küvettschleuder | KS 8 CE | IST |
| Laborschüttler | Vortex-Genie | Bender & Hobein AG |
| | VF2 | IKA Labortechnik |
| Magnetrührer | Variomag Monotherm | Thermo Scientific |
| | Ikamag RCT | IKA Labortechnik |
| pH-Meter | qpH 70 | VWR International |
| Präzisionswaage | Sartorius Extend | Sartorius |
| Schüttelinkubator | Excella E 24 Incubator Shaker System | New Brunswick Scientific |
| Sonifiziergerät | Branson Digital Cell Disruptor | Branson, Emerson Industrial Automation |
| Spektrophotometer | Ultrospec 1000 UV/ Visible Spectrophotometer | Pharmacia Biotech |
| | Nano Drop ND 1000 | Thermo Scientific |
| Thermocycler | Mastercycler personal | Eppendorf |
| | 7900 HT Fast Real-Time PCR System | Applied Biosystems |

| | | |
|-----------------|-------------------|-------------------|
| Tischzentrifuge | Centrifuge 5415 D | Eppendorf |
| | Centrifuge 5417 R | Eppendorf |
| | Galaxy Mini | VWR International |
| Zentrifuge | Rotana 460 R | Hettich |
| | Avanti | Beckman Coulter |

3.2. Kultivierung von *E. coli*

3.2.1. Medien und Festagarplatten

Zur Anzucht der Bakterien wurde ein modifiziertes LB Medium hergestellt, das 16 g/l Trypton, 5 g/l Hefe und 2,5 g/l K_2HPO_4 enthielt, mit Aqua bidest (Reagenzien siehe 4.1.1) auf einen Liter aufgefüllt und anschließend autoklaviert wurde.

Festagar wurde durch Autoklavieren von 1 Liter des oben angegebenen modifizierten LB Mediums zusammen mit 20 g Agar und anschließender Zugabe von Ampicillin nach Abkühlung unter 60 °C (finale Konzentration von 100 µg/ml) hergestellt. Anschließend wurde der Agar in sterile Petrischalen gegossen und bis zur Aushärtung ausgekühlt.

3.2.2. Glycerinkulturen

Zur längerfristigen Lagerung und homogenen Nutzung bereits herangezogener Bakterienstämme wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurden 500 µl einer Übernachtskultur bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 800 µl einer Lösung aus 50 ml einer 85 % Glycerin-Lösung und 50 ml des unter 4.2.1. aufgeführten modifizierten LB Mediums resuspendiert. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei -80 °C.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Anzucht der Hauptkulturen von Glutaryl-CoA-Dehydrogenase Wildtyp und Varianten sowie Zellernte

Zum Ansetzen einer Vorkultur wurden 20 ml des modifizierten LB Mediums (Kapitel 4.2.1) mit 20 µl Ampicillin versetzt und mit dem entsprechenden Glycerinstock beimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 200 U/min und 37 °C herangezogen. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur aus 2 Liter modifiziertem LB Medium, 20 ml Glucose und 2 ml Ampicillin angesetzt, auf 28 °C erwärmt und anschließend mit 40 ml der Vorkultur beimpft. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,6 bei 600 nm wurde die Proteinexpression mit 0,3 mM Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Da es sich bei der GCDH um ein Flavoprotein handelt, erfolgte die zusätzliche Gabe von 1 mg/l Riboflavin. Nach 22 Stunden Expression auf einem Schüttelinkubator bei 200 UpM und 20 °C wurden die Hauptkulturen bei 5000 UpM für 20 Minuten und einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des

Überstandes wurden die Pellets in PBS resuspendiert und erneut für 20 min bei 5000 UpM abzentrifugiert. Die resultierenden Pellets wurden je nach Bedarf bei -20 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

3.3.2. Lyse des Bakterienpellets mittels Ultraschall

Die Bakterienpellets wurden nach der Ernte in einem modifizierten Kaliumphosphatpuffer (siehe 4.1.2.) mit Proteaseinhibitoren (*complete mini*, siehe 4.1.1.) resuspendiert und die *E. coli* Bakterien anschließend in einer eisgekühlten Küvette mit dem *digital cell disruptor* (Branson, siehe 4.1.6.) in 4 Zyklen, bei jeweils 45 s, einer Amplitude von 70 %, einer Pulsdauer von 0,8 s und einer Pulspause von 0,2 s, lysiert.

3.3.3. Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse von denaturierten Proteinproben wurde eine LDS-PAGE eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei welcher denaturiertes Protein der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt wird. 4-12 % NuPAGE® Bis-Tris 20 well Gele (4.1.1.) wurden in einer Elektrophoresekammer (Novex® Midi Cell, Invitrogen) eingesetzt, die mit gekühltem MOPS Puffer (4.1.1) gefüllt wurde. Zum Größenvergleich wurden 5 µl *PAGE-Ruler prestained protein standard* (4.1.5) aufgetragen. Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte durch Erhitzen auf 95 °C für 10 Minuten sowie durch Versetzen mit LDS, das an Aminosäurereste bindet und eine negative Überschussladung proportional zur Größe des Proteins erzeugt. 8 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 14 µl LDS-Probenpuffer 4x (siehe 4.1.1.) sowie 14 µl *Aqua bidest* aufbereitet. Auf das Gel wurde dann eine Probenmenge von 17 µl aufgetragen und die Elektrophorese für 90 Minuten bei 200 V durchgeführt. Zuletzt wurde eine Coomassie-Färbung oder ein Westernblot durchgeführt um die entsprechenden Banden zu visualisieren (siehe 4.1.1) und digital zu dokumentieren.

3.3.4. *Blue-Native* Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Zur Analyse von nativen Proteinproben wurden BN-PAGEs durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der natives Protein der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt und im Anschluss z. B. durch Färbung oder Westernblot dargestellt werden kann. 4 – 16 % NativePAGE™ Bis-Tris-Gele 10 well (siehe 4.1.1.) wurden in einer Elektrophoresekammer (Novex Mini Cell, Invitrogen) eingesetzt, die mit *NativePAGE 1x running buffer* (siehe 4.1.1) sowie einem Gemisch aus *20x NativePAGE running buffer*, *20x NativePAGE cathode buffer*, sowie *Aqua bidest* aufgefüllt ist. Zum Größenvergleich wurden 5 µl des *NativeMark unstained protein standards* (siehe 4.1.5) aufgetragen. Als Ladungsträger dient in diesem Fall Coomassie G-250, das wie LDS eine negative Gesamtladung erzeugt, das Protein jedoch nicht denaturiert, sondern in seiner nativen Konformation erhält. Zudem wird mit einem nahezu pH-neutralen Puffersystem gearbeitet, was die Proteinkonformation kaum beeinflusst. Zur Probenaufbereitung wurde rekombinantes Protein auf eine finale Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und 15 µl mit

7,5 µl *4x NativePAGE sample buffer* (siehe 4.1.1) und 7,5 µl *Aqua bidest* versetzt und 10 µl des Ansatzes auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei 150 V für 60 Minuten und dann bei 250 V für 30 bis 60 Minuten. Zur Visualisierung und digitalen Dokumentation erfolgte im Anschluss eine Coomassie-Färbung des Gels oder ein Westernblot.

3.3.5. Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie Färbung handelt es sich um eine Färbemethode, die u. a. zur Visualisierung von Proteinbanden auf Polyacrylamidgelen verwendet werden kann. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Coomassie-Färbelösung (siehe 4.1.1) inkubiert. Anschließend wurde es zweimalig mit einem Entfärber, bestehend aus 250 ml Methanol, 80 ml Eisessig und 670 ml *Aqua bidest* für 30 Minuten behandelt. Zuletzt wurde das Gel mit *Aqua bidest* gewaschen und digital dokumentiert.

3.3.6. Westernblot und Immundetektion

Der Westernblot ist eine proteinbiochemische Methode zur Visualisierung selektiver Proteinbanden nach Gelelektrophorese auf einer Membran. Hierbei werden die im Gel aufgetrennten Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen und im Anschluss in insgesamt vier Schritten (2 Beimpfungsschritte, 2 Waschschriffe) durch selektive Antikörper detektiert. Der primäre Antikörper bindet selektiv an das zu detektierende Protein, der sekundäre Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert. Diese erzeugt durch Umsetzung von Luminol ein Chemolumineszenzsignal, das aufgenommen und digital dokumentiert werden kann.

GCDH-Wildtyp und Varianten in pEF DEST51 wurden per LDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im semi-dry Verfahren mit einer Blotkammer (*Perfect Blue Semi Dry* Elektrobloetter, Peqlab) auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Optitran BA-585 Reinforced NC, 0.45 µm, Whatman). Geblottet wurde bei 300 V und 273 mA für 90 Minuten. Die Detektion erfolgte mit einem anti-V5-Maus-Antikörper (Invitrogen, Konzentration 1:5000) sowie einem sekundären Ziege-anti-Maus-HRP-Antikörper (Santa Cruz, concentration 1: 10.000). Beimpft wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einem 10 % Milchgemisch (Milchpulver, blotting grade, Roth) mit 0,05 % TBS Tween für den primären Antikörper und in einem 5 % Milchgemisch mit 0,05 % TBS Tween für den sekundären Antikörper. TBS Tween wurde mit 100 ml 10x TBS, pH 7,5 (60,5 g Tris, AppliChem und 87,6 g NaCl, Merck auf 1000 ml *Aqua bidest*), 500 µl Tween (Tween® 20, AppliChem) und 900 ml *Aqua bidest* hergestellt. Nach jedem Beimpfungsschritt erfolgte ein Waschschriff, bei dem dreimalig für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,05 % TBS Tween gewaschen wurde. Als Fluoreszenzsubstrat zur Signaldetektion wurde *Super Signal® West Femto maximum sensitivity substrate* (Thermo Scientific) verwendet. Als Ladungskontrolle diente GAPDH (Antikörper von Meridian, anti-GAPDH-Maus, Konzentration 1: 40.000).

Für BN-PAGEs waren sowohl pMal-c2X DEST, als auch pEF DEST51 Konstrukte relevant. In diesem Fall wurde im *wet*-Verfahren geblottet, bei dem unter Eiskühlung das Gel auf eine mit Methanol (4.1.1.) aktivierte PVDF Membran (Amersham Hybond-P PVDF membrane, 0.45 µm, GE Healthcare) in einem Tank-Blot (*Tank-blot Novex Mini cell*, Invitrogen) geblottet wurde. Als Transferpuffer diente *NuPAGE transfer buffer* (Invitrogen). Geblottet wurde für 75 Minuten bei 25 V. Danach wurde die Membran in 8 % Eisessig für 15 Minuten geblockt und anschließend mehrmals gründlich mit *Aqua bidest* gewaschen. Die Beimpfungsschritte erfolgten wie für die Immundetektion eines LDS-Gels beschrieben. Für pMal-c2X DEST Konstrukte wurde als primärer Antikörper anti-MBP-Hase (NEB, Konzentration 1 : 10.000) verwendet und als sekundärer Antikörper Eesel-anti-Hase-HRP (Santa Cruz, Konzentration 1 : 10.000). Die Detektion von pEF DEST51 Konstrukten erfolgte analog zum für LDS-Blots beschriebenen Verfahren (4.3.3). Als Fluoreszenzsubstrat wurde Pierce® Westernblotting Substrate (Thermo Scientific) verwendet. Die Detektion und Dokumentation erfolgte in beiden Fällen (LDS- und BN-PAGE Blots) mit Diana Hard- und Software.

3.4. Analytik

3.4.1. Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA

Die Konzentration und Reinheit der DNA-Proben wurde spektrophotometrisch bestimmt. Wenige µl der extrahierten DNA wurden auf die Linse eines NanoDrop-Fluorospektrometer des Herstellers Thermo Fischer Scientific (St. Leon-Rot, BRD) aufgetragen und die Extinktion der Probe bei UV-Licht der Wellenlänge 260 nm gemessen. Die Konzentrationsberechnung erfolgte unter Anwendung des Umrechnungsfaktors ($E_{260} = 1,0$ entspricht $c = 50 \mu\text{g/ml}$). Der Verunreinigungsgrad der Probe mit Proteinen wurde durch eine parallele Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt, da die Tryptophan-Reste eines Proteins ein Absorptionsmaximum bei 279 nm aufweisen. Falls der Quotient beider Messungen $Q = \frac{E_{260}}{E_{280}}$ unter 1,8 lag, musste von einem starken Kontaminationsgrad ausgegangen werden und die Probe wurde daher verworfen. Idealerweise ergab der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 1,9.

3.4.2. Bestimmung der optischen Dichte einer *E. coli* Kultur

Zur Bestimmung der Zellmasse einer *E. coli* Kultur wurde die optische Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen. Der Nullwert war die optische Dichte von unbewachsenem Medium in einer Küvette.

3.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Nach jeder Proteinaufreinigung wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Proteinproben bestimmt. Hierfür wurde die Methode nach Bradford mit dem Bio-Rad Assay der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) angewendet. Bei dieser Methode wird die

Bindung eines azidischen Farbstoffes - hier *Coomassie® brilliant blue G-250* - an basische und aromatische Aminosäurereste ausgenutzt und die dadurch hervorgerufene Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm gemessen (Bradford, 1976).

In einem großen Konzentrationsbereich nimmt die Extinktion E_{595} des untersuchten Proteins linear zu, weswegen zur Ermittlung der absoluten Proteinkonzentration das Lambert-Beer'sche Gesetz verwendet werden kann. Laut diesem ergibt sich – nach entsprechender Umstellung der Formel - aus der gemessenen Extinktion (E_x) bei monochromatischem Licht einer Wellenlänge von 595 nm, dem Extinktionskoeffizienten (ϵ_x) einer Substanz, und der Schichtdicke der Probe (d^1) die Konzentration einer Lösung zu $E_{595} = \epsilon_{595} \cdot c_{\text{Probe}} \cdot d^1$. Als Proteinstandard mit bekannter Konzentration diente bovines Gamma Globulin.

3.4.4. Affinitätschromatographie

Nach Extraktion aus *E. coli* erfolgte die Aufreinigung der überexprimierten rekombinanten MBP-GCDH-Fusionsproteine (*Maltose-binding-protein*: UniProtKB – Q7AKP1) mittels Affinitätschromatographie. Hierfür wurde das automatisierte FPLC System Äkta-Purifier (GE-Healthcare) eingesetzt. Die Methode nutzt die hohe Affinität von MBP, um die Fusionsproteine aus dem Gesamtzelllysat abzutrennen. Hierfür eingesetzt wurde die Chromatographie-Säule MBPTrap® HP (GE Healthcare), die an ein Harz gekoppelte Amylose enthält. Vor Durchführung der Chromatographie erfolgte zunächst die Equilibrierung der Säule mit Kaliumphosphat und glycerinhaltigen Puffer (siehe 4.1.2). Dann wurde die Säule mit der Gesamtzellfraktion beladen, wobei die MBP-GCDH-Fusionsproteine an Amylose banden, alle anderen zellulären Bestandteile jedoch nicht. Im Anschluss erfolgte die Elution des Fusionsproteins durch einen Kaliumphosphat und glycerinhaltigen Puffer mit Maltose (siehe 4.1.2). Da MBP eine höhere Affinität zu Maltose als zu Amylose besitzt, konnte das rekombinante Fusionsprotein von der Säule verdrängt und eluiert werden.

3.4.5. Größenausschlusschromatographie (*size-exclusion-chromatography*, SEC)

Nach Aufreinigung der MBP-GCDH-Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie erfolgte die Analyse der Oligomerisierung durch Größenausschlusschromatographie.

Aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen zwischen den zu untersuchenden Proteinen und der Matrix der Gelfiltrationssäule aus quervernetzter Agarose und Dextran wurden die aufgereinigten MBP-GCDH-Fusionsproteine in unterschiedlich große Oligomere aufgetrennt. Besonders große Moleküle, wie z. B. Aggregate konnten dabei nicht in die Poren der Gelmatrix diffundieren und wurden mit der Lösemittelfront eluiert. Für kleine Moleküle wie z. B. Degradationsprodukte oder abgespaltenes MBP war die Verweildauer auf der Säule besonders lang, wodurch sie zu einem späteren Zeitpunkt eluiert wurden. Das für die Elution ausreichende Volumen wird als Ausschlussvolumen ($V_0 = \text{void volume}$) bezeichnet.

Zunächst erfolgte die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule durch Proteinstandards mit bekannter Größe (LMW-Kit und HMW-Kit, GE Healthcare) anhand derer die voraussichtlichen Elutionsvolumina der zu untersuchenden Proteine berechnet werden konnten. Für MBP-GCDH-Tetramere (MW = 370,8 kDa) ergab sich somit ein Elutionsvolumen von ca. 60 ml.

Im ersten Schritt wurde die Gelfiltrationssäule Superdex 200 pg 16/60 high load (GE Healthcare) mit HEPES-Puffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min equilibriert und mit dem Eluat der Affinitätschromatographiesäule, das unterschiedliche Oligomerisierungszustände der MBP-GCDH-Fusionsproteine enthielt, beladen (Flussgeschwindigkeit 0,1 ml/min). Im zweiten Schritt erfolgte die Elution mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min. Ab einem Elutionsvolumen von 40 ml wurde das Eluat in 2 ml Fraktionen gesammelt und mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm die MBP-GCDH-Fusionsproteine detektiert. Anschließend wurden die MBP-GCDH-Tetramere enthaltenden Fraktionen zur weiteren Verarbeitung gepoolt, aufkonzentriert und in Aliquots in Flüssigstickstoff gelagert. Die restlichen Fraktionen wurden verworfen.

3.4.6. *Right-angle light scattering* (RALS)

Zur Untersuchung des Aggregationsverhaltens der MBP-GCDH-Fusionsproteine wurde die Methode des *right-angle light scattering* verwendet. Hierbei fällt Licht von einer Lichtquelle in eine Küvette und im 90 ° Winkel dazu wird die entsprechende Streuung des Lichts gemessen. Durch Erwärmen der Probe und zunehmender Trübung der Lösung kann eine Zunahme der Streuung gemessen werden, denn mit ansteigender Temperatur kommt es zur Denaturierung, einem Verlust der Quartärstruktur sowie Aggregation des zu untersuchenden Proteins in der Probe, was die Zunahme der Trübung in der Lösung erklärt. Mit dieser Methode kann also ein Rückschluss auf das Aggregations- und Denaturierungsverhalten des zu untersuchenden Proteins gezogen werden.

Durchgeführt wurden die Untersuchungen an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrophotometer, das mit einer temperaturkontrollierten Peltier multicell Probenhalterung ausgestattet war. Die Proben wurden je nach Variante in HEPES-Puffer, oder in einem glycerinhaltigen Kaliumphosphat Puffer ohne Maltose (siehe beide 4.2.1) in einem Temperaturintervall von 25 °C bis 75 °C untersucht. Die Erwärmung der Probe erfolgte in Schritten von 1 °C pro Minute. Als Exzitationswellenlänge wurden 330 nm, als Emissionswellenlänge 335 nm gewählt, bei einer Spannung von 600 V.

3.4.7. *Differential scanning fluorimetry* (DSF)

Wie bei Niesen *et al.*, 2007 vorbeschrieben, kann mit der Methode der *differential scanning fluorimetry* das Entfaltungsverhalten eines Proteins unter thermischem Stress untersucht werden. Hierzu wird dem zu untersuchenden Protein ein Agens hinzugegeben, das an die lipophilen Aminosäurereste bindet, die während der hitzeinduzierten Entfaltung des Proteins an der Oberfläche exponiert werden. Die durch die Bindung des Farbstoffs entstehende Fluoreszenz kann im Fluoreszenzspektrophotometer detektiert werden.

Die Experimente wurden im *high-throughput* Verfahren an einem 7900 HT Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems in einer MicroAmp® Optical 96-Well Platte durchgeführt. Um die Proben vor Verdampfung zu schützen, wurden diese mit einem *MicroAmp™ Optical Adhesive Film* abgedeckt. Als fluoreszierendes Agens wurde *SYPRO® Orange protein gel stain* in einer Verdünnung von 1:500 und 1:1000 mit dem entsprechenden Puffer der zu untersuchenden Probe eingesetzt. Der Wildtyp und die

Varianten des rekombinanten MBP-GCDH-Fusionsproteins wurden nach Etablierung (s. 5.4.1) bei einer finalen Konzentration von 0,6 mg/ml entweder jeweils in HEPES-Puffer, oder in glycerinhaltigem Kaliumphosphatpuffer ohne Maltose (s. 4.2.1) untersucht. Detektiert wurde der Bereich zwischen 25 °C und 70 °C. Die Berechnung der jeweiligen T_m -Werte erfolgte für die Varianten in HEPES-Puffer wie vorbeschrieben (Pey *et al.*, 2008).

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. Ortsspezifische Mutagenese – *Site Directed Mutagenesis* (SDM) des GCDH-Wildtyps

Diese PCR-basierte Methode erlaubt die spezifische Einführung von Punktmutationen im *GCDH*-Wildtyp-Gen und wurde basierend auf einem Protokoll der Fima Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt:

1. Zwei komplementäre Primer, die in der Mitte modifizierte Nukleotide tragen und ansonsten der dsDNA-Matritze (in diesem Fall ein Plasmid) an der Stelle entsprechen, an welcher die Modifikationen vorgenommen werden sollen, werden zunächst designt und dann in einem Auftragslabor synthetisiert.
2. Durchführung einer mutagenisierenden PCR, bei der kodierender und kodogener Strang durch eine *high-fidelity* Polymerase amplifiziert werden. Durch Einsatz der mutagenisierenden Primer wird an der entsprechenden Stelle im Plasmid eine veränderte Nukleotidabfolge im Vergleich zum Wildtyp eingebaut, die auf Proteinebene einen Aminosäuretausch kodiert. Aufgrund einer fehlenden Ligaseaktivität während der PCR verbleiben Einzelstrangbrüche an den jeweiligen Replikationsenden der neu synthetisierten Plasmidstränge.
3. Verdau der ursprünglichen, methylierten DNA-Matritze durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym *DpnI*. Die neu amplifizierte Plasmid-DNA wird hierbei nicht beeinträchtigt, da sie noch keine methylierten Sequenzanteile aufweist.
4. Transformation des mutierten PCR-Produktes in *XL1-Blue*-Zellen. Durch eine vorliegende Ligaseaktivität in den entsprechenden Zellen werden die offenen Enden der SDM-Produkte zirkularisiert.

Als Matritze für die ortsspezifische Mutagenese diente der pENTRY-Klon des GCDH-Wildtyps. Die SDM wurde an einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt. Der entsprechende Reaktionsansatz beinhaltete:

| | |
|-----------------------------------------|---------|
| <i>5x KAPAHiFi Reaction Buffer</i> | 10 µl |
| KAPA dNTP Mix (10 mM je Nukleotid) | 1,5 µl |
| <i>Forward Primer</i> | 1,3 µl |
| <i>Reverse Primer</i> | 1,3 µl |
| GCDH Wt pENTRY | 0,5 µl |
| <i>KAPAHiFi DNA Polymerase</i> (1 U/µl) | 1 µl |
| <i>Aqua bidest</i> , nukleasefrei | 30,5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM, f.c.: 2 mM) | 4 µl |

Die SDM wurde wie folgt durchgeführt:

| | Temperatur | Dauer | Anzahl |
|-----------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 2 min | 1 |
| Denaturierung | 98 °C | 20 sec | 16 |
| <i>Annealing</i> der Primer | 55 °C | 15 sec | 16 |
| Replikation | 68 °C | 4 min | 16 |
| Finale Replikation | 68 °C | 5 min | 1 |

Um die Richtigkeit der SDM zu überprüfen, wurde eine beispielhafte Auswahl an SDM-Produkten als *proof-of-principle* anhand eines Restriktionsverdau mit *HpaI* und *BamHI* in *Tango Buffer* (alle Fermentas) analysiert. Hierbei wurde neben den neu generierten Konstrukten auch der leere pDONR221-Vektor als Vergleich mitgeschnitten. Hintergrund ist die Veränderung der Regionen, in denen die Restriktionsenzyme die Plasmid-DNA schneiden. Falls – wie gewünscht – das entsprechende Gen in die Plasmid-DNA insertiert wurde, schneiden die Restriktionsenzyme an einer anderen Stelle. Dementsprechend resultieren unterschiedliche Fragmentlängen, die über eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Der Restriktionsverdau erfolgte nach folgendem Ansatz:

| | |
|---------------------|--------|
| <i>Hpa I</i> | 0,3 µl |
| <i>BamHI</i> | 0,3 µl |
| <i>Tango Buffer</i> | 2 µl |
| DNA-Probe | 3 µl |
| <i>Aqua bidest</i> | 4,4 µl |

Positive Klone wurden anschließend in einem Auftragslabor sequenziert, um die Richtigkeit der generierten Mutationen zu bestätigen. Für die restlichen Konstrukte erfolgte kein gesonderter Restriktionsverdau, sondern die unmittelbare Sequenzierung nach SDM.

3.5.2. LR-Reaktion

Im nächsten Schritt erfolgte durch homologe Rekombination die Klonierung der *attL*-sites flankierten cDNA der GCDH-Varianten in den Zielvektor pEF DEST51 unter Anwendung der Gateway-Technologie. Das Resultat der LR-Reaktion ist der entsprechende Expressionsklon sowie ein das Selbstmordgen *ccdB* tragendes Nebenprodukt (Abbildung 2).

Ablauf der LR-Reaktion

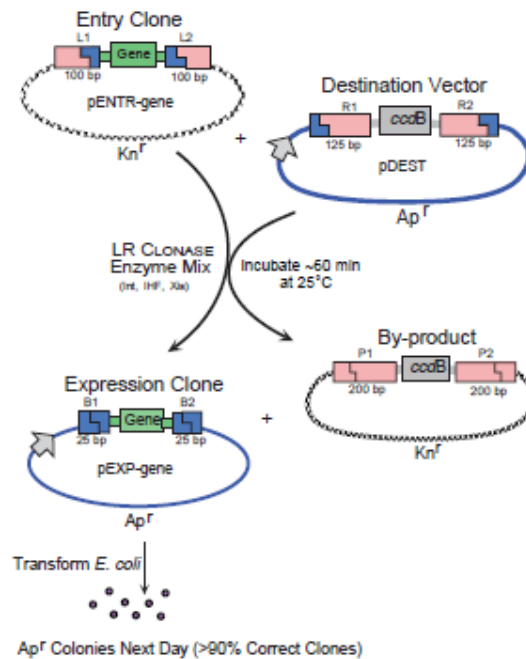


Abbildung 2: Ablauf der LR-Reaktion. Ein Entry-Klon, welcher das zu untersuchende Gen und „recombination-sites“ enthält, rekombiniert mit einem Zielvektor. Ergebnis der LR-Reaktion sind ein Expressionsklon und ein Reaktionsnebenprodukt zu erhalten (aus: User's guideline Gateway® Technology, A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems, Catalog Numbers 12535-019 and 12535-027, Revision 1.0, Document Part Number 250522, Publication Number MAN0000282).

Die LR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

| | |
|--------------------|----------------|
| pENTRY | 100 ng |
| pEF DEST51 | 1,0 µl |
| <i>Aqua bidest</i> | ad 5 µl gesamt |
| LR-Clonase | 1,0 µl |

Die LR-Reaktion wurde für 90 Minuten bei 25 °C durchgeführt und das Gelingen der Rekombination anschließend anhand eines Restriktionsverdau mit *Apal* (Thermo Fisher Scientific, USA) und Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Der entsprechende Restriktionsansatz ist im Anschluss aufgeführt, die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 90 Minuten.

| | |
|--------------------|--------|
| <i>Aqua bidest</i> | 5,3 µl |
| <i>Apal</i> | 0,3 µl |
| <i>Buffer Blue</i> | 1,4 µl |
| DNA-Probe | 3 µl |

3.5.3. Agarose-Gelelektrophorese

Der während der LR-Reaktion generierte Expressionsklon der entsprechenden *GCDH*-Mutanten wurde in jedem Zwischenschritt mittels Agarose-Gelelektrophorese auf Reinheit und Fragmentlänge geprüft.

Zur Herstellung des 1%-igen Agarosegels wurde zunächst ein Teil Agarose der Firma Biozym in 99 Teilen 1x TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (SERVA) aufgekocht und im Anschluss mit 5 µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich) versehen, was einer finalen Konzentration von 0,5 µg/ml entsprach. Das ausgehärtete Gel wurde in einer Gelelektrophoresekammer plaziert, die zuvor mit 1x TBE-Puffer befüllt wurde. Die Geltaschen wurden mit 10 µl der zu untersuchenden Probe und 2 µl *loading solution* (Sigma Aldrich) beladen. Zum Größenvergleich wurden 7 µl einer 1-kb *ladder* (Invitrogen) parallel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 120 V für 60 Minuten. Die anschließende Detektion der Banden erfolgte in einem UV-Transluminator mit einer Photo-Kamera, indem das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid durch die einfallende UV-Strahlung zur Fluoreszenz angeregt wird. Hierdurch werden die entsprechenden DNA-Banden sichtbar.

3.5.4. Chemische Transformation von XL1-*Blue*- und BL21 (DE3)-Zellen

Transformiert nach der SDM wurden zunächst XL1-*Blue*-Zellen zur Ligation der Einzelstrang DNA und BL21 (DE3)-Zellen mit Expressionsplasmiden zur Proteinexpression. Dies erfolgte durch Anwendung der „Hitzeschock“-Methode, bei der die Zellwände durch kurzzeitiges Erhitzen permeabel für DNA werden und diese so in die entsprechenden Zellen aufgenommen werden kann. 50 µl der zuvor aufgetauten Zelllinie wurden mit 7 µl einer DNA-Probe (entspricht 50 – 100 ng DNA) versehen und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte in einem Wasserbad ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden und ein erneutes Abkühlen für 2 Minuten auf Eis. Danach wurden die Proben in 450 µl LB Medium ohne Antibiotikum (s. 4.2.1) aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C bei 240 UpM auf einem Schüttler inkubiert. Schließlich erfolgte das gleichmäßige Auftragen des Transformationsansatzes auf eine Festagarplatte und die Bebrütung bei 37 °C über Nacht. Zur Selektion der transformierten Zellen wurde den Festagarplatten im Vorfeld ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben.

3.5.5. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation der *GCDH*-Plasmide erfolgte als Mini-Präparation aus 8 ml einer *E. coli* Flüssigkultur. Hierfür wurde eine Kolonie transformierter *E. coli*-Zellen in das entsprechende Medium mit selektierendem Antibiotikum überimpft und bei 37 °C über Nacht bei 240 UpM auf einem Schüttelinkubator bebrütet. Nach 16 Stunden wurde die Kultur bei 4000 UpM für 15 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Zell-Pellet mit dem QIAprep® *spin Miniprep Kit* des Herstellers Qiagen (Hilden, BRD) weiterverarbeitet. Dafür wurde es in dem vorgesehenen Puffer resuspendiert und die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert, um die zu isolierende DNA aus der Zellhülle freizusetzen. Das Lysat wurde anschließend

neutralisiert und auf eine Silikatmatrix aufgetragen, an welcher die DNA gebunden wurde. Es folgten mehrfache Waschschriffe, sowie die Elution der DNA durch 30 µl nukleasefreies *Aqua bidest.* Die im Folgenden ermittelte DNA Konzentration mittels Nanodrop ist unter 4.4.1. beschrieben.

3.5.6. Sequenzierung der Plasmide nach Sanger

Die Sequenzierung der im Rahmen der SDM generierten pENTRY Klone mit den GCDH-*missense* Mutationen, erfolgte mittels Sanger Methode durch das Unternehmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg, BRD). Die digitale Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Sequence Navigator™ des Herstellers Applied Biosystems/Perkin Elmer (Waltham, USA) im Dr. von Haunerschen Kinderspital.

3.6. Zellkultur

3.6.1. Medien und Antibiotika

Zu weiteren Untersuchungen im eukaryoten System wurden COS-7 Zellen aus dem Bestand des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, Kubus Forschungszentrums, verwendet. Diese wurden in 1x RPMI Medium (Gibco, life technologies, USA) mit 10 % *fetal bovine* Serum (Gibco, life technologies, USA) und 1: 100 Antibiotic-Antimykotik (Gibco, life technologies, USA) herangezogen und bei 37 °C und 5 % CO₂ Gehalt kultiviert.

3.6.2. Transfektion von COS-7 Zellen

Die Transfektion der COS-7 Zellen erfolgte mittels *Amaxa single cuvette* Verfahren (Lonza, CH). Diese Technologie bedient sich der Elektroporation der Zellmembran der zu untersuchenden Zelllinie, wobei Plasmid-DNA in die jeweiligen eukaryoten Zellen aufgenommen und sekundär überexprimiert wird. Hierfür wurden COS-7 Zellen mit 1x Trypsin-EDTA (Gibco, life technologies, USA) geerntet, auf Proben von jeweils 2 Millionen Zellen aufgeteilt und mit 300 G für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das entstandene Pellet in 100 µl Amaxapuffer (Lonza, CH) aufgenommen und 2 µg der zu transfizierenden GCDH-Variante im pEF DEST51 Vektor zugegeben. Nach erfolgter Transfektion wurden die Proben in jeweils 1000 µl des unter 4.6.1. beschriebenen Mediums aufgenommen, auf einer 6-Well Platte ausgesät und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet, wobei nach ca. 24 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte.

3.6.3. Ernte und Lyse der COS-7 Zellen

Die Ernte der jeweiligen in COS-7 Zellen exprimierten Variante erfolgte mit 500 µl 1x Trypsin-EDTA. Nach Stoppen der Trypsinierung mit 500 µl Medium (siehe 4.6.1) erfolgte ein Waschschrift mit 1x DPBS (Gibco, life technologies, USA). Anschließend wurden die Proben erneut aliquotiert und bei 300 G für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lyse Puffer, bestehend aus HEPES-Puffer, Proteaseinhibitor und Digitonin (f.c. 100 µl/ml) auf Eis resuspendiert und durch drei *freeze-and-thaw* Zyklen aufgeschlossen, bei welchen die Zellen in Lysepuffer bei -80 °C für 15 Minuten eingefroren und anschließend bei 37 °C mittels Wasserbad jeweils wieder aufgetaut wurden. Zur Verbesserung der Zelllyse erfolgte abschließend zusätzlich eine Behandlung der Proben mit Ultraschall für 15 Sekunden, bei einem Puls von 0,8 Sekunden, einer Pause von 0,2 Sekunden und einer Amplitude von 10 %. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt mit 600 G, bei 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 20.000 G bei 4 °C für 20 Minuten. Das hieraus entstehende Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer (s. 4.1.2) resuspendiert und konnte neben die lösliche Fraktion, als Pelletfraktion weiteren Analyseschritten zugeführt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Ermittlung einer klinisch und biochemisch-strukturell relevanten Serie von 14 Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mutationen

Cluster der untersuchten GCDH-Varianten

| Variante | strukturelles Korrelat | Quelle |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| F71S | Salzbrückenbindung zu R72 und E129, ähnlich zu R28C in MCAD | Busquets <i>et al.</i> , 2000 |
| R88C | häufige N-Terminale Mutation | Biery <i>et al.</i> , 1996, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| R138G | Active Site, nimmt an Decarboxylierung teil | Fu <i>et al.</i> , 2004, Westover <i>et al.</i> , 2003, Dwyer <i>et al.</i> , 2000 |
| G178R | Nahe am aktiven Zentrum, FAD-Bindestelle | Biery <i>et al.</i> , 1996, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| E181K | homolog zu MCAD und allen anderen ACADs, FAD-Bindestelle, hoch konserviert, könnte Tetramerisierung beeinflussen | Busquets <i>et al.</i> , 2000 |
| R227P | Im Loop, welcher größten Unterschied zu MCAD ausmacht, evtl. wichtig für Substratspezifität | Biery <i>et al.</i> , 1996, Busquets <i>et al.</i> , 2000, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| M263V | relativ stabile Variante | Keyser <i>et al.</i> , 2008 |
| A293T | Möglicherweise Expressionsproblem, da MCAD in dieser Region auch schlecht exprimiert | Busquets <i>et al.</i> , 2000, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| V400M | Relativ milde Mutation an Oberfläche des Proteins | Busquets <i>et al.</i> , 2000, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| R402W | häufigste Mutation, sehr instabil | Biery <i>et al.</i> , 1996, Busquets <i>et al.</i> , 2000, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| E414K | katalytische Base, sehr stabil | Fu <i>et al.</i> , 2004, Westover <i>et al.</i> , 2003, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| A421V | sehr häufig, C-terminal, in Subunit-Interaktionen involviert | Biery <i>et al.</i> , 1996, Dwyer <i>et al.</i> , 2000 |
| A433E | beeinflusst Oligomerisierung, Unterschied zu A389V? | Fu <i>et al.</i> , 2004, Westover <i>et al.</i> , 2003, Goodman <i>et al.</i> , 1998 |
| A433V | beeinflusst Oligomerisierung, Unterschied zu A389E? | Fu <i>et al.</i> , 2004, Westover <i>et al.</i> , 2003 |

Tabelle. 1: Auswahl von 14 GCDH-*missense* Mutationen mit strukturellen und funktionellen Folgen für das Gesamtprotein

Anhand einer Pubmed-Literaturrecherche wurden 14 GCDH-*missense* Mutationen ausgewählt, die sich über die Gesamtheit der Quartärstruktur des Proteins erstrecken und verschiedenste funktionale Einschränkungen des Enzyms verursachen. Die Detailübersicht hierzu zeigt Tabelle 1. In der Literatur wird bezüglich der Nomenklatur der Varianten aktuell häufiger der *three-letter-code* für den Aminosäureaustausch einer Variante verwendet, wobei diesem ein „p.“ für Protein vorangestellt wird. In der Mitte wird mit einer Zahl die Position des Austausches in der Aminosäuresequenz angegeben (z.B. p.Arg88Cys). In der vorliegenden Arbeit wurde der *single-letter-code* für die entsprechenden Aminosäuren verwendet. Die Zahl gibt auch hier die Position des Austausches in der Aminosäuresequenz des unprozessierten Proteins an (z.B. R88C). Gegebenenfalls kann durch vorbeschriebene Tabellen (z.B. <http://williams.medicine.wisc.edu/aminoacidcodes.pdf>, letzter Zugriff am 24.09.2020) eine Übersetzung in die jeweils andere Nomenklatur erfolgen.

4.2. Reinigung der Fusionsproteine von MBP-GCDH-Wildtyp und 12 Varianten aus BL21(DE3) Zellen

4.2.1. Untersuchung des Oligomerisierungs- und Aggregationsverhaltens der MBP-Fusionsproteine von GCDH-Wildtyp und 12 Varianten nach Affinitätschromatographie

Wildtyp und 12 Varianten der GCDH im pMalc2X DEST Vektor wurden in *E. coli* Zellen überexprimiert, mittels Ultraschall aus der Zelle isoliert und der Zellüberstand auf eine Affinitätssäule (MBP Trap) aufgetragen. Dadurch konnten die GCDH-Fusionsproteine vom Zellüberstand abgetrennt und analysiert werden.

Die eluierte Amylosefraktion enthält unterschiedliche Oligomerisierungszustände der einzelnen Proteine, die durch Western Blot mit anschließender Immundetektion analysiert werden konnte. Tabelle 2 zeigt eine Aufstellung der jeweiligen Oligomerisierungszustände des Wildtyps und der aufgereinigten 12 Varianten aufgeteilt in die 5 Bereiche Aggregate, höhergradige Oligomere, Tetramere, Dimere und Monomere. Die Einordnung in die entsprechende Klasse erfolgte nach Vergleich der kDa Angabe der Referenzprobe. Interessanterweise zeigte sich für den GCDH-Wildtyp, dass dieser nicht wie vermutet zu 100 % als Tetramer eluiert, sondern das rekombinante MBP-GCDH-Fusionsprotein im Gleichgewicht zwischen verschiedenen Oligomerisierungszuständen vorliegt. Neben einem geringen Anteil an höhergradigen Oligomeren, lagen auch Tetra-, Di- und Monomere vor. Außerdem war der hohe Anteil von Aggregaten auffällig.

Für die GCDH-Varianten waren die Ergebnisse sehr unterschiedlich. Einige Varianten konnten nur als Aggregate gereinigt werden; diese waren F71S, G178R, E181K, R402W, sowie A421V. Varianten, die hauptsächlich als Tetramere vorlagen, waren R138G, R227P, M263V und V400M. Dennoch ist auch hier das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Oligomerisierungszuständen zu erwähnen, wie es auch bei A433E der Fall war. Die Varianten R88C und E414K eluierten zu einem hohen Anteil als Dimere.

Aufgrund eines für die Varianten A293T und A433V vereinfachten Reinigungsprotokolls wurden diese in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin (4.1.2.) gereinigt. Da es sich bei Glycerin um ein chemisches Chaperon handelt, war die Betonung der Tetramerfraktion des GCDH-Wildtyps im glycerinhaltigen Puffer im Vergleich zur Tetramerfraktion des GCDH-Wildtyps ohne glycerinhaltigen Puffer (Tabelle 2) durch den entsprechenden stabilisierenden Effekt von Glycerin nachvollziehbar.

Oligomerisierung von GCDH-Wildtyp und Varianten im prokaryoten System (HEPES)

| | Aggregate (%) | höhergradige Oligomere (%) | Tetramere (%) | Dimere (%) | Monomere (%) |
|-------|---------------|----------------------------|---------------|------------|--------------|
| Wt | 52,7 | 2,9 | 18,8 | 16,3 | 9,3 |
| F71S | 79,4 | 2,9 | | 14,2 | 3,4 |
| R88C | 26,3 | 3,0 | 16,6 | 48,1 | 6,1 |
| R138G | 40,0 | | 29,4 | 22,8 | 7,8 |
| G178R | 100,0 | | | | |
| E181K | 98,4 | | | 1,6 | |
| R227P | 15,0 | | 39,0 | 16,3 | 29,6 |
| M263V | 42,2 | | 34,2 | 18,9 | 4,6 |
| V400M | 30,2 | 3,4 | 26,1 | 29,5 | 10,9 |
| R402W | 96,1 | | 3,0 | 1,0 | |
| E414K | 48,4 | 1,5 | 18,9 | 24,0 | 7,1 |
| A421V | 54,4 | | 8,0 | 22,4 | 15,2 |
| A433E | 37,2 | | 14,4 | 23,9 | 24,5 |

Tabelle. 2: GCDH-Wildtyp Fusionsprotein und 12 Varianten nach Aufreinigung, Westernblot und digitaler Quantifizierung der Amylosefraktion nach Affinitätschromatographie.

Oligomerisierung von GCDH-Wildtyp und Varianten im prokaryoten System (Kaliumphosphat mit Glycerin)

| | Aggregate (%) | höhergradige Oligomere (%) | Tetramere (%) | Dimere (%) | Monomere (%) |
|-------|---------------|----------------------------|---------------|------------|--------------|
| Wt | 46,8 | | 40,8 | 9,8 | 2,7 |
| A293T | 31,8 | | 51,7 | 9,6 | 6,9 |
| A433V | 58,0 | 1,6 | 15,3 | 17,8 | 7,3 |

Tabelle. 3: GCDH-Wildtyp Fusionsprotein und 2 Varianten nach Aufreinigung, Westernblot und digitaler Quantifizierung der Amylosefraktion in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin.

Dennoch lag auch im glycerinhaltigen Puffer ein Gleichgewicht zwischen Tetrameren, Dimeren und Monomeren vor. Die Variante A293T zeigte im Vergleich zum GCDH-Wildtyp einen höheren Anteil an Tetrameren. Die Variante A433V lag zur Hälfte als Aggregat vor. Es

konnten aber auch Anteile an höheren Oligomeren, Tetrameren, Dimeren und Monomeren nachgewiesen werden (Tabelle 3).

4.2.2. Untersuchung des Oligomerisierungs- und Aggregationsverhaltens der MBP-Fusionsproteine von Wildtyp und 14 Varianten mittels Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie ist es möglich, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen. Aufgezeichnet wird dabei die Absorption aromatischer Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm. MBP besitzt eine Masse von 44,6 kDa, ein GCDH-Monomer 48,1 kDa. Somit resultiert für ein MBP-GCDH-Monomer eine Gesamtmasse von 92,7 kDa, für ein Dimer des Fusionsproteins 185,4 kDa und 370,8 kDa für ein Tetramer. Nach der unter 4.4.5. beschriebenen Kalibrierung des Gerätes ergaben sich Elutionsvolumina von circa 50 ml für Aggregate, circa 60 ml für Tetramere, circa 70 ml für Dimere sowie circa 85 ml für Monomere.

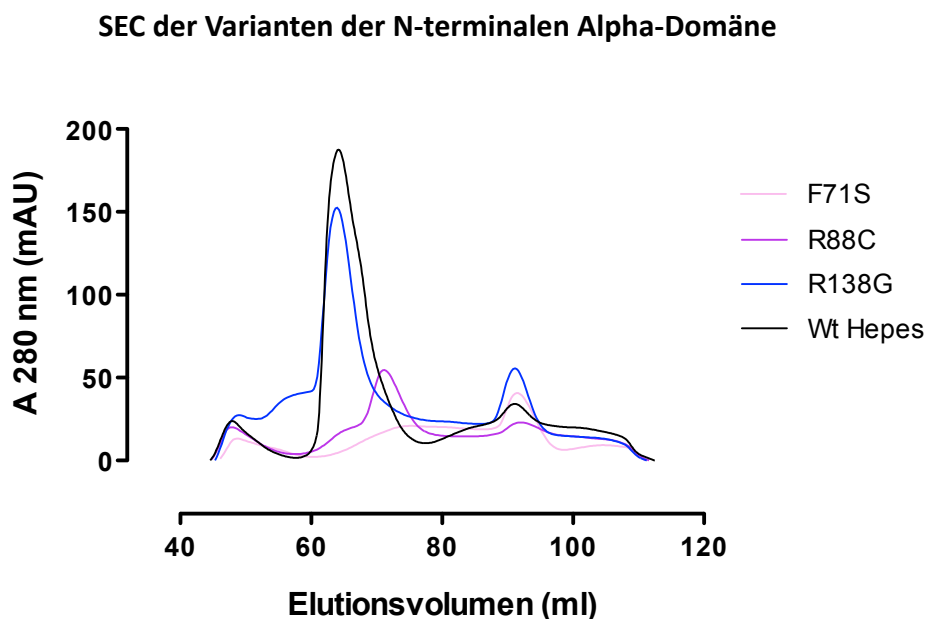


Abbildung 3: Chromatogramme des GCDH-Wildtyps sowie der Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne. F71S lag vermehrt in Form von Aggregaten und Monomeren, R88C vornehmlich in Dimerform und R138G hauptsächlich als Tetramerform vor.

Abbildung 3 zeigt die Chromatogramme der Varianten aus der N-terminalen Alpha-Domäne im Vergleich zum Wildtyp, der mit einem Elutionsvolumen von circa 60 ml hauptsächlich als Tetramer gereinigt werden konnte. Allerdings war auch eine Dimerschulter des Hauptpeaks bei circa 70 ml nachweisbar. Die kleineren Peaks bei 50 und 85 ml deuteten auf das Vorliegen von Aggregaten und Monomeren sowie abgespaltenem MBP hin. Die Variante F71S zeigte vor allem Peaks bei circa 50 und 85 ml, was darauf schließen ließ, dass diese Variante hauptsächlich als Aggregate oder als Monomere vorlag. Für R88C eluierte der größte Peak bei circa 70 ml und bestätigte damit das Ergebnis aus dem vorherigen Kapitel,

dass die Variante hauptsächlich als Dimer vorliegt. Ein anderes Bild ergab sich für R138G, das mit einem ausgeprägten Elutionspeak bei circa 60 ml vornehmlich als Tetramer vorlag. Obwohl nicht alle Varianten als Tetramer gereinigt werden konnten, wurden alle Varianten im Folgenden mit unterschiedlichen Methoden charakterisiert.

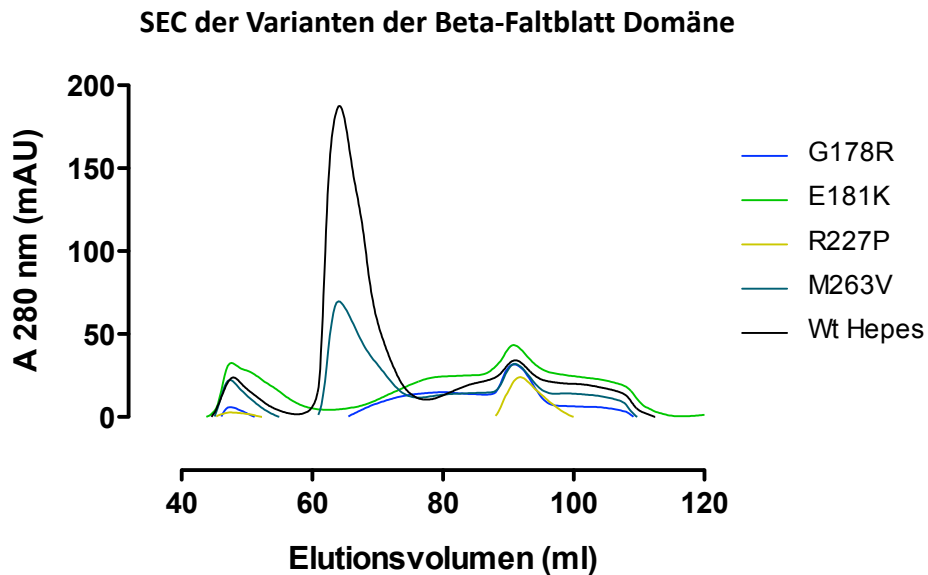


Abbildung 4: Chromatogramme des GCDH-Wildtyps, sowie der Varianten der Beta-Faltblatt Domäne im Vergleich zum Wildtyp des GCDH-Fusionsproteins.

Abbildung 4 zeigt die Varianten, die einen Aminosäureaustausch in der Betadomäne des Proteins aufweisen. Neben dem Wildtyp konnte ausschließlich die Variante M263V als Tetramer gereinigt werden. Alle anderen Varianten zeigten eine verstärkte Tendenz zur Aggregation. R227P ließ sich bereits schlecht überexprimieren, weswegen kaum gereinigtes Protein detektiert werden konnte. Somit wurde ausschließlich M263V für die Folgeexperimente verwendet, denn die anderen Varianten konnten nicht in ausreichender Menge gereinigt werden.

Ein eher inhomogenes Bild zeigte sich für die Varianten der C-terminalen Alphadomäne (Abbildung 5). Für V400M resultierte - bei geringer Gesamtproteinmenge - ein kleinerer Anteil an Tetrameren und ein höherer Anteil an Dimeren. R402W zeigte vornehmlich Aggregate und Monomere. Auch für E414K zeigten sich Tetramere und Dimere, für A421V und A433E hingegen vor allem Dimere. Im Rahmen der Folgeexperimente wurden die Varianten V400M, E414K, A421V und A433E analysiert.

Auch für die in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin gereinigten Varianten A293T und A433V konnten Chromatogramme im Vergleich zum Wildtyp aufgezeichnet werden (Abbildung 6). Auffällig ist hierbei für beide Varianten der hohe Anteil an Aggregaten. Jedoch konnte für A293T eine größere Fraktion Tetramere nachgewiesen werden, wobei auch Monomere detektiert wurden. Auch für A433V war eine kleine Fraktion Tetramere nachweisbar, die Variante eluierte jedoch hauptsächlich als Dimer. Beide Varianten wurden im Rahmen von Folgeexperimenten weiter untersucht.

SEC der Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne

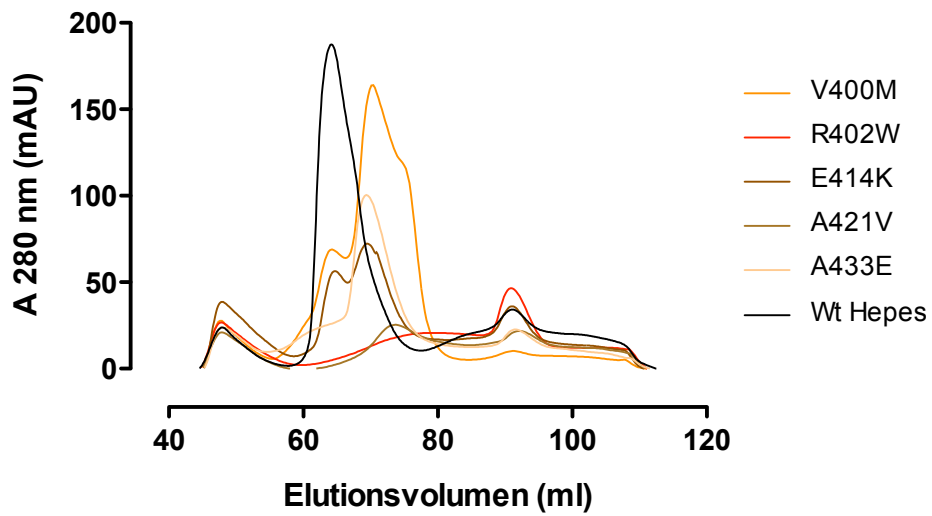


Abbildung 5: Chromatogramme des GCDH-Wildtyps, sowie der Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne.

SEC der Varianten gereinigt in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin

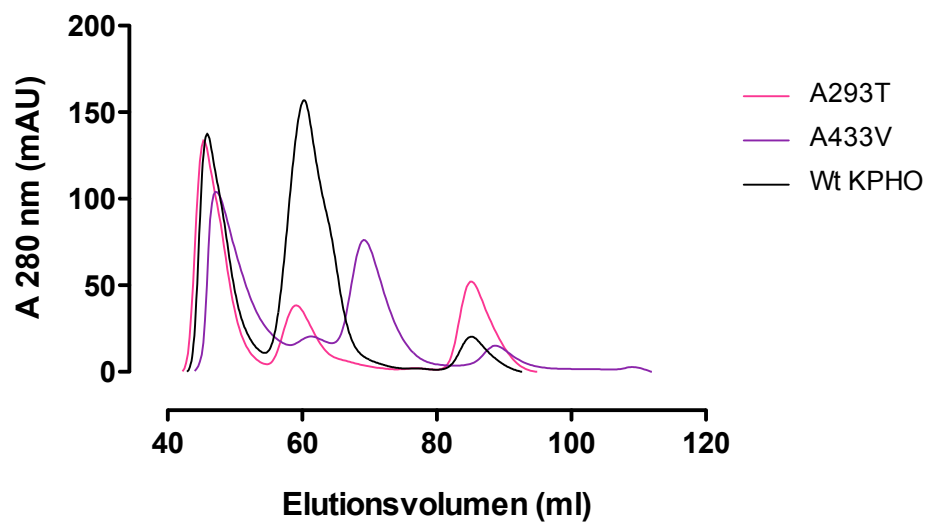


Abbildung 6: Chromatogramme des GCDH-Wildtyps, sowie der Varianten welche in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin gereinigt wurden.

4.3. Untersuchung des Aggregationsverhaltens von gereinigtem MBP-GCDH-Wildtyp und 8 gereinigten Varianten mittels RALS

4.3.1. Etablierung des RALS-Assays für den GCDH-Wildtyp

Wie Abbildung 7 zeigt, erfolgte die Etablierung des Assays mit vier unterschiedlichen Konzentrationen des GCDH-Fusionsproteins. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gemessenen Rohdaten normalisiert, wobei 0 % als niedrigster Wert und 100 % als höchster Wert festgesetzt wurde. Dargestellt sind die Messungen bis 65 °C, da hier die vollständige Entfaltung von MBP erfolgte und dadurch die GCDH-Daten nicht mehr richtig abgebildet werden.

RALS des GCDH-Wildtyps bei verschiedenen Proteinkonzentrationen

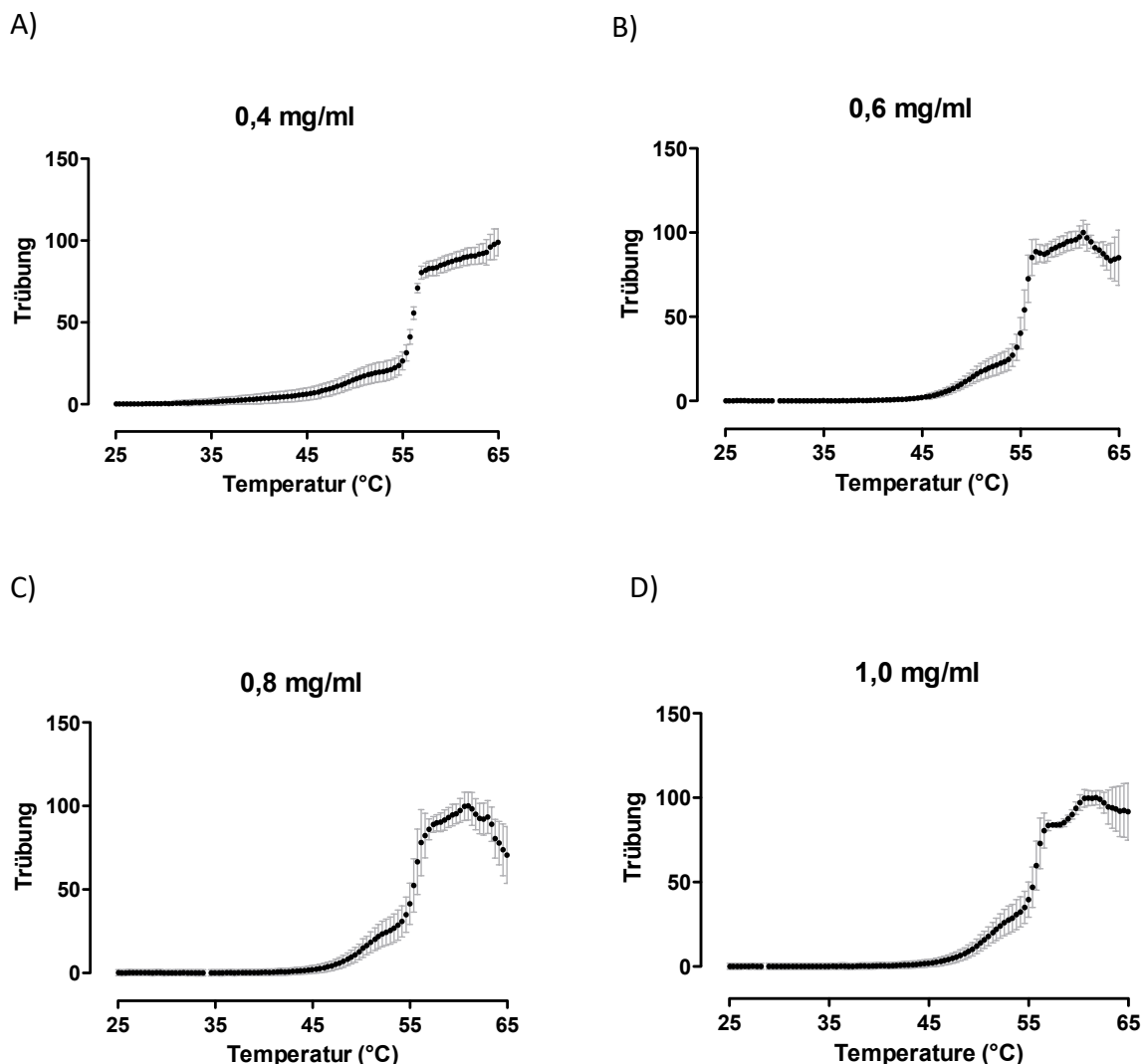


Abbildung 7: Etablierung des RALS-Assays für das GCDH-Wildtyp Fusionsprotein mit den Proteinkonzentrationen 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,0 mg/ml. Die Messungen erfolgten in HEPES-Puffer als Triplikate. Die grauen Balken zeigen die Streuwerte der Einzelmessungen mit Mittelwert (SEM).

Für die Konzentrationen 1,0 mg/ml, 0,8 mg/ml und 0,4 mg/ml zeigte sich im für das Aggregationsverhalten interessanten Bereich ab 45 °C eine zu hohe Streuvarianz zwischen den jeweiligen Replikaten, weswegen die finale Proteinkonzentration von 0,6 mg/ml als Arbeitskonzentration für die Messung der zu untersuchenden Varianten gewählt wurde. Der Kurvenverlauf zeigte ab 43,1 °C eine zunehmende Aggregation, wobei sich zwischen 51,3 °C und 54,1 °C ein kurzes Plateau zeigte. Ab 54,1 °C war ein „*aggregation burst*“ zu beobachten, der ab 58,0 °C in ein zweites Plateau mündete.

4.3.2. Aggregationsverhalten von GCDH-Wildtyp und GCDH-Varianten

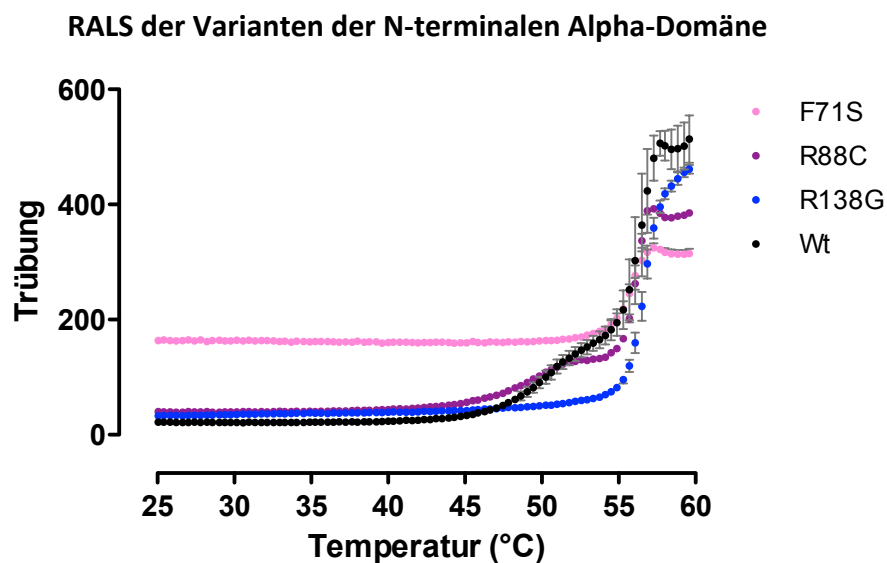


Abbildung 8: RALS-Diagramme für die Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne. Die Messung erfolgte in HEPES-Puffer als Triplikate. Die grauen Balken zeigen die Streuwerte der Einzelmessungen. Der farbige Messpunkt zeigt den Mittelwert (SEM).

Die Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne (Abbildung 8) zeigten ein sehr differenziertes Aggregationsverhalten. F71S wies von Beginn der Messung an deutlich höhere *Turbidity*-Werte auf als der Wildtyp, was zu einem Fehlen des ersten Aggregationsplateaus führte. Für die Variante R88C zeigte sich ein sehr ähnliches Aggregationsverhalten wie für den GCDH-Wildtyp. Der Anstieg zum ersten Plateau erfolgte bereits ab 43,1 °C und erreichte dieses bei 51,7 °C. Das erste Plateau war dementsprechend ausgeprägter als beim Wildtyp. Das zweite Plateau war bereits bei 57,7 °C zu beobachten. Die Variante R138G wies kein erstes Plateau auf, da die Signalintensität sehr gering war. Das zweite Plateau der Variante erfolgte jedoch mit keiner scharfen Absetzung der *Turbidity*-Werte, zur vorherigen Anstiegsphase. Stattdessen war eine asymptotische Angleichung der *Turbidity*-Werte an das zweite Plateau zu beobachten.

Insgesamt zeigten alle Varianten niedrigere *Turbidity*-Werte bei Erreichen des zweiten Plateaus im Vergleich zum Wildtyp, der „*aggregation burst*“ erfolgte aber für Wildtyp und Varianten bei vergleichbarer Temperatur.

Die Variante M263V aus der Beta-Faltblatt Domäne zeigte ein ähnliches Verhalten wie R138G - es zeigt sich kein erstes Plateau (Abbildung 9). Das zweite Plateau war bei den

gleichen Temperaturen wie für den Wildtyp zu beobachten, allerdings erfolgte auch hier eine asymptotische Angleichung.

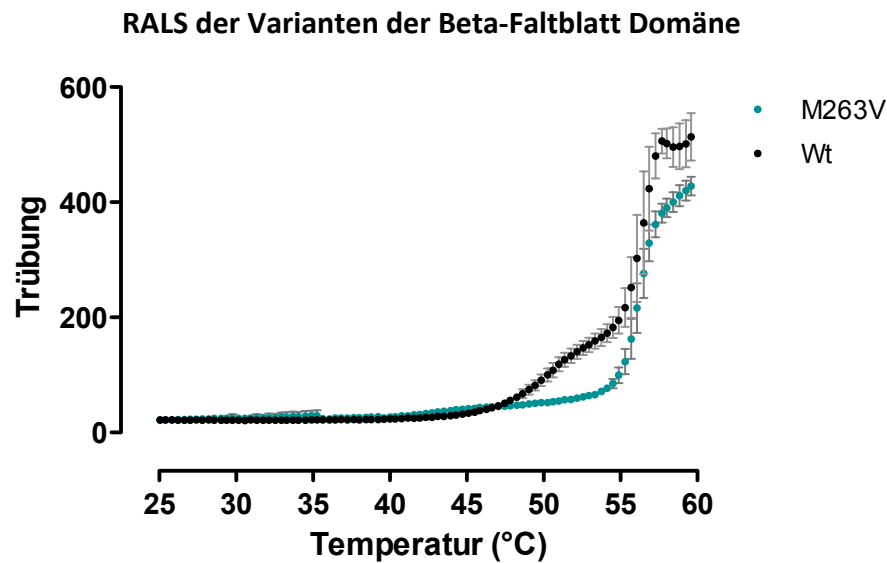


Abbildung 9: RALS-Diagramme für die Variante der Beta-Faltblatt Domäne. Die Messung erfolgte in HEPES-Puffer als Triplikate. Die grauen Balken zeigen die Streuwerte der Einzelmessungen. Der farbige Messpunkt zeigt den Mittelwert (SEM).

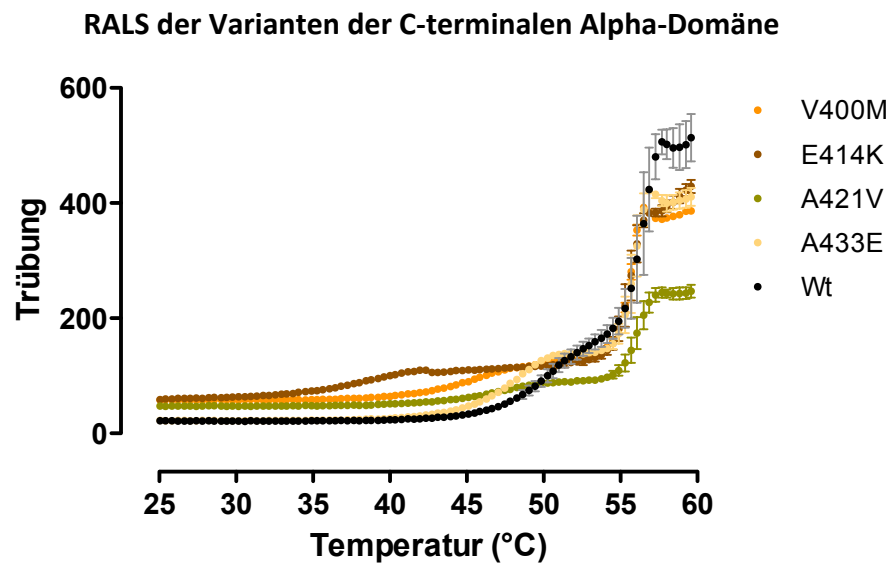


Abbildung 10: RALS-Diagramme für die Variante der C-terminalen Alpha-Domäne. Die Messung erfolgte in HEPES-Puffer als Triplikate. Die grauen Balken zeigen die Streuwerte der Einzelmessungen (SEM).

Für die Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne zeigte sich wie für den Wildtyp ein relativ einheitliches biphasisches Aggregationsverhalten (Abbildung 10). Alle Variaten zeigten wie der Wildtyp zwei Plateauphasen sowie einen „*aggregations burst*“ bei ca. 55 °C.

Für die beiden Varianten A293T und A433V, die in glycerinhaltigem Kaliumphosphat-Puffer aufgereinigt wurden, zeigte sich ein anderes Aggregationsverhalten als für die bereits beschriebenen Varianten, die in HEPES-Puffer gereinigt wurden (Abbildung 11). Für den

Wildtyp war bis zur Temperatur von 65,0 °C, bei der MBP entfaltet, ein einphasischer Aggregationsprozess zu beobachten. Ein „*aggregation burst*“ war nicht zu detektieren. Es erfolgte ein Anstieg der *Turbidity*-Werte ab 49,4 °C sowie der Übergang der Kurve in ein Plateau ab 65,0 °C.

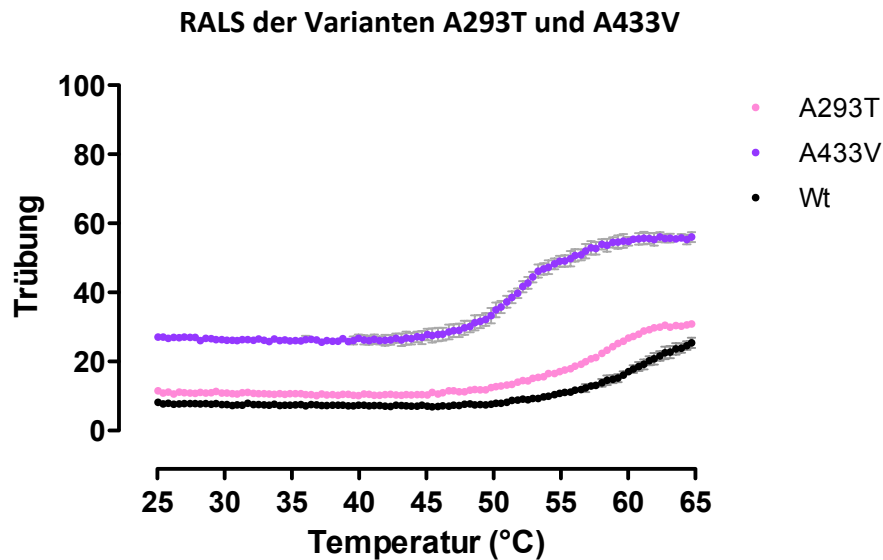


Abbildung 11: RALS-Diagramme für die Varianten, die in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin gereinigt wurden. Die Messung erfolgte in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin als Triplikate. Die grauen Balken zeigen die Streuung der Einzelmessungen (SEM).

Die Variante A433V zeigte bereits zu Beginn der Messung erhöhte *Turbidity*-Werte im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem zeigte sich ein früherer Anstieg der *Turbidity*-Werte bereits bei 42,3 °C sowie das Erreichen des Plateaus bereits bei 59,9 °C.

4.4. Untersuchung der thermischen Entfaltung von gereinigtem MBP-GCDH-Wildtyp und 8 gereinigten GCDH-Varianten

4.4.1. Etablierung des DSF-Assays für den GCDH-Wildtyp

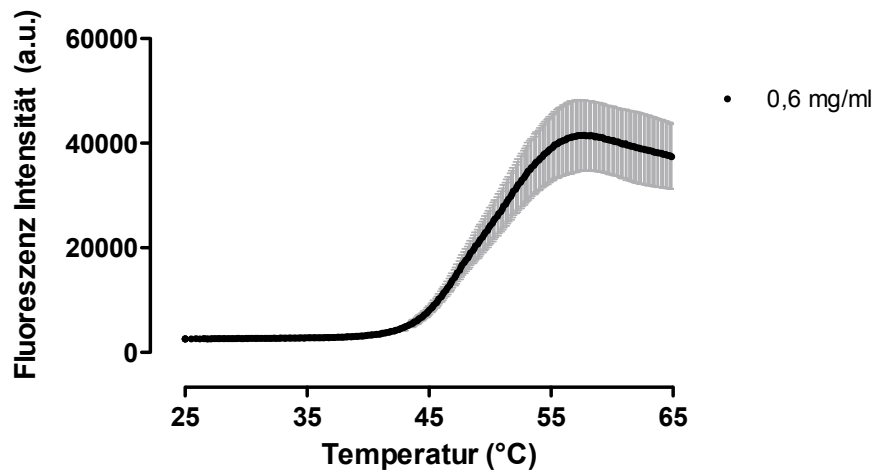
Zunächst erfolgte die Etablierung des DSF-Assays im Hochdurchsatz, um die temperaturabhängige Entfaltung des Wildtyps zu untersuchen. SYPRO® Orange diente hierbei als Fluoreszenzmarker. Der Farbstoff bindet an hydrophobe Bereiche im Enzym. Mit zunehmender Temperatur werden hydrophobe Bereiche exponiert, der Farbstoff kann binden und die Fluoreszenzintensität steigt an. Sobald der Wildtyp vollständig entfaltet vorliegt, erreicht die Fluoreszenz ihr Maximum und gipfelt im Plateau mit gleichbleibender Fluoreszenzintensität (Niesen *et al.*, 2007). Für die Etablierung wurde SYPRO® Orange in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Ebenso wurde zunächst die Proteinkonzentration im Bereich von 0,05 – 1 mg/ml variiert.

In Abbildung 12 ist beispielhaft der Verlauf der thermischen Denaturierung des MBP-GCDH-Fusionsproteins im Temperaturintervall von 25 °C bis 65 °C dargestellt. Das Temperatur-

intervall wurde bewusst nicht über 65 °C erweitert, da MBP ab dieser Temperatur entfaltet und die Messung beeinflussen würde.

DSF des GCDH-Wildtyps bei verschiedenen SYPRO® Orange Konzentrationen

A) SYPRO® Orange Konzentration 1 : 500



B) SYPRO® Orange Konzentration 1 : 1000

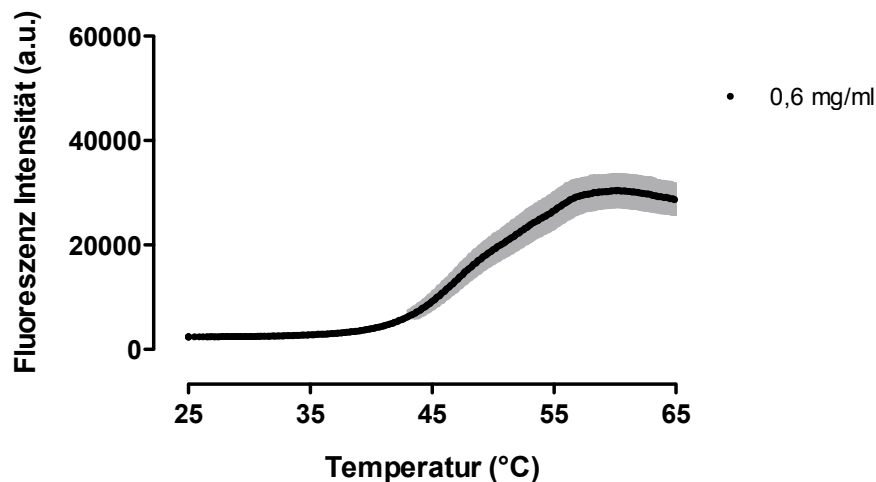


Abbildung 12: Etablierung der DSF-Messungen für den GCDH-Wildtyp mit den SYPRO® Orange Konzentrationen 1: 500 (A) und 1: 1000 (B) bei einer finalen Proteinkonzentration von 0,6 mg/ml. Die Messung erfolgte in HEPES-Puffer mit 6 Replikaten. Die grauen Balken zeigen die Streuung der Einzelmessungen (SEM).

Für die SYPRO® Orange Verdünnung von 1 : 500 war die Streuung der Einzelmessung zu groß, sodass im Folgenden die 1 : 1000 Verdünnung eingesetzt wurde, bei der die Streuung der Messwerte deutlich geringer war. Die MBP-GCDH-Fusionsproteinkonzentration von 0,6 mg/ml wurde eingesetzt, da hier die T_m -Werte (auch V_{50} -Werte), bei der 50 % des Proteins in denaturierter Form vorliegen, die geringste Streubreite aufwiesen. Interessant ist hier der biphasische Verlauf der Kurve, (Phase I: zwischen 25 °C und ca. 47 °C; Phase II: zwischen ca. 47 °C bis 65 °C) der darauf hindeutet, dass das Protein in zwei Stufen entfaltet.

4.4.2. Analyse der temperaturabhängigen Entfaltung der MBP-GCDH-Varianten

Abbildung 13 zeigt die temperaturabhängige Entfaltung aller Varianten im Vergleich zum Wildtyp der GCDH, der in ausreichender Menge gereinigt werden konnten. Auffallend war, dass alle in HEPES-Puffer gereinigten Varianten eine erhöhte native Fluoreszenz im Grundzustand aufwiesen, was darauf hindeutet, dass die Enzyme bereits im Grundzustand partiell entfaltet vorlagen (Abbildung 13 A – C).

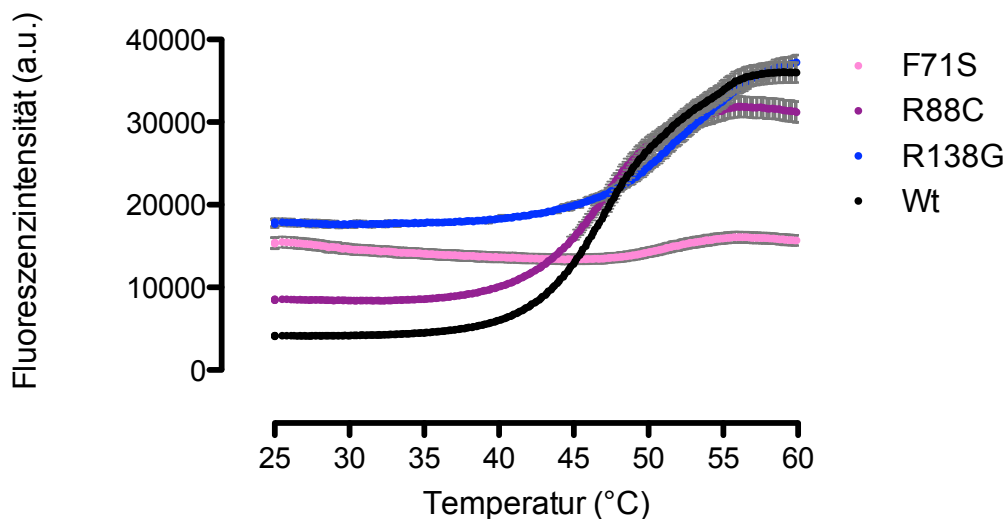
Für F71S entfiel aufgrund der hohen Grundfluoreszenz ein erster Anstieg der Messkurve. Erst bei höheren Temperaturen zeigte sich ein leichter Anstieg der Messwerte, wobei der entsprechende T_m -Wert im Vergleich zum Wildtyp niedriger war. Dies zeigte deutlich, dass die Variante bereits bei niedrigeren Temperaturen entfaltet war als der Wildtyp. Für die Variante R88C zeigte sich – bis auf die bereits erwähnte erhöhte Fluoreszenz im Grundzustand – eine dem Wildtyp sehr ähnliche Entfaltungskurve, was auch an den entsprechenden T_m -Werten deutlich wurde. Für die Variante R138G trat wie bei F71S nur der zweite Übergang auf und der Erste konnte aufgrund der hohen Ausgangsfluoreszenz nicht bestimmt werden. Auch für R138G war die zweite Übergangstemperatur im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

Für die Variante M263V, deren Aminosäureaustausch in der Beta-Faltblatt Domäne der GCDH lokalisiert ist, zeigte sich ein deutlich verändertes Bild (Abbildung 13 B). Es konnten zwar beide Übergänge detektiert werden, die entsprechenden T_m -Werte waren aber deutlich niedriger als für den Wildtyp.

In Abbildung 13 C sind die Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne abgebildet. Sämtliche Varianten zeigten zwei Übergänge, wobei die T_m -Werte im Vergleich zum Wildtyp deutlich niedriger waren.

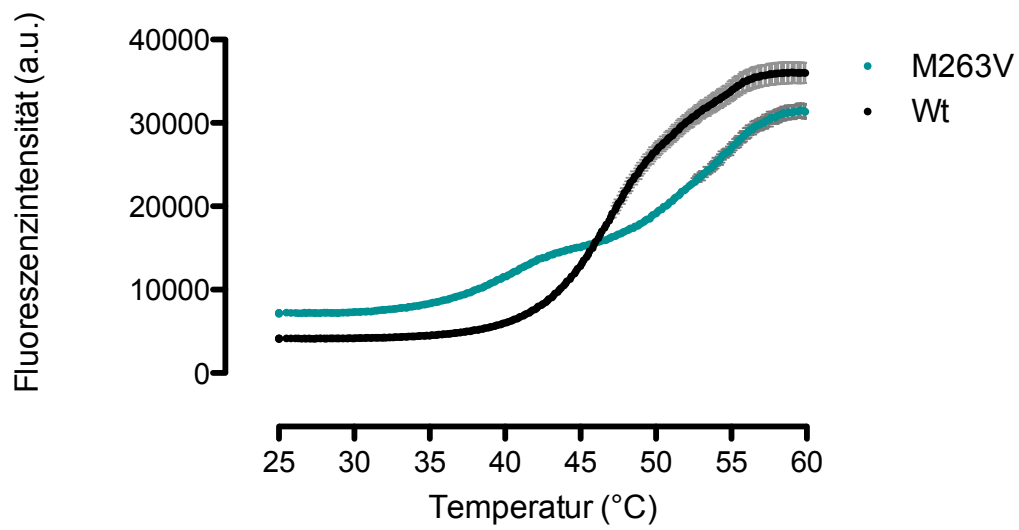
Die in glycerinhaltigem Kaliumphosphatpuffer gereinigten Enzyme (Abbildung 13 D) zeigten ein verändertes Verhalten im DSF-Assay im Vergleich zu den in HEPES gereinigten Varianten. Sowohl für den Wildtyp als auch für die Varianten konnte nur ein Übergang detektiert werden. Interessanterweise war die Fluoreszenz im Grundzustand für die Varianten und den Wildtyp vergleichbar.

A) DSF der Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne



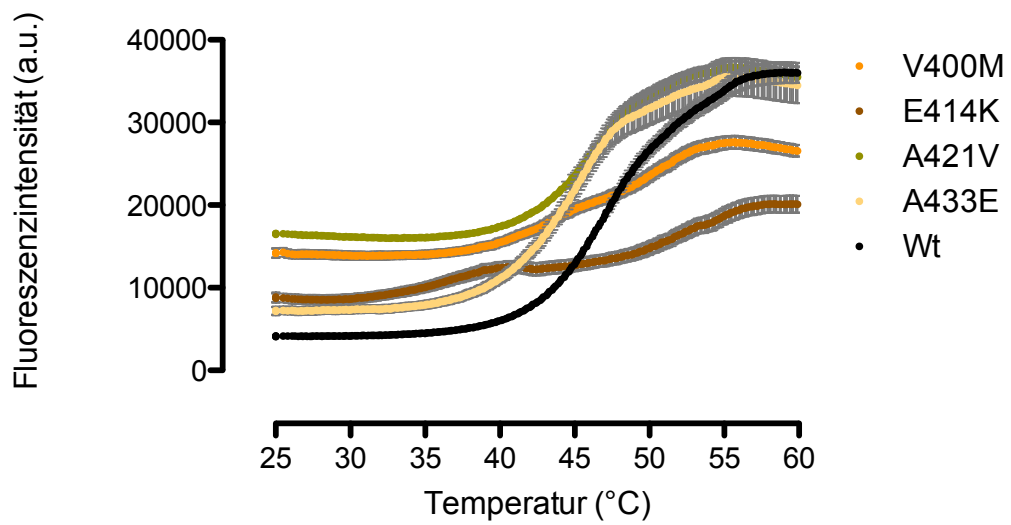
B)

DSF der Varianten der Beta-Faltblatt Domäne



C)

DSF der Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne



D)

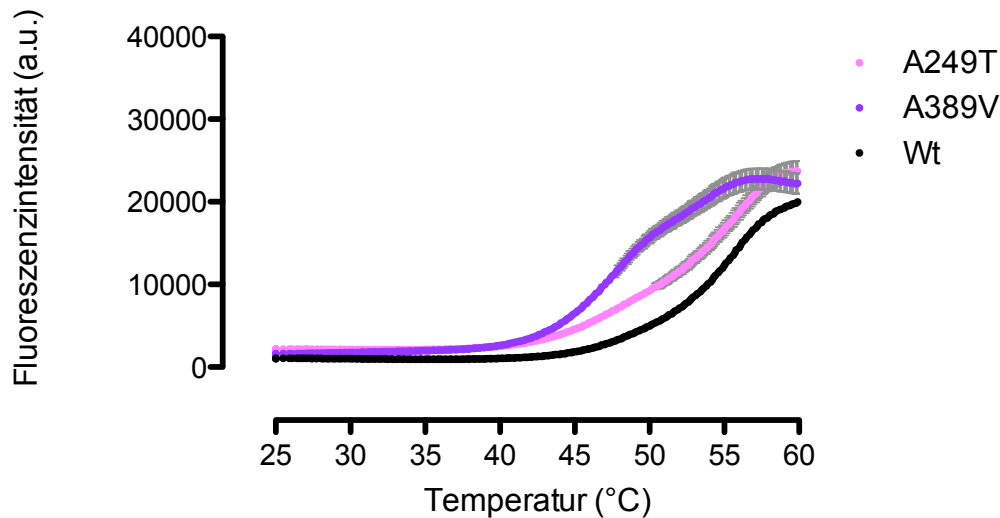
DSF der Varianten A293T und A433V

Abbildung 13: Dargestellt ist die temperaturabhängige Entfaltung der Fusionsproteine des MBP-GCDH-Wildtyps und der Varianten aus der N-terminalen Alpha-Domäne (A), der Beta-Faltblatt Domäne (B) und der C-terminalen Alpha-Domäne (C). Alle in A-C gezeigten Enzyme wurden in HEPES-Puffer gereinigt. Abbildung D zeigt die in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin gereinigten Enzyme. Für alle Assays betrug die SYPRO® Orange Konzentration 1 : 1000, die Konzentration an Fusionsprotein betrug 0,6 mg/ml. Die Messungen erfolgten mit sechs Replikaten. Die Streuung der Einzelmessungen ist als grauer Fehlerbalken eingezeichnet (SEM).

Die Ermittlung der T_m -Werte erfolgte graphisch. Die Linksverschiebung der Entfaltungskurven der Varianten zeigte bereits, dass diese deutlich früher entfalteten als der Wildtyp, was in den niedrigeren Übergangstemperaturen deutlich wurde (Tabelle 4).

Unabhängig von der Wahl des Puffers bei der Aufreinigung von Wildtyp und GCDH-Varianten zeigte sich, dass die Entfaltung der Varianten bereits zu einem früheren Zeitpunkt einsetzt als es für den Wildtyp der Fall war. Das deutet darauf hin, dass die GCDH-Varianten im Vergleich zum Wildtyp instabiler sind, was auch die erhöhte Hydrophobizität zu Beginn der Messung bereits verdeutlicht.

 T_m -Werte von GCDH-Wildtyp und Varianten

| Replikate | WT | | F71S | |
|-------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | T_m erster Übergang | T_m zweiter Übergang | T_m erster Übergang | T_m zweiter Übergang |
| 1 | 46,17 | 54,91 | n.d. | 51,20 |
| 2 | 46,07 | 55,03 | n.d. | 51,24 |
| 3 | 46,34 | 55,25 | n.d. | 51,02 |
| 4 | 46,29 | 54,27 | n.d. | 51,03 |
| 5 | 46,77 | 55,38 | n.d. | 51,19 |
| 6 | 46,43 | 54,70 | n.d. | 51,54 |
| Mittelwert | 46,35 °C | 54,92 °C | n.d. | 51,20 °C |

| | R88C | | R138G | |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | 46,46 | 53,68 | n.d | 52,00 |
| 2 | 46,34 | 53,14 | n.d | 51,94 |
| 3 | 46,26 | 53,70 | n.d | 51,80 |
| 4 | 45,76 | 53,27 | n.d | 50,85 |
| 5 | 46,08 | 53,38 | n.d | 51,76 |
| 6 | 46,00 | 53,93 | n.d | 51,29 |
| Mittelwert | 46,15 °C | 53,52 °C | n.d. | 51,61 °C |

| | E414K | | A421V | |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | 35,65 | 51,51 | 45,61 | 52,83 |
| 2 | 35,83 | 51,27 | 45,54 | 53,13 |
| 3 | 35,67 | 51,40 | 45,73 | 52,59 |
| 4 | 36,55 | 51,02 | 45,73 | 52,48 |
| 5 | 35,83 | 51,61 | 45,52 | 52,73 |
| 6 | 35,44 | 51,49 | 45,63 | 52,50 |
| Mittelwert | 35,83 °C | 51,38 °C | 45,63 °C | 52,71 °C |

| | A433E | |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | 44,01 | 52,69 |
| 2 | 44,05 | 52,32 |
| 3 | 43,76 | 51,88 |
| 4 | 44,33 | 52,14 |
| 5 | 43,96 | 51,78 |
| 6 | 43,60 | 51,94 |
| Mittelwert | 43,95 °C | 52,13 °C |

| Replikate | Wt KPHO | A293T KPHO | A433V KPHO |
|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 54,3 | 52,4 | 48,3 |
| 2 | 54,1 | 52,9 | 48,6 |
| 3 | 54,2 | 52,8 | 48,2 |
| 4 | 54,2 | 53,2 | 48,3 |
| 5 | 54,3 | 53,2 | 47,7 |
| 6 | 54,2 | 53,4 | 48,1 |
| Mittelwert | 54,22 °C | 52,98 °C | 48,2 °C |

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der einzelnen T_m-Werte der GCDH-Varianten im Vergleich zum Wildtyp.

4.4.3. Untersuchung der nativen Fluoreszenz im Grundzustand von Wildtyp und Varianten und nach Zugabe von FAD

In Kapitel 5.4.2. haben wir gezeigt, dass GCDH-Varianten konformationelle Veränderungen aufweisen, die zu einer Verminderung der Stabilität der Proteine und zu einer vermehrten Anfälligkeit gegenüber Hitzestress führen. Es stellt sich also die Frage, ob die Bindung eines kleinen Moleküls zu einer Korrektur der Proteinkonformation und damit zu einer Zunahme der Proteinstabilität führen könnte. Dies wurde bereits für das MCAD-Protein gezeigt (Jank *et al.*, 2014), das erhebliche strukturelle Ähnlichkeit zum GCDH-Protein aufweist. Abbildung 14 zeigt den Einfluss von FAD auf die Fluoreszenz im Grundzustand zu Beginn der DSF Messung. Da die Entfaltung der Proteine unter Zugabe von SYPRO® Orange aufgezeichnet wurde, ist die Fluoreszenz im Grundzustand gleichzeitig ein Maß für die Hydrophobizität der Enzyme, denn es zeigt die Anzahl der an der Oberfläche exponierten hydrophoben Gruppen, an die der Farbstoff binden kann.

Die Hydrophobizität war für alle untersuchten Varianten ohne zusätzliche Gabe von FAD im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Nach Zugabe von FAD konnte für den Wildtyp und für die Varianten R88C, R138G, M263V und A421V eine Abnahme der Hydrophobizität nachgewiesen werden. Für die Variante F71S erhöhte sich der Wert geringfügig unter Zugabe von FAD. Auf die restlichen Varianten zeigte FAD keine Auswirkung auf die Hydrophobizität.

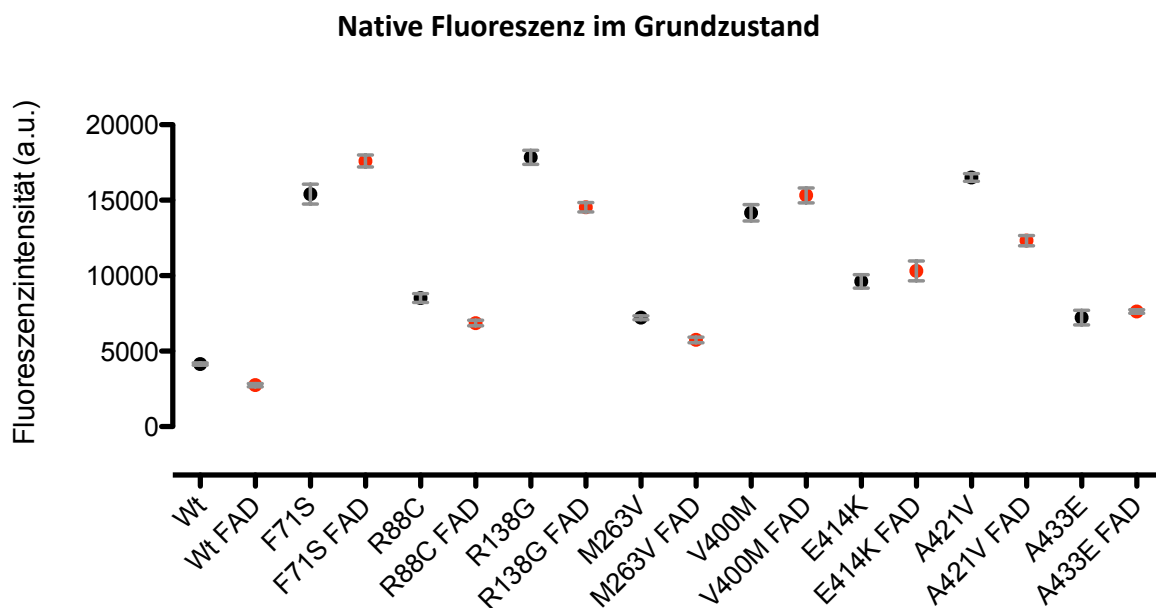


Abbildung 14: Hydrophobizität der in HEPES-Puffer gereinigten Varianten ohne (schwarz) und mit FAD (rot). Dargestellt sind die Werte der Fluoreszenz mit SYPRO® Orange als extrinsischem Fluorophor bei 25 °C als 6-fach Messungen. Die grauen Fehlerbalken zeigen die Streuung der Einzelmessungen, die farbigen Punkte den Mittelwert (SEM).

4.4.4. Untersuchung der thermischen Entfaltung von Wildtyp und Varianten nach Zugabe von FAD

Wir konnten in Kapitel 5.4.3. zeigen, dass sich durch Zugabe von FAD die Fluoreszenz im Grundzustand und somit der Grad der Entfaltung bei niedrigen Temperaturen beeinflussen lässt. Mit der Methode der DSF kann jedoch auch die thermische Entfaltung für höhere Temperaturen und ein eventueller Einfluss auf die Stabilität des Proteins durch Hinzugabe von FAD dargestellt werden. Tabelle 5 fasst die erhobenen Daten aus dem DSF Assay des GCDH-Wildtyps und der Varianten zusammen. Nach Zugabe von FAD konnte sowohl für den Wildtyp, welcher in glycerinfreiem, als auch in glycerinhaltigem Puffer gereinigt wurde, eine Verschiebung der jeweiligen T_m -Werte beobachtet werden. Zu bemerken ist, dass für den Wildtyp in glycerinfreiem Puffer zwei Übergänge und somit Entfaltungsphasen, für den Wildtyp in glycerinhaltigem Puffer ein Übergang detektiert werden konnte.

Für die Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne zeigte sich nach Zugabe von FAD kein erster Übergang mehr bei F71S und R138G. Der T_m -Wert des zweiten Übergangs konnte zu höheren Temperaturen verschoben werden. Für die Variante R88C zeigte sich keine relevante Verschiebung des T_m -Wertes des ersten Überganges. Der T_m -Wert des zweiten Übergangs zeigte jedoch eine Verschiebung zu höheren Temperaturwerten.

Bei der Variante M263V, deren Aminosäureaustausch in der Beta-Falblatt Domäne lokalisiert ist, konnte nach Zugabe von FAD kein erster Übergang detektiert werden. Der T_m -Wert des zweiten Übergangs zeigte sich zu höheren Temperaturen verschoben.

Für die Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne konnten bei allen Varianten nach Zugabe von FAD zwei Übergänge mit entsprechenden T_m -Werten detektiert werden. Für die Varianten A421V und A433E zeigte sich eine Verschiebung beider T_m -Werte zu höheren Temperaturen. Für V400M und E414K ergab sich ausschließlich eine Verschiebung des T_m -Wertes des zweiten Überganges zu höheren Temperaturen.

Hinsichtlich der Varianten, die in glycerinhaltigem Puffer gereinigt wurden, konnte nach der Zugabe von FAD jeweils ein Übergang detektiert werden. Beide Varianten zeigten eine Verschiebung des T_m -Wertes zu höheren Temperaturen.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Proteinkonformation des GCDH-Wildtyps und der untersuchten Varianten durch die Bindung des kleinen Moleküls FAD (wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß) stabilisiert werden konnte.

T_m -Werte des GCDH-Wildtyps und Varianten nach Hinzugabe von FAD

| Replikate | WT | | F71S | |
|-------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|
| | T_m erster Übergang | T_m zweiter Übergang | T_m erster Übergang | T_m zweiter Übergang |
| 1 | 53,78 | 57,78 | n.d. | 51,24 |
| 2 | 54,02 | 58,21 | n.d. | 53,44 |
| 3 | 53,66 | 58,27 | n.d. | 52,69 |
| 4 | 53,55 | 58,00 | n.d. | 52,26 |
| 5 | 53,39 | 58,05 | n.d. | 53,38 |
| 6 | 54,12 | 57,78 | n.d. | 53,08 |
| Mittelwert | 53,75 °C (ΔT_m: 7,4 °C) | 58,02 °C (ΔT_m: 3,1 °C) | n.d. | 52,68 °C (ΔT_m: 1,48 °C) |

| R88C | | | R138G | |
|-------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | 45,77 | 53,52 | n.d. | 54,19 |
| 2 | 46,48 | 56,62 | n.d. | 54,96 |
| 3 | 46,04 | 54,52 | n.d. | 54,36 |
| 4 | 45,99 | 53,64 | n.d. | 53,72 |
| 5 | 45,91 | 53,97 | n.d. | 54,45 |
| 6 | 45,75 | 54,05 | n.d. | 54,49 |
| Mittelwert | 45,99 °C (ΔT_m: -0,16 °C) | 54,39 °C (ΔT_m: 0,87 °C) | n.d. | 54,36 °C (ΔT_m: 2,75 °C) |

| M263V | | | V400M | |
|-------------------|--------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | n.d. | 53,81 | 42,15 | 53,16 |
| 2 | n.d. | 53,70 | 42,55 | 53,60 |
| 3 | n.d. | 54,87 | 42,40 | 53,49 |
| 4 | n.d. | 54,51 | 42,05 | 53,35 |
| 5 | n.d. | 54,95 | 42,30 | 53,16 |
| 6 | n.d. | 55,15 | 42,51 | 53,85 |
| Mittelwert | n.d. | 54,50 °C (ΔT_m: 1,51 °C) | 42,33 °C (ΔT_m: -0,14 °C) | 53,44 °C (ΔT_m: 2,96 °C) |

| E414K | | | A421V | |
|-------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | 35,34 | 52,94 | 46,15 | 53,45 |
| 2 | 35,19 | 52,70 | 46,15 | 53,06 |
| 3 | 34,84 | 52,92 | 46,33 | 53,04 |
| 4 | 36,17 | 52,83 | 45,94 | 52,93 |
| 5 | 35,15 | 52,67 | 46,55 | 53,53 |
| 6 | 35,39 | 51,48 | 46,37 | 53,47 |
| Mittelwert | 35,35 °C (ΔT_m: -0,03 °C) | 52,59 °C (ΔT_m: 1,21 °C) | 46,25 °C (ΔT_m: 0,62 °C) | 53,25 °C (ΔT_m: 0,54 °C) |

| A433E | | |
|-------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Replikate | T _m erster Übergang | T _m zweiter Übergang |
| 1 | 43,69 | 52,50 |
| 2 | 44,26 | 52,18 |
| 3 | 44,34 | 52,22 |
| 4 | 44,29 | 52,37 |
| 5 | 44,07 | 52,15 |
| 6 | 44,03 | 52,14 |
| Mittelwert | 44,11 °C (ΔT_m: 0,16 °C) | 52,26 °C (ΔT_m: 0,13 °C) |

| Replikate | Wt KPHO | A293T KPHO | A433V KPHO |
|-------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1 | 56,2 | 55,6 | 48,9 |
| 2 | 56,1 | 55,8 | 48,3 |
| 3 | 56,2 | 56 | 48,2 |
| 4 | 56,1 | 56 | 48,3 |
| 5 | 56,1 | 55,8 | 49 |
| 6 | 56,1 | 55,7 | 48,2 |
| Mittelwert | 56,13 °C (ΔT_m: 1,91 °C) | 55,82 °C (ΔT_m: 2,84 °C) | 48,48 °C (ΔT_m: 0,28 °C) |

Tabelle 5: Übersicht der T_m -Werte der GCDH-Varianten im Vergleich zum Wildtyp unter Zugabe von FAD mit einer finalen Konzentration von 10 μ M. In Klammern sind die Temperaturunterschiede zu den korrespondierenden T_m -Werten von Wildtyp und Varianten ohne FAD angegeben.

4.5. Klonierung der eukaryoten Expressionskonstrukte des *GCDH*-Wildtyps sowie von 14 *GCDH*-Varianten

4.5.1. Ortsspezifische Mutagenese zur Generierung von 14 varianten *GCDH* Expressionsplasmiden zur Analyse der eukaryoten Expression

Zur Generierung von Expressionsplasmiden für die Zellkultur mussten die 14 *GCDH*-Varianten zunächst mittels ortsspezifischer Mutagenese generiert werden. Als DNA-*template* für die Mutagenese diente der pENTRY Klon des *GCDH*-Wildtyps. Die Kontrolle der neu generierten pENTRY Varianten erfolgte zunächst als *proof-of-principle* durch einen Restriktionsverdau an einer Auswahl von Varianten sowie anschließender Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 15).

Ergebnis der Site Directed Mutagenesis

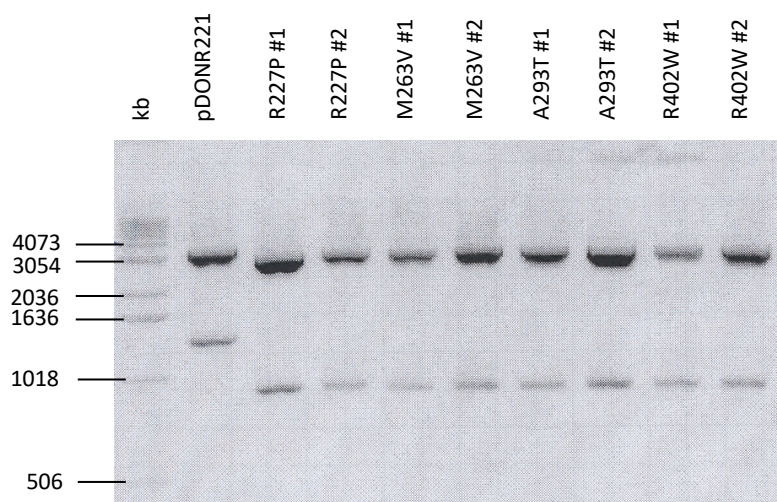


Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese einer beispielhaften Auswahl an pENTRY-Klonen von Wildtyp und Varianten nach ortsspezifischer Mutagenese und anschließendem Restriktionsverdau mit *HpaI* und *BamHI* im Sinne eines *proof-of-principle*. Als Kontrolle wurde der pDONR221 Vektor verwendet. Die restlichen Varianten wurden keinem gesonderten Restriktionsverdau unterzogen, sondern direkt durch Sequenzierung überprüft.

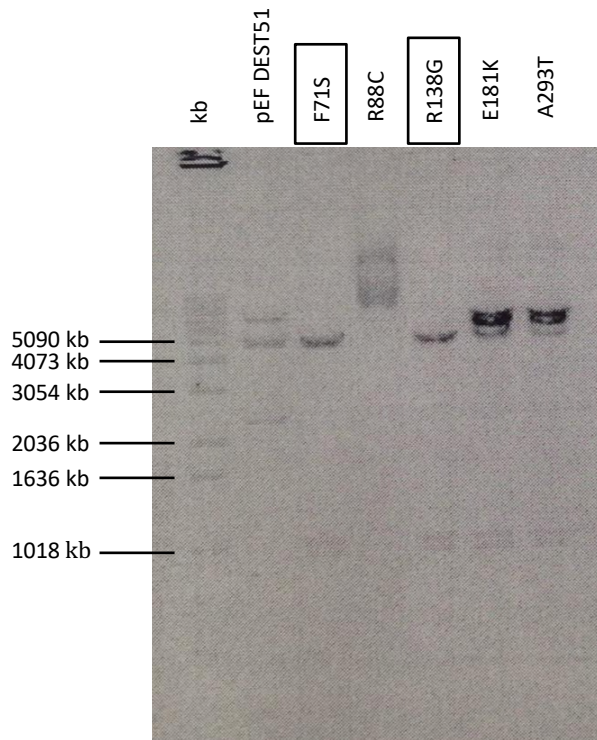
Als Kontrolle wurde der „leere“ pDONR221 Vektor verwendet. Die erwarteten Fragmentgrößen nach dem Restriktionsverdau waren 1333 und 3429 bp. Für die neu klonierten GCDH-Varianten wurden Fragmente von 917 und 2946 bp errechnet. Abbildung 15 zeigt die korrekten Fragmente mit der berechneten Größe für alle neuen Konstrukte und den Leervektor. Das Vorliegen der erwünschten missense Mutationen in den hier dargestellten und den restlichen neu klonierten Konstrukten wurde abschließend jeweils durch Sequenzierung überprüft, wobei kein gesonderter Restriktionsverdau der hier nicht dargestellten Varianten erfolgte.

4.5.2. LR-Rekombinationsreaktion von *GCDH*-Wildtyp und Varianten in den Zielvektor pEF DEST51

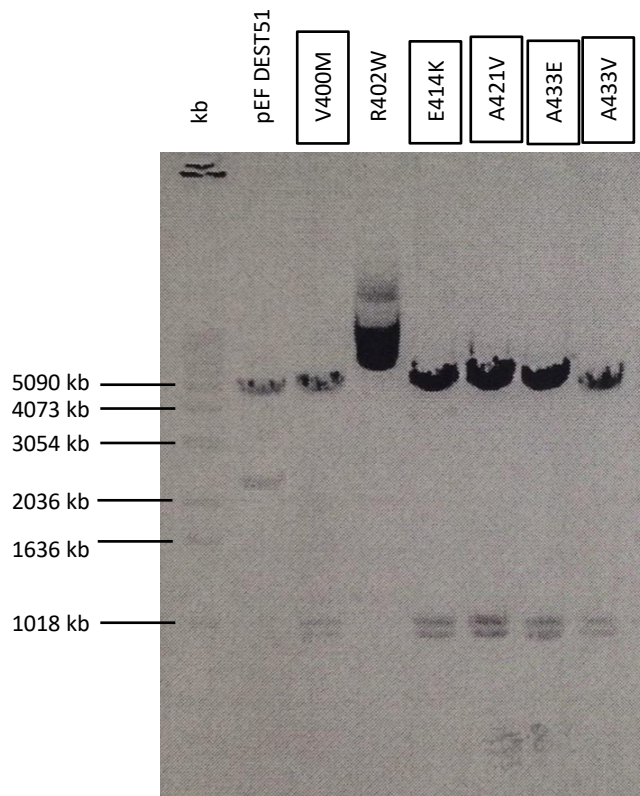
Die nach Sequenzierung positiven und korrekten pENTRY Klone von Wildtyp und Varianten aus Kapitel 5.5.1. wurden in der Gateway LR-Rekombinationsreaktion eingesetzt, um die Expressionskonstrukte für die Zellkultur zu generieren. Hierbei wird das *GCDH*-Gen durch eine Rekombinationsreaktion aus dem pDONR221 Vektor in einen neuen Zielvektor kloniert. Als Zielvektor diente der pEF DEST51 Vektor, der für einen C-terminalen V5- und His-Tag kodiert. Eine erfolgreiche Rekombinationsreaktion wurde durch einen anschließenden Restriktionsverdau nachgewiesen (Abbildung 16 A - D). Erwartet wurden DNA-Fragmente von 5118 bp, 1034 bp und 946 bp.

LR-Reaktion der pENTRY-Klone in den Zielvektor pEF DEST51

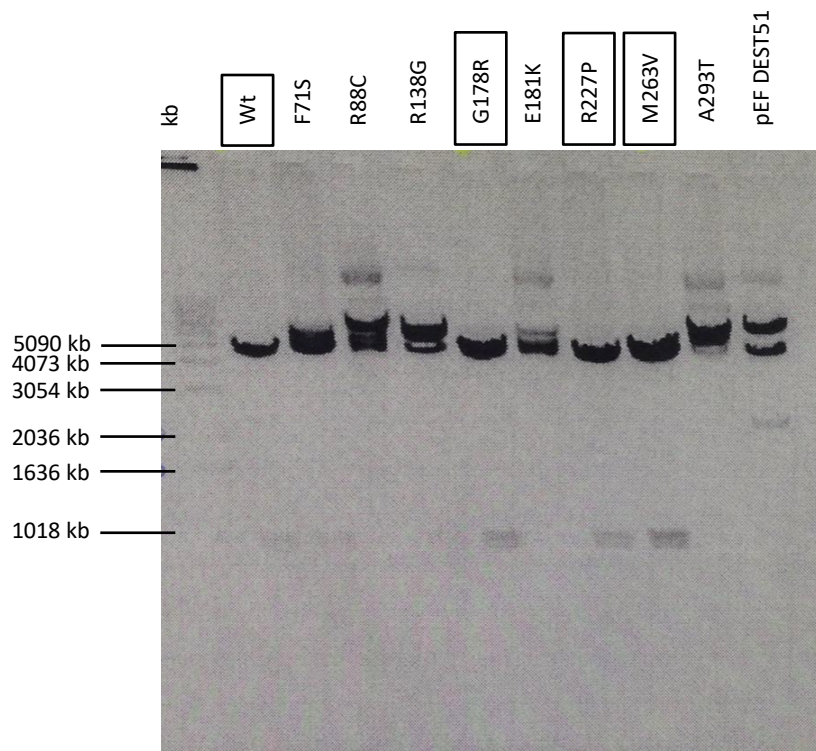
A)



B)



C)



D)

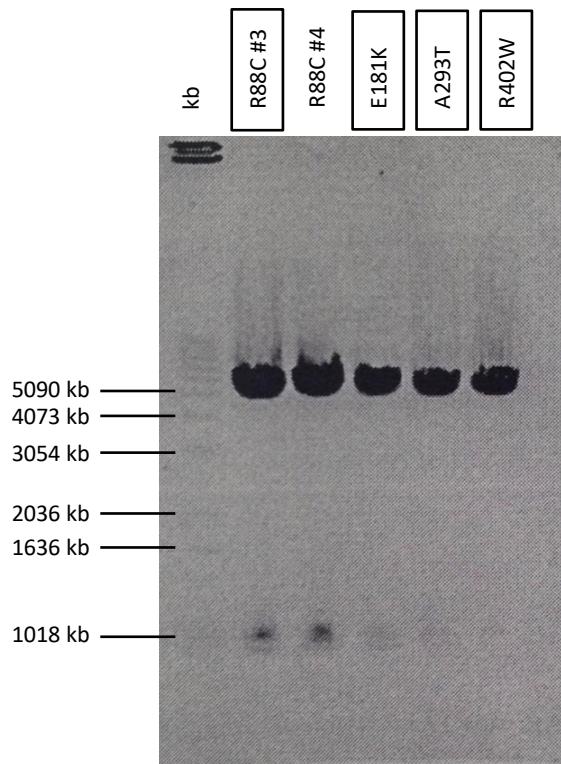


Abbildung 16: Agarose-Gelelektrophorese aller pEF DEST51 Konstrukte nach LR-Rekombinationsreaktion und Restriktionsverdau mit *Apal*. Als Kontrolle wurde der leere pEF DEST51 Vektor verwendet. Die korrekten DNA Fragmente nach erfolgreicher Insertierung sind 5118 bp, 1034 bp und 946 bp. Die markierten Konstrukte zeigten die korrekte Fragmentengröße, was eine erfolgreiche LR-Reaktion darstellte. Die markierten Klone wurden für die Folgeexperimente verwendet.

Wie in Abbildung 16 A gezeigt, konnte eine erfolgreiche LR-Reaktion im ersten Versuch nur für die Varianten F71S und R138G nachgewiesen werden. Die LR-Reaktion wurde daher solange wiederholt (Abbildung 16 B – D), bis alle 14 Varianten und der Wildtyp erfolgreich im pEF DEST Expressionsvektor vorlagen. Eine erneute Sequenzierung war nicht notwendig, da die Rekombinationsreaktion keine Veränderung in der Plasmid-DNA erzeugt.

4.6. Untersuchung des Expressions-, Aggregations- und Oligomerisierungsverhaltens des GCDH-Wildtyps und von 14 GCDH-Varianten in COS-7-Zellen

4.6.1. Untersuchung des Expressionsniveaus von GCDH-Wildtyp und von 14 GCDH-Varianten in COS-7-Zellen

Zum Vergleich des Expressionsniveaus im eukaryoten System erfolgte die transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit dem GCDH-Wildtyp und mit den 14 GCDH-Varianten. Nach Inkubation über 48 Stunden und Aufbereitung der Proben in lösliche und Pelletfraktion wurden diese auf ein denaturierendes LDS-Gel aufgetragen und im Anschluss per Westernblot über den V5-Tag detektiert (Abbildung 16). Als Kontrollen und zum Ausschluss

einer unspezifischen Bindung des V5-Antikörpers dienten nicht-transfizierte Zellen und der transfizierte GCDH-Wildtyp. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Für die nicht transfizierten Zellen waren - wie erwartet - keine Banden zu detektieren. Für den Wildtyp war in der löslichen Phase eine Bande bei circa 55 kDa nachzuweisen, bei der es sich um das GCDH-Monomer handelt. Zu beobachten waren zudem eine schmale V5-positive Bande bei 55 kDa und eine weitere bei circa 130 kDa.

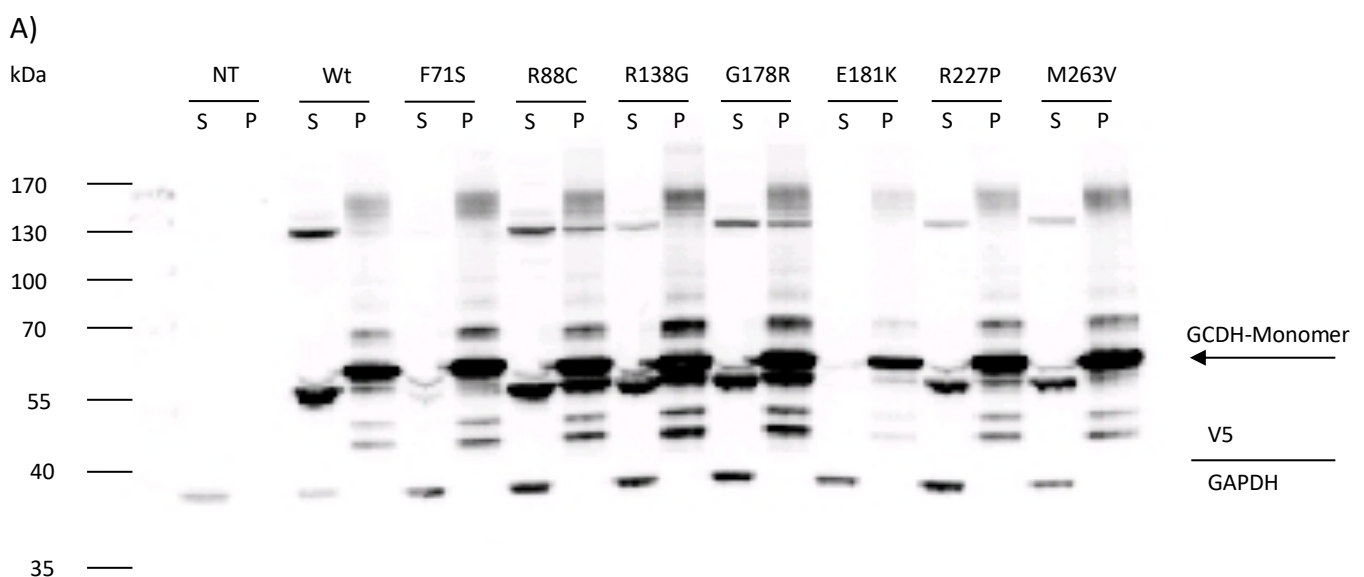
Hierbei könnte es sich um prämaures GCDH-Protein und kovalent gebundene höhere Oligomere handeln. Für die Pelletfraktion zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis der Bandenintensität der Bande bei circa 55 kDa und derjenigen bei 130 kDa, was darauf hindeutet, dass die Pelletfraktion einen höheren Anteil an nicht-prozessierter GCDH enthält. Bei den zusätzlich detektierten Banden handelt es sich vermutlich um Aggregate, höhere Oligomere und Degradationsprodukte.

Das Expressionsniveau von Wildtyp und Varianten war sehr unterschiedlich. Wildtyp, R88C, R138G, G178R, R227P, M263V, V400M, E414K, A433E und A433V zeigten eine vergleichbare Expression an GCDH-Protein in der löslichen Fraktion. Für F71S, E181K, R402W und A421V war dagegen kaum lösliches Protein nachweisbar.

Für die Pelletfraktion war ein sehr differenziertes Bild der Varianten zu beobachten. Die stärkste Bande zeigte sich nahezu konstant für alle Varianten bei 55 kDa, d.h. auf Höhe der GCDH-Monomere, wobei die Bande bei den Varianten R88C, R138G, G178R, V400M, E414K, A433E deutlich stärker ausgeprägt war, als im Falle des Wildtyps.

Von Interesse war auch die Bande der prozessierten GCDH unter der 55 kDa Bande. Sie war für den Wildtyp und die Varianten F71S, E181K, M263V, A293T, R402W und A421V kaum nachweisbar, für R88C, R138G, G178R, R227P, V400M, E414K, A433E und A433V dagegen sehr stark ausgeprägt. Für die vier Varianten F71S, E181K, R402W und A421V konnten ausschließlich GCDH-Banden in der Pelletfraktion detektiert werden. Der lösliche GCDH-Anteil war nicht nachweisbar.

Westerblot des GCDH-Wildtyps und der Varianten aus COS-7 Zellen



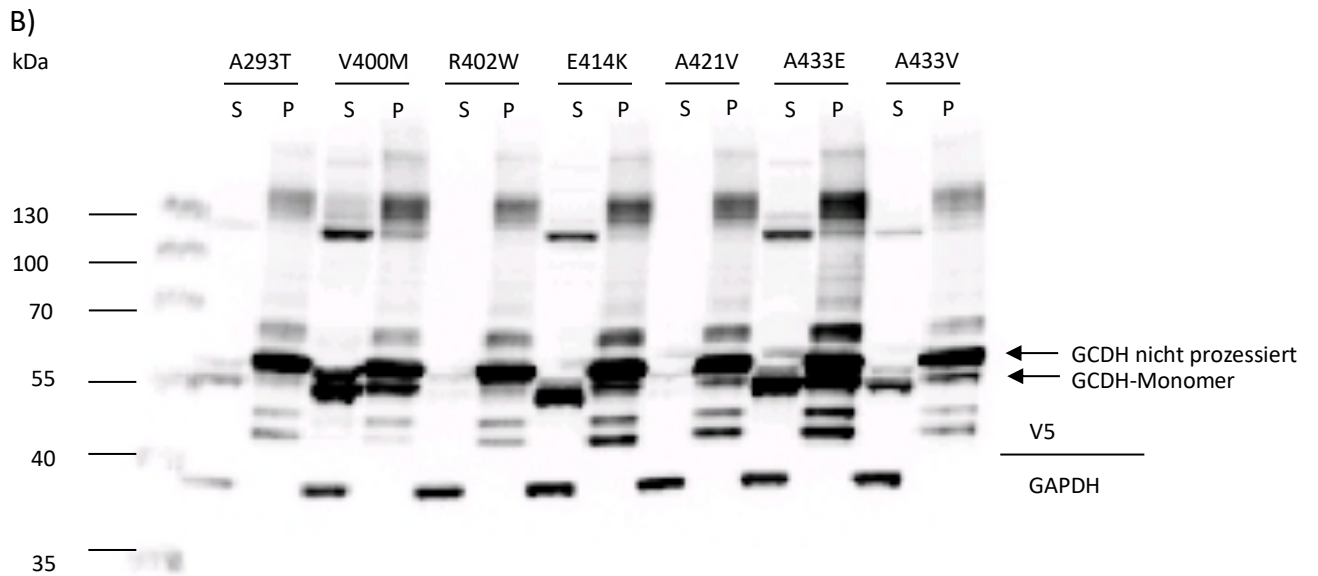
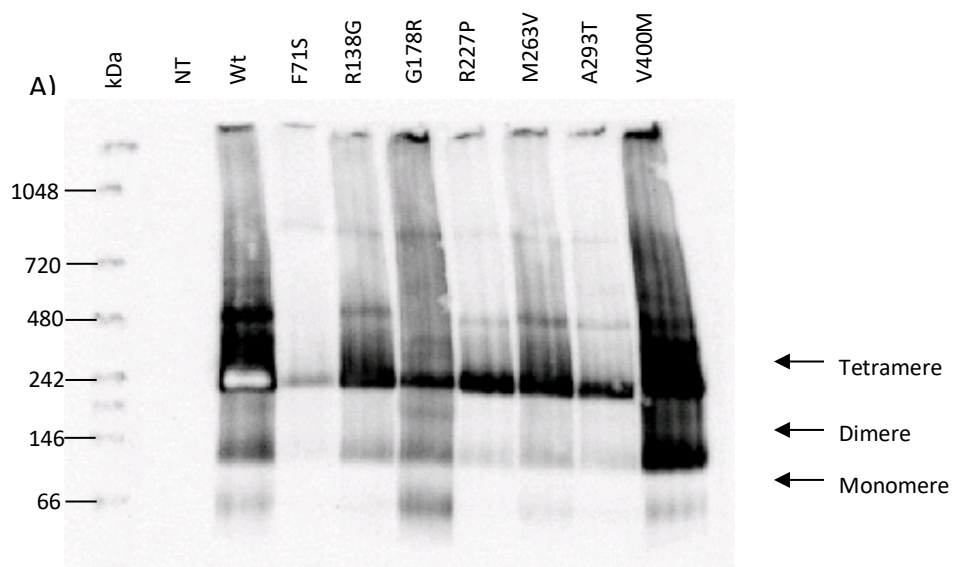


Abbildung 17: Westernblot nach LDS-Gelelektrophorese der mit GCDH-Wildtyp und Varianten transient transfizierten COS-7 Zellen. Die Zellkulturproben wurden nach der Lyse in eine lösliche (S) und in eine Pelletfraktion (P) aufgeteilt und die GCDH-Proteine über den C-terminalen V5-Tag detektiert. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte Zellen (NT) verwendet, als Positivkontrolle der GCDH-Wildtyp (Wt). Die Ladungskontrolle erfolgte mittels Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Das GCDH-Monomer hat eine Größe von 48,1 kDa und liegt als lösliches Protein vor.

4.6.2. Untersuchung des Aggregations- und Oligomerisierungsverhaltens von GCDH-Wildtyp und von 14 GCDH-Varianten in COS-7-Zellen

Westernblot des GCDH-Wildtyps und Varianten aus COS-7 Zellen (BN-PAGE)



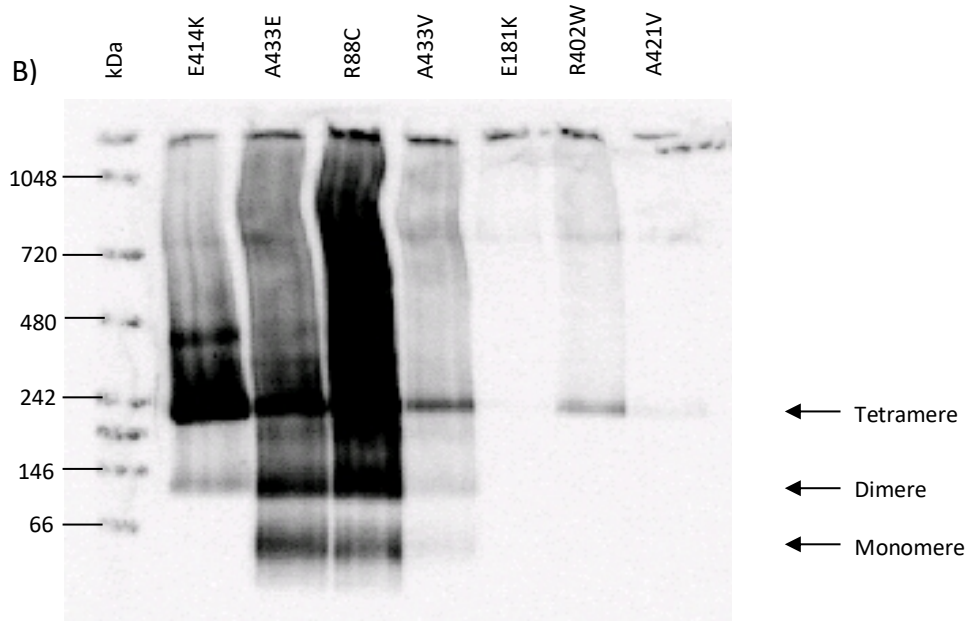


Abbildung 18: Westernblot nach BN-PAGE der GCDH-Varianten nach transienter Expression in COS-7 Zellen. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte COS-7 Zellen verwendet. Die Positivkontrolle erfolgte durch den GCDH-Wildtyp. GCDH-Tetramere laufen bei 192,4 kDa, Dimere bei 96,2 kDa, Monomere bei 48,1 kDa. Die Varianten wurden je nach Expressionsniveau, mit unterschiedlicher Proteinmenge aufgetragen (Gesamtproteinmenge von 19,0 μ g Wt bis 36,8 μ g NT). Die Detektion der GCDH-Proteine erfolgte durch einen Antikörper gegen den C-terminal exprimierten V5-Tag.

Zur Untersuchung des Aggregations- und des Oligomerisierungsverhaltens im eukaryoten System erfolgte die Aufbereitung der Zellkulturproben für eine BN-PAGE.

Abbildung 18 zeigt einen stark exprimierenden Wildtyp mit einem hohen Anteil an Tetrameren, die mit Dimeren im Gleichgewicht stehen. Zudem war ein Anteil mit höhergradigen Oligomeren und Monomeren nachweisbar. Die Varianten zeigten ein differenziertes Bild in Bezug auf das Gleichgewicht zwischen Tetrameren, Dimeren, Monomeren und Aggregaten. Bei den Varianten F71S, R138G, R227P, M263V, A293T, V400M, E414K, A433V und R402W lag das Gleichgewicht vermehrt auf der Seite der Tetramere. Auch G178R zeigte mehrheitlich Tetramere, wobei auch starke Dimer- und Monomerbanden zu detektieren waren. Eine starke Dimerbande zeigten R88C und V433E, wobei R88C wie auch V400M durch einen hohen Aggregatanteil auffielen, die sich über die gesamte Spur verteilten. Die Expression von E181K und A421V gelang in COS-7 Zellen nicht.

4.7. Vergleich des pro- und eukaryoten Expressions-, Aggregations- und Oligomerisierungsverhaltens von GCDH-Wildtyp und Varianten

Die Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne unterschieden sich im prokaryotischen System deutlich bezüglich Oligomerisierung und ihrem Verhalten gegenüber Hitzestress. Für F71S zeigten sich nach der Aufreinigung vor allem Aggregate, R88C lag vermehrt als Dimere vor, R138G mehrheitlich als Tetramere. Auch bezüglich des Aggregationsverhaltens wiesen

die Varianten starke Unterschiede auf. Für F71S war das Fehlen der ersten Aggregationsphase zu beobachten. R88C zeigte ein ähnliches Aggregationsverhalten wie der GCDH-Wildtyp. Für R138G fehlte die erste Aggregationsphase und das Aggregationsplateau war kaum vom Aggregationsanstieg zu unterscheiden. Der Beginn der thermischen Denaturierung zeigte, dass F71S bereits im Grundzustand partiell entfaltet vorliegt. Der zweite Übergang der Denaturierung setzte dann auch deutlich früher ein, als der des GCDH-Wildtyps. Für R88C war der erste Übergang mit dem GCDH-Wildtyp vergleichbar, der T_m -Wert des zweiten Übergangs war jedoch bei niedrigeren Temperaturen zu beobachten. R138G zeigte keinen ersten Übergang und einen niedrigeren T_m -Wert des zweiten Übergangs im Vergleich zum Wildtyp. Alle T_m -Werte, mit Ausnahme des T_m -Wertes des ersten Überganges von R88C, konnten durch FAD erhöht werden, wobei jedoch für F71S und R138G nach Zugabe von FAD lediglich der zweite Übergang detektiert werden konnte. Die Hydrophobizität konnte mit Ausnahme von F71S durch Zugabe von FAD verringert werden. Im eukaryoten System zeigte F71S ein niedrigeres Expressionsniveau in der löslichen Phase und nur einen geringen Anteil an Tetrameren. R138G war mit dem Wildtyp vergleichbar und lag vermehrt als Tetramer vor. Für R88C zeigten sich vornehmlich Aggregate und Dimere. Die Varianten, deren Aminosäureaustausch in der Beta-Faltblatt Domäne lokalisiert ist, zeigten ein anderes Bild. Die Varianten G178R und E181K lagen vornehmlich als Aggregate und Monomere vor. Einschränkend muss hier jedoch das Vorliegen von abgespaltenem MBP erwähnt werden. R227P zeigte eine sehr geringe Expression, weswegen diese Variante in den Folgeversuchen nicht untersucht werden konnte. Lediglich M263V konnte exprimiert werden und wies vornehmlich Tetramere und Dimere auf. Bezüglich des thermischen Aggregationsverhaltens von M263V war ein Fehlen des ersten Anstiegs der *Turbidity*-Werte im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Das zweite Plateau war kaum vom Aggregationsanstieg zu unterscheiden. Hinsichtlich der thermischen Denaturierung zeigten sich deutlich niedrigere T_m -Werte für beide Übergänge im Vergleich zum Wildtyp. Nach Zugabe von FAD verschwand der erste Übergang, der T_m -Wert des zweiten Übergangs konnte jedoch stabilisiert werden. Die native Fluoreszenz im Grundzustand konnte durch Zugabe von FAD reduziert werden, wodurch das Protein partiell stabilisiert werden konnte. Im eukaryoten Modell konnten alle Varianten der Beta-Faltblatt Domäne untersucht werden. E181K fiel auch hier durch starke Expressionsprobleme auf. Die restlichen Varianten waren in der löslichen GCDH-Fraktion mit dem Wildtyp vergleichbar und das Gleichgewicht der Oligomerisierung lag auf der Seite der Tetramere. Für V400M und E414K aus der C-terminalen Alpha-Domäne resultierte nach der Aufreinigung ein kleinerer Anteil Tetramere und ein höherer Anteil an Dimeren. R402W schien vornehmlich Aggregate und Monomere aufzuweisen, weswegen diese Variante in den Folgeexperimenten nicht untersucht werden konnte. A421V und A433E hingegen zeigten vor allem Dimere. Das thermische Aggregationsverhalten war für alle untersuchten Varianten biphasisch mit unterschiedlichem Beginn des ersten Anstiegs der *Turbidity*-Werte im Vergleich zum Wildtyp. In der thermischen Denaturierung waren die T_m -Werte beider Übergänge geringer als die des Wildtyps. Die Zugabe von FAD führte zum Anstieg der T_m -Werte von V400M und E414K im zweiten Übergang, für A421V und A433E in beiden Übergängen. Zudem konnte FAD die Hydrophobizität von A421V reduzieren. Im eukaryoten System konnten alle Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne untersucht werden. R402W und A421V zeigten ein deutlich niedriger ausgeprägtes Expressionsniveau als der Wildtyp. Die restlichen Varianten waren mit dem Wildtyp vergleichbar. V400M, E414K und A433E lagen in den Untersuchungen zum Oligomerisierungsverhalten vornehmlich als Tetramere vor, wobei sich auch ein hoher Aggregatanteil für V400M und A433E nachweisen ließ.

Letztendlich zeigten sich für die Varianten, die in glycerinhaltigen Kaliumphosphatpuffer gereinigt wurden, interessante Eigenschaften im Vergleich zu den Varianten in HEPES-Puffer. A293T und A433V zeigten Tetramere, wobei der Anteil für A293T deutlich höher ausfiel. Zudem waren für beide Varianten auch Aggregate nachweisbar. A433V zeigte darüber hinaus einen ausgeprägten Dimerpeak, der Anteil an Monomeren war jedoch für die Variante A293T höher. Bezüglich der thermischen Aggregation zeigte A433V bereits im Grundzustand erhöhte *Turbidity*-Werte im Vergleich zu A293T, wobei beide Varianten bereits im Grundzustand höhere *Turbidity*-Werte aufwiesen als der Wildtyp. Der Verlauf der Aggregationskurve war einphasisch für beide Varianten und beide Varianten aggregierten bei niedrigeren Temperaturen als der Wildtyp. Hinsichtlich der thermischen Denaturierung konnte eine vergleichbare Fluoreszenz im Grundzustand zum Wildtyp beobachtet werden. Die Kurve zeigte auch hier einen einphasischen Verlauf. Die Entfaltung der Enzyme erfolgte bei niedrigeren Temperaturen als der Wildtyp, wobei A433V zusätzlich bei niedrigeren Temperaturen entfaltete als A293T. Interessanterweise konnte durch die Zugabe von FAD für die Varianten A293T und A433V eine Erhöhung des T_m -Wertes und somit eine Stabilisierung des Proteins gegenüber Hitzestress nachgewiesen werden. Im eukaryoten System zeigte die Variante A433V ein deutlich besseres Expressionsniveau in der löslichen Fraktion als A293T. Hinsichtlich der Oligomerisierung zeigten sich im eukaryoten System für beide Varianten vornehmlich Tetramere.

5. Diskussion

Die GCDH, ein mitochondriales Flavoprotein, katalysiert die oxydative Decarboxylierung von Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA und ist Teil des Aminosäurekatabolismus von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan. Der Glutaryl-CoA-Dehydrogenasemangel resultiert in der seltenen, autosomal-rezessiv vererbten, neurometabolischen Erkrankung GA1, die sich in ein perinatales, nahezu asymptomatisches und ein symptomatisches Stadium gliedert (Busquets *et al.*, 2000b). In ca. 75% ist bei Geburt eine Makrozephalie das einzige Symptom (Bjugstad *et al.*, 2000). Weitere Symptome sind unspezifisch und bestehen vor allem in Hypotonie und Irritabilität (Baric *et al.*, 1998). Allerdings sind auch in diesem weitgehend asymptomatischen Stadium bereits charakteristische Veränderungen, wie beispielsweise eine Affektion der Basalganglien, eine fronto-temporale Atrophie/Hypoplasie oder subdurale Hygrome mittels neuroradiologischer Bildgebung nachweisbar (Neumaier-Probst *et al.*, 2004). Unbehandelt entwickeln ca. 90% der Patienten im Rahmen einer katabolen Stoffwechsellage, vermutlich durch die Akkumulation der neurotoxischen Metabolite GA und 3-OHGA, eine enzephalopathische Krise mit striataler Schädigung, häufig epileptischen Anfällen und metabolischer Dekompensation innerhalb der ersten 6 Lebensjahre, meist jedoch zwischen dem 3. und 36. Lebensmonat. Diese enzephalopathische Krise wiederum führt zu einer komplexen, vornehmlich dystonischen Bewegungsstörung, welche irreversibel ist (Baric *et al.*, 1998; Pusti *et al.*, 2014; Boy *et al.*, 2019). Eine schwere Dystonie ist in der Folge die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität aufgrund von chronischen oromotorischen, gastroösophagealen, skelettalen und respiratorischen Komplikationen (Strauss *et al.*, 2003b). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Prävention der enzephalopathischen Krise.

Pathophysiologisch bestehen auf zellulärer Ebene Hypothesen zum Zelltod von Astrozyten aufgrund der Hemmung des Tricarboxylsäure-Zyklus durch GA und 3-OHGA über anaplerotische Transportprozesse von Succinat oder die Hemmung der Glutaminolyse unter Glucosemangel (Lamp *et al.*, 2011; Komatsuzaki *et al.*, 2018). Auch ein Zelltod von Astrozyten durch 3-OHGA mit daraus resultierender Glutamin-Synthetase-Defizienz und sekundärer Hyperammonämie, die zum Zelltod anderer Neurone führt, wurde in einem 3D *in vitro* Modell mit neuronalem Gewebe von Ratten beschrieben (Jafari *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde die pränatale Beeinträchtigung der Entwicklung von Gefäßen mit der Steigerung der Vulnerabilität von Endothelstrukturen und sekundären Hygromen postuliert (Mühlhausen *et al.*, 2004). Tierexperimentell konnten Seminotti *et al.* eine Störung der Energie- und Redoxhomöostase in striatalen Neuronen von *GCDH*^{-/-} Mäusen unter inflammatorischen Bedingungen, induziert durch Chinolinsäure und einer lysinreichen Kost darstellen (Seminotti *et al.*, 2016). Anhand von neonatalen und frühkindlichen Neuronenaggregaten von *GCDH*^{-/-} Mäusen konnten Cudré-Cung *et al.* unter metabolischem Stress erhöhte Konzentrationen für GA und 3-OHGA, mit zusätzlicher Erhöhung von Ammonium, morphologischen Veränderungen der Zellaggregate sowie eine Reduktion von Chemokinen nachweisen, was als möglicher Beitrag für den Neuronenschaden von GA1-Patienten gewertet wurde (Cudré-Cung *et al.*, 2019). Schmiesing, *et al.* konnten durch Protein-Glutarylierung – einer posttranslationalen, nicht enzymatischen Proteinmodifikation beim Vorliegen eines Überschusses an Glutaryl-CoA (Tan *et al.*, 2014) – eine Reduktion der Enzymaktivität, der Protein-Protein-Interaktion und der Stabilität von mitochondrialen Enzymen im Mausmodell nachweisen (Schmiesing *et al.*, 2018). Dies fügt sich gut in die Hypothese der gestörten Interaktionen des GCDH-Proteins mit anderen mitochondrialen Matrixproteinen wie der Dihydrolipoamid-S-

Succinyltransferase (DLST) und der Beta-Untereinheit des Elektron-Transfer-Flavoproteins (ETFB) ein (Schmiesing *et al.*, 2014). Andere Mausmodelle konzentrierten sich auf die *stroke-like* Symptomatik der Erkrankung aufgrund der striatalen Nekrose. Diese wurde durch eine Applikation von 3-Nitropropionsäure (NPA) herbeigeführt, das zu einem abrupten Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, Endothel- und Astrozytenschwellung mit Lumenverkleinerung und somit zu sekundären Mikrothromben führte. In der Folge resultierte oxidativer Stress und eine lokal entzündliche Reaktion, was zu einer Schädigung des neuronalen Gewebes führte, wobei 3-OHGA als das relevante Zytotoxin angesehen wurde. Die Schädigung schien nur für maturierendes, neuronales Gewebe von heranwachsenden Mäusen möglich, wobei das Ausmaß der striatalen Schädigung demjenigen der GA1 weitgehend glich. Die Autoren betonten hierbei jedoch den spekulativen Charakter dieses Ansatzes bei bisher unbekanntem Wechselwirkungen, das dieses *in vivo* Modell in sich trägt (Strauss *et al.*, 2003a).

Darüber hinaus wurde Proteinfaltung und die Beeinträchtigung der Tertiärstruktur der GCDH durch *missense* Mutationen eine Rolle in der Krankheitsentstehung der GA1 zugesprochen (Keyser *et al.*, 2008). Aktuell werden 235 pathogene Mutationen in der *Leiden Open Variation Database* veröffentlicht und gelistet (letzter Zugriff am 29.06.2020). Die häufigsten Varianten scheinen E365K, P248L, R402W und A421V zu sein, mit einer Prävalenz von 48 – 55 % in einer Kohorte von deutschen Neugeborenen, wobei E365K und P248L ausschließlich bei Patienten mit türkischem Migrationshintergrund, A421V nur bei Patienten mit deutschem Hintergrund und R402W - die häufigste Mutation von Kaukasiern - in allen ethnischen Gruppen zu finden war (Kölker *et al.*, 2007). R402W geht zudem mit keiner detektierbaren Restenzymaktivität einher, weswegen diese Variante als eine der schwersten Mutationen eingeordnet wurde (Christensen *et al.*, 2004). Zu beachten ist jedoch, dass keine Korrelation zwischen genetischem bzw. biochemischem Phänotyp mit dem klinischen Phänotyp dargestellt werden konnte und die klinische Variabilität des Verlaufs interindividuell - bei Vorliegen der gleichen Variante - deutlich erhöht ist (Kölker *et al.*, 2007) (Christensen *et al.*, 2004), was eine Aussage über den Schweregrad einer Variante problematisch erscheinen lässt. Auch *compound* heterozygote Varianten konnten für die GCDH dargestellt werden, z. B. S139L und P248L, für die eine Restaktivität von 20 % *in vitro* sowie interessanterweise ein Ansprechen auf Riboflavin *in vivo* dargestellt werden konnte, im Sinne einer Reduktion der Ausscheidung von GA und 3-OHGA (Chalmers *et al.*, 2006).

Seit Einführung des flächendeckenden, erweiterten Neugeborenencreenings in Deutschland im Jahr 2005 konnten bezüglich natal nur schwer diagnostizierbarer Erkrankungen, wie der GA1, welche unerkannt zu hoher Morbidität und Mortalität führen, große Erfolge erzielt werden. Das frühe Erkennen der Erkrankung, bei größtenteils unauffälligem klinischem Phänotyp, ist kosteneffektiv (Pfeil *et al.*, 2013) und ein schnellstmöglicher Beginn der Therapie verbessert das neurologische *outcome* erheblich (Boy *et al.*, 2017). 80 – 90 % der Patienten mit GA1 bleiben asymptomatisch, falls die Behandlung in der Neugeborenenperiode vor Symptombeginn initiiert wird (Viau *et al.*, 2012; Couce *et al.*, 2013b; Afroze *et al.*, 2014). Ein Therapiebeginn bei bereits eingetretenen neurologischen Symptomen ist deutlich weniger effektiv und therapeutischer Erfolg ist limitiert (Bjugstad *et al.*, 2000; Kamate *et al.*, 2012). Die Therapie gliedert sich in eine Erhaltungstherapie, eine Notfalltherapie sowie die Therapie von bereits eingetretenen neurologischen Folgen und Komplikationen (Boy *et al.*, 2017). Bei Therapieadhärenz entwickeln Patienten selten Dystonien (5 %), während Non-Adhärenz in Bezug auf die Erhaltungstherapie die Rate auf 44 %, bei Non-Adhärenz in Bezug auf die Notfalltherapie die Rate auf bis zu 100% steigen lässt (Heringer *et al.*, 2010). Hierbei ist die Effektivität der Therapie von der Bereitstellung von

Informationen und Aufklärung für Eltern, Patienten und anderer Behandler abhängig (Boy *et al.*, 2017). Ziel der Erhaltungstherapie ist die Reduktion der Zufuhr an Lysin, das quantitativ den relevantesten Aminosäurevorläufer für GA und 3-OHGA darstellt (Boy *et al.*, 2017). Dementsprechend besteht die Erhaltungstherapie aus einer lysinarmen Diät und der Supplementierung von lysinfreien und tryptophanreduzierten Aminosäuremischungen, um die Versorgung mit essentiellen Aminosäuren und Spurenelementen zu gewährleisten (Heringer *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013). Im Vergleich zu einer limitierten Gesamtproteinzufuhr reduziert dieser Ansatz die Wahrscheinlichkeit einer täglichen Langzeitvariabilität der Lysin Zufuhr (Yannicelli *et al.*, 1994). Von einer tryptophanfreien Diät sollte abgesehen werden, da dauerhafter Tryptophanmangel zu schwerwiegenden neurologischen Defiziten führt (Hoffmann *et al.*, 1991). Darüber hinaus erfolgt eine Supplementierung von L-Carnitin, das in Verbindung mit GA in das untoxische Glutaryl-L-carnitin umgewandelt und über die Niere ausgeschieden wird (Couce *et al.*, 2013b). Für andere neuroprotektive Medikamente oder eine zusätzliche Ergänzung von Arginin, das mit Lysin über die Aufnahme in den Körper über den CAT1 Transporter konkurriert und somit potentiell eine Aufnahme von Lysin verhindern könnte, besteht keine hinreichende Evidenz (Boy *et al.*, 2017). Die intensivierete Notfalltherapie während kataboler Krisen wie z. B. einer febrilen Infektion, einer febrilen Reaktion auf eine Impfung oder perioperativen/periinterventionellen Perioden des Fastens (Heringer *et al.*, 2010) folgt den Grundsätzen der Therapie von Stoffwechselerkrankungen vom Intoxikationstyp (Dixon *et al.*, 1992) und sollte unverzüglich erfolgen. Zu diesen gehören die Prävention oder die Behebung einer katabolen Krise durch Hochdosis-Energiezufuhr sowie Insulin und Lipiden. Ein weiterer Aspekt ist die Reduktion der Entstehung von GA und 3-OHGA durch eine transiente Reduktion oder das Auslassen von natürlichem Protein für 24 Stunden. Zudem muss die Förderung der physiologischen Detoxifizierung durch Zufuhr von L-Carnitin sowie ein Ausgleich des Elektrolythaushalts und pH-Wertes über intravenöse Flüssigkeitsgabe erfolgen (Boy *et al.*, 2017). Ab dem Alter von 6 Jahren ist das Risiko für enzephalopathische Krisen deutlich vermindert (Bjugstad *et al.*, 2000). Dennoch kann die Möglichkeit von subklinischen neuronalen Schäden nicht ausgeschlossen werden und die Schwelle für eine eventuelle Notfalltherapie sollte in dieser Altersgruppe und danach niedrig sein (Heringer *et al.*, 2010; Boy *et al.*, 2017). Bezüglich der Behandlung von neurologischen Komplikationen - primär im Sinne von Dystonien – stehen vor allem Baclofen, Benzodiazepine, anticholinerge Substanzen sowie Botulinumtoxin zur Verfügung, die der muskulären Spastik entgegenwirken. Von einer Behandlung mit Vigabatrin oder Valproat (Kyllerman *et al.*, 2004) (auch in Bezug auf eventuelle epileptische Anfälle) sollte aufgrund des ungünstigen, unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungsprofils abgesehen werden (Boy *et al.*, 2017). Wie bereits erwähnt bleibt ein hoher Anteil der betroffenen Patienten bei frühzeitiger Detektion der Erkrankung und Einleiten der therapeutischen Maßnahmen mit anschließend guter Adhärenz von einer enzephalopathischen Krise verschont. Allerdings tritt diese trotz aller Maßnahmen bei circa 10 – 20 % der Patienten dennoch auf (Monavari *et al.*, 2000; Kölker *et al.*, 2007; Viau *et al.*, 2012), was die Frage nach alternativen Therapieansätzen aufwirft sowie ein tieferes Verständnis der Erkrankung mit sich daraus ableitenden kausalen Therapiestrategien notwendig erscheinen lässt.

In Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir ein experimentelles Programm aufgebaut, das die Untersuchung von prokaryotem und eukaryotem Protein sowie die Größenausschlusschromatographie (SEC), *differential scanning fluometry* (DSF), Flavin Adenin Dinukleotid (FAD) Fluoreszenz, *right angle light scattering* (RALS) und *Blue-Native* PAGE von durch *missense Mutationen* induzierten GCDH-Varianten beinhaltet. Hierdurch erfolgte eine

tiefgehende Charakterisierung in Bezug auf strukturelle und biophysikalische Eigenschaften, um die Fragen zu beantworten, ob (i) Mutationen im *GCDH*-Gen Proteinfehlfaltung und Proteininstabilität induzieren, (ii) biochemische und biophysikalische Charakteristika der Proteinvarianten einen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung haben und, ob (iii) die besagten Varianten durch das *small molecule* FAD stabilisierbar sind. Hinsichtlich der zu untersuchenden vierzehn *GCDH*-Varianten entschieden wir uns auf der einen Seite für Varianten, die eine hohe Prozentzahl des Patientenkollektivs abdeckten, auf der anderen Seite jedoch auch für milder geltende Varianten, welche für eine Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen in besonderer Weise geeignet sein könnten.

Die Anwendung einer Vielzahl sich ergänzender Methoden führte zu der Erkenntnis, dass alle von uns untersuchten *missense*-mutationsinduzierten Varianten der *GCDH* zu Proteinfehlfaltung, veränderter Konformation und Proteininstabilität führen. Daher unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese, dass die GA1 in die wachsende Klasse von Proteinfaltungserkrankungen mit *loss-of-function* einzuordnen ist.

Um den maturen, funktionellen Zustand der Proteinvarianten zu erhalten, verwendeten wir ein prokaryotes System. Hierdurch konnten wir Protein im nativen Grundzustand herstellen. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei Proteinfaltung und Proteinaggregation um kompetitive Reaktionen handelt, kann eine erhöhte konformelle Stabilität im Rahmen der Proteinreifung durch Untersuchungen am nativen Grundzustand des Proteins erzielt werden (Vabulas *et al.*, 2010; Muntau *et al.*, 2014; Macdonald *et al.*, 2015). Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag hierbei auf dem Mechanismus des *loss-of-protein*. Hintergrund für die Funktionsfähigkeit des Proteins ist die Notwendigkeit dessen intakter dreidimensionaler Struktur, welche über Proteinfaltung erreicht wird (Amm *et al.*, 2014). *Loss-of-protein* kann in diesem Sinne das Resultat mehrerer fehlerhaft ablaufender Schritte der Proteinreifung sein. Beispielsweise können Mutationen der zugrundeliegenden DNA und somit eine veränderte Abfolge von Aminosäuren des Peptids, freie Exposition hydrophober Seitenketten während des Faltungsvorgangs (was typischerweise durch Chaperone - die Proteinfaltung unterstützende Enzyme - verhindert wird), Hitze, Sauerstoffradikale oder Schwermetallionen zur Störung von Faltungsvorgängen sowie zu Fehlfaltung von bereits korrekt gefaltetem Protein führen (Hartl, 1996; Hartl *et al.*, 2002; Jahn *et al.*, 2005; Hartl *et al.*, 2009; Tyedmers *et al.*, 2010). Fehlgefaltete Proteine neigen zur Aggregation und bilden die Basis einer Reihe von Erkrankungen, wie z. B. Morbus Alzheimer oder der Parkinsonerkrankung (Hartl *et al.*, 2011), was die Bedeutung der Elimination dieser Aggregate hervorhebt. Diese wird durch das Ubiquitin-Proteasomsystem sowie vakuoläre, lysosomale Proteolyse realisiert (Tyedmers *et al.*, 2010) und wird als Degradation bezeichnet (Hanna *et al.*, 2019). Dieses Qualitätssicherungssystem gewährleistet somit die Intaktheit aller Proteine der Zelle (Proteostase) (Amm *et al.*, 2014) und bildet in letzter Konsequenz auch die Basis für *loss-of-protein*.

Zur Darstellung dessen molekularer Mechanismen, verwendeten wir einen umfassenden experimentellen Aufbau, um thermische Entfaltung und strukturelle Integrität zu untersuchen. In unseren Experimenten konnten wir nach SEC und BN-PAGE des prokaryoten rekombinanten MBP-*GCDH*-Fusionsproteins ein Equilibrium aus verschiedenen Oligomerisierungszuständen aus Aggregaten, höhergradigen Oligomeren, Tetrameren, Dimeren und Monomeren nachweisen. Das Vorliegen eines Equilibriums aus mehreren Oligomerisierungszuständen ist bereits für andere Proteine, wie die Pyruvat Kinase Isoform M2 (PKM2) (Masaki *et al.*, 2020) oder das Transthyretin (TTR) (Zhou *et al.*, 2019) beschrieben worden. Auch für die *GCDH* konnte bereits das Vorliegen eines Equilibriums aus mehreren

Oligomerisierungszuständen dargestellt werden: Keyser *et al.* beschrieben 2008 im eukaryoten System ein paralleles Vorliegen von Mono-, Di- und Tetrameren der GCDH. Zusätzlich konnten unbekannte, heteromere GCDH-immunoreaktive Komplexe nachgewiesen werden, für die eine Bindung und Kommunikation mit anderen mitochondrialen Matrixproteinen vermutet wurde. Unsere Daten aus dem prokaryoten System sind hiermit gut in Einklang zu bringen. Auch wir beobachteten das parallele Vorliegen unterschiedlicher Oligomerisierungszustände im Sinne eines Equilibriums der GCDH und von GCDH-immunoreaktiven Komplexen, obwohl in unserer Studie ein höherer Anteil an Monomeren zu beobachten war, was auf methodische Limitierungen zurückzuführen sein könnte.

Für die N-terminale Alpha-Domäne konnten wir einen unterschiedlichen Einfluss auf die Quartärstruktur mit einer jeweils unterschiedlichen prädominierenden Fraktion von Tetrameren, Dimeren und Monomeren - je nach Variante - beobachten. Bezüglich der Proteinmenge zeigte sich jedoch mit Ausnahme der Variante F71S eine mit dem Wildtyp vergleichbare Proteinmenge.

Ein anderes Bild ergab sich für die Beta-Faltblatt Domäne: die Varianten G178R, E181K zeigten ein ausgeprägtes Aggregations- und Degradationsverhalten; für die Variante R227P ergaben sich deutliche Expressionsprobleme, weswegen für all diese Varianten keine weiteren Untersuchungen mit aufgereinigtem prokaryotischem Protein erfolgen konnten. Die Variante M263V bildete hier mit einer dominierenden Fraktion von Tetrameren eine Ausnahme. Dies deutet darauf hin, dass Varianten der Beta-Faltblatt Region zu besonders ausgeprägter struktureller Unordnung und niedriger Proteinmenge führen. Interessanterweise sind auch bei dem strukturell sehr ähnlichen MCAD-Protein besonders die in der Beta-Faltblatt Domäne liegenden Varianten von starker Fehlfaltung betroffen (Jank *et al.*, 2014). Für die C-terminale Alpha-Domäne ergab sich erneut ein eher inhomogenes Bild von starkem Aggregations- und Degradationsverhalten, über eine prädominierende Dimerenfraktion, bis hin zu einer vornehmlichen Tetramerfraktion. Besonders zu betonen ist hier die Variante R402W, der als häufigster Variante im allgemeinen Patientenkollektiv (Goodman *et al.*, 1998; Busquets *et al.*, 2000b) herausragende Bedeutung zukommt. Für diese konnte ein ausgeprägtes Aggregations- und Degradationsverhalten nachgewiesen werden, das gut mit der von Biery *et al.* für diese Variante beschriebenen fehlenden Restaktivität in Einklang zu bringen ist (Biery *et al.*, 1996). Für die Gruppe der Varianten mit einer niedrigen, jedoch für weitere Untersuchungen ausreichenden Proteinausbeute (R88C, A421V, A433E, A433V) zeigte sich in der BN-PAGE dennoch eine - wenngleich geringe - Fraktion an Tetrameren, was auf eine gewisse teilweise Wiederherstellung der Quartärstruktur hinweisen könnte.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich des Einflusses von *missense*-mutationsinduzierten Varianten der GCDH auf die strukturelle Ordnung und die Proteinmenge im prokaryotischen System festhalten, dass sich in unserer Arbeit vor allem eine Reduktion der Tetramerenfraktion und eine niedrige Proteinmenge durch Mutationen in der Beta-Faltblatt Domäne, bzw. in der C-terminalen Alpha-Domäne beobachten ließ, was die Einordnung der GA1 in die Klasse der Proteinfaltungserkrankungen erlaubt.

Mittels DSF konnten umfangreiche Untersuchungen bezüglich der thermischen Entfaltung für die Varianten durchgeführt werden, für die sich eine ausreichende Proteinmenge aus dem prokaryoten System aufreinigen ließ. Für alle Varianten konnte bereits im Grundzustand (d.h. bei 25 °C) eine höhere Entfaltungsrate im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Ausschließlich für die Variante R88C konnte eine thermische Entfaltung im Verlauf vergleichbar mit der des Wildtyps gezeigt werden. Alle anderen

Varianten wiesen T_m -Werte bei niedrigeren Temperaturen als der Wildtyp auf, was eine niedrigere thermische Stabilität der Varianten im Vergleich zum Wildtyp bedeutet. Dies ist vor dem Hintergrund einer katabolen Krise im Rahmen einer unspezifischen Infektionserkrankung mit Fieberschüben von besonderer klinischer Relevanz, da dementsprechend die vorliegenden GCDH-Varianten bei höheren Temperaturen im Körper von Patienten zu größerer Instabilität neigen. Somit kann das Enzym nicht mehr seiner Funktion nachkommen, Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA oxidativ zu decarboxylieren. Eine Akkumulation von Glutaryl-CoA wäre somit die Folge, was wiederum durch enzymatische Hydrolyse des CoA-Anteils zu GA umgewandelt wird (Hyman *et al.*, 1984) und somit zur Pathogenese der GA1 beitragen könnte.

Hinsichtlich der strukturellen Integrität und Proteinmenge zeigte sich im eukaryoten System ein ergänzendes Bild. In eukaryoten Expressionstests wiesen die Varianten F71S, E181K, A293T, R402W und A421V das geringste Expressionsniveau in der löslichen Phase und damit die geringste funktionelle Proteinmenge auf. In Anbetracht zahlreicher anderer V5-positiver Banden für alle Varianten - vor allem in der Pelletfraktion - wird hier ein hoher Anteil an Aggregation/Degradation vermutet. Keyser *et al.* beschrieben darüber hinaus bereits eukaryotische Fraktionen von GCDH-Precursor-Protein, das in unserer Arbeit reproduziert werden konnte (Keyser *et al.*, 2008). Bezüglich des Oligomerisierungsverhaltens im eukaryoten System zeigten sich die einzelnen Varianten weitgehend vergleichbar mit jenen im prokaryoten System. Allerdings kam es für die Varianten F71S, G178R, R227P, A421V, A433E, A433V zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der Tetramere. Zu bemerken ist hier jedoch die davor gezeigte geringe Proteinmenge für F71S und A421V. Zurückzuführen sein könnte dies auf ein „rescue-System“ - z. B. unter Zuhilfenahme intrinsischer Chaperone - der eukaryoten Zelle im Vergleich zur prokaryoten Zelle. Zu beobachten war in diesem Kontext darüber hinaus die Bildung von höhergradigen Oligomeren im eukaryoten System mittels BN-PAGE, was gut vereinbar mit bereits publizierten Studien ist, in welchen dies auch beobachtet wurde (Keyser *et al.*, 2008) und was auch auf die Bindung von GCDH-Faltungsvorstufen an ein „rescue-System“ hinweisen könnte. Diesbezüglich werden jedoch weitere Studien benötigt. Zusammenfassend konnten wir auch im eukaryoten System einen bedeutenden Einfluss von *missense* Mutationen auf die strukturelle Integrität sowie auf die Proteinmenge nachweisen. Hierdurch wird die Hypothese, dass es sich auch bei der GA1 um eine Proteinfaltungserkrankung handelt, weiter erhärtet.

Die Enzymaktivität des GCDH-Proteins ist eine wichtige Determinante des Schweregrades der Erkrankung beim Patienten. In dieser Hinsicht konnte bereits im eukaryoten System für die Variante R402W eine erhöhte intramitochondriale Degradation dargestellt werden, die in eine herabgesetzte Restaktivität mündet (Keyser *et al.*, 2008) was die Bedeutung der Korrelation von Proteinstabilität und Enzymaktivität verdeutlicht. Zudem ist die Korrelation zwischen Genotyp und Restaktivität der GCDH mehrfach beschrieben worden (Goodman *et al.*, 1998; Busquets *et al.*, 2000a; Zschocke *et al.*, 2000). Wir haben versucht, einen Enzymaktivitätssay zu etablieren. Dies ist aufgrund der zeitlichen Begrenzung des FöFoLe Projektes und aufgrund der im Verlauf festgestellten fehlenden Übertragbarkeit des MCAD-Aktivitätssays auf das GHCDH-Enzym leider nicht gelungen. Grund hierfür waren uns unbekannt methodische Limitationen. Daher haben wir Enzymaktivitätsdaten zu wichtigen Mutationen und Genotypen aus der Literatur herangezogen.

In der N-terminalen Alpha-Domäne zeigten alle Varianten – vor allem die Variante F71S – starke Anzeichen für Proteinfehlfaltung und Fehlfunktion mit einer deutlich erhöhten Fluoreszenz im Grundzustand und Proteinfaltung bei geringeren Temperaturen als der

Wildtyp. Publiziert sind bezüglich F71S keine klinischen Daten zur Korrelation von Genotyp und Phänotyp. Die Varianten R88C und R138G zeigten jedoch eine Restaktivität von 0 % in der Publikation von Christensen *et al.* und von 0,5 % in der Studie von Busquets *et al.* (Busquets *et al.*, 2000b; Christensen *et al.*, 2004) im Vergleich zum Wildtyp. R88C wies in unseren Experimenten eine deutlich geringere Tetramerfraktion mit Betonung der Dimerfraktion sowie einen erhöhten Aggregatanteil in der BN PAGE im eukaryoten System auf, was gut mit den Daten zur Restaktivität vereinbar ist. Einschränkend ist die dem Wildtyp ähnliche thermische Entfaltung dieser Variante zu erwähnen. Für R138G konnten wir einen primär tetrameren Oligomerisierungszustand im pro- und eukaryoten System sowie eine mit dem Wildtyp vergleichbare Expression im eukaryoten System, bei jedoch stärkerer Entfaltung im Grundzustand und einer reduzierten thermischen Stabilität nachweisen, was bedingt die vergleichsweise geringe Restaktivität dieser Variante erklären könnte. Bezüglich der Beta-Faltblatt Domäne konnte für die Variante G178R keine Restaktivität ermittelt werden. Für die Variante E181K wurde eine Restaktivität von 0 % vom Wildtyp vorbeschrieben (Christensen *et al.*, 2004), was durch fast vollständige Aggregation von rekombinantem, prokaryotem Protein und kaum nachweisbarem, löslichem, eukaryotem Protein gut erklärbar ist. Für die Variante R227P ist eine Restaktivität von 5% beschrieben worden (Ribeiro *et al.*, 2020). Für diese Variante traten erhebliche Expressionsprobleme im prokaryoten System auf, die eine Aufreinigung von rekombinantem Protein der Variante unmöglich machten. Im eukaryoten System wies sie vornehmlich Tetramere auf, allerdings mit deutlich reduzierter Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp, was somit eine Erklärung für die geringe, vorbeschriebene Restaktivität sein könnte. Die Variante A293T wurde mit einer GCDH-Aktivität unter 10 % und einem schweren klinischen Phänotyp assoziiert (van der Watt *et al.*, 2010). In unseren Experimenten konnte diese Variante im prokaryoten System ausschließlich unter der Hinzugabe von Glycerin aufgereinigt werden, mit dann jedoch ausgeprägter Tetramerfraktion als der Wildtyp. Zudem wies sie eine höhere thermische Entfaltung in den DSF-Messungen sowie eine geringere Tetramerfraktion als der Wildtyp im eukaryoten System auf. Dies ist gut mit der vorbeschriebenen moderaten Restaktivität vereinbar. Im Gegensatz hierzu schien die Variante M263V – die wie oben beschrieben auch in der Beta-Faltblatt Domäne lokalisiert ist – die stabilste Variante in unseren Experimenten zu sein, mit ähnlichen biochemischen Charakteristika wie der Wildtyp. Diese Daten korrelieren gut mit den publizierten Daten von Christensen *et al.*, mit einer Enzymrestaktivität von 30 % des Wildtyps, weswegen diese Variante als milde Mutation eingestuft wurde (Christensen *et al.*, 2004). Allerdings wurden auch schwere klinische Phänotypen bei Trägern dieser Mutation beobachtet. Die Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne wiesen im Vergleich zum Wildtyp eine beschleunigte thermische Entfaltung und beeinträchtigte Oligomerisierung auf. Dennoch waren diese Veränderungen weniger stark ausgeprägt als die der anderen Domänen. Für die Variante V400M konnte eine vergleichsweise hohe Restaktivität von circa 76%, bei teils jedoch schwerem klinischem Verlauf beobachtet werden (Ribeiro *et al.*, 2020). V400M zeigte in unseren Experimenten im pro- und eukaryoten System hauptsächlich Tetramere, was gut mit den Daten bezüglich der Restaktivität in Einklang zu bringen ist, bei gleichzeitig jedoch auch stärkerer Entfaltung im Grundzustand und einer reduzierten thermalen Stabilität. Für die Variante R402W - die die häufigste Variante darstellt – wurden fehlende Restaktivität von 0 % und ein schwerer klinischer Phänotyp nachgewiesen (Busquets *et al.*, 2000a; Christensen *et al.*, 2004). Dies erscheint vor dem Hintergrund eines von uns beobachteten vornehmlichen Vorliegens von Aggregaten im prokaryoten System (weswegen keine Untersuchung zur thermischen Entfaltung erfolgen konnte) und deutlich reduzierter löslicher Fraktion im eukaryoten

Expressionstest gut nachvollziehbar. Für die Variante E414K konnten Keyser *et al.* eine nur geringe Restaktivität von 1,7 % detektieren (Keyser *et al.*, 2008). Wir konnten bei E414K prokaryot einen hohen Dimeranteil mit Aggregaten beobachten, was den Befund der Restaktivität stützt. Zudem bestanden eine beschleunigte thermische Entfaltung und eine erhöhte Entfaltung im Grundzustand. Im eukaryoten System waren jedoch hauptsächlich Tetramere und Aggregate zu beobachten, was der vorbeschriebenen Restaktivität eher widerspricht. Für A421V wurde eine Restaktivität von 40% des Wildtyps bei Expression aus *E. coli* vorbeschrieben (Biery *et al.*, 1996). Diese Variante konnte von uns prokaryot vor allem als Dimer mit einem hohen Aggregatanteil gereinigt werden und wies eine vermehrte Entfaltung im Grundzustand sowie verringerte thermale Stabilität auf. Im eukaryoten Expressionstest zeigte sich kaum lösliches Protein. Dies ist nicht ohne Weiteres mit der vorbeschriebenen Restaktivität in Einklang zu bringen. Für die Varianten A433E und A433V liegen uns ausschließlich Daten zur Restaktivität nach Expression aus *E. coli* vor, wobei diese als spezifische Aktivität aus *crude extract* von *E. coli* ausgedrückt wurden. Für den Wildtyp betragen diese $1,74 \pm 0,65$ mU/mg sowie für die Variante A433E unter 0,01 mU/mg sowie für A433V $0,97 \pm 0,45$ mU/mg (Westover *et al.*, 2003). A433E wies in unseren Experimenten im prokaryoten System hauptsächlich Aggregate, Dimere und Monomere sowie eine höhere Entfaltung im Grundzustand und geringere thermische Stabilität auf. Im eukaryoten System zeigte sich ein vergleichbares Expressionsniveau mit dem Wildtyp sowie hinsichtlich der Oligomerisierung aus Zellkultur vornehmlich Aggregate, Tetramere, Dimere und Monomere, was teilweise die fehlende Restaktivität erklärt. A433V konnte ausschließlich unter Hinzugabe von Glycerin im prokaryoten System gereinigt werden und lag anschließend primär in Aggregatform sowie einem etwa gleichen Anteil an Tetrameren und Dimeren vor, bei jedoch deutlich geringerer Tetramerfraktion, als der Wildtyp. Die thermale Entfaltung im Vergleich zum Wildtyp war deutlich erhöht. Im eukaryoten System zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp oder A433E deutlich weniger lösliches Protein, das jedoch vornehmlich als Tetramer und Dimer vorlag. Unsere Befunde können somit nur teilweise die vorbeschriebene Restaktivität und den deutlichen Unterschied zwischen beiden Varianten erklären. Zusammenfassend zeigt sich deutlich, dass Genotyp und Phänotyp nicht klar und eindeutig korrelieren und somit kein Rückschluss vom Vorliegen einer bestimmten Mutation auf die Restaktivität oder den Verlauf der GA1 gezogen werden kann.

Proteinfehlfaltung mit *loss-of-function* ist ein häufiges Phänomen, das mit *missense* Mutationen im Rahmen vieler genetischer Erkrankungen zu beobachten ist. Während der letzten Jahre wurde dieser molekulare Phänotyp als Basis vieler angeborener Stoffwechselerkrankungen entdeckt, z. B. für die Phenylketonurie (Waters *et al.*, 1998; Gersting *et al.*, 2008) und den MCADD (Jank *et al.*, 2014). Für die Phenylketonurie konnte in diesem Kontext für Varianten mit *missense* Mutationen eine Beeinträchtigung von Enzymkinetik, Stabilität und Konformation nachgewiesen werden. Diese äußerte sich über eine reduzierte proteolytische Stabilität, eine Veränderung im Tetrameraufbau oder Aggregation, erhöhte Hydrophobizität und beschleunigte thermische Entfaltung (Gersting *et al.*, 2008). Auch für den MCADD konnte dies dargestellt werden: Proteinfehlfaltung äußerte sich für *missense*-mutationsgenerierte Varianten über beschleunigte thermische Entfaltung, verringerte proteolytische Stabilität, beschleunigte thermische Inaktivierung, reduzierte Restaktivität oder reduzierte Substrataffinität (Maier *et al.*, 2009). Das Verständnis für diese zugrundeliegende Pathophysiologie ebnete den Weg für die Entwicklung von Therapien mit *small molecules*. Diese zielen auf eine Korrektur des fehlgefalteten Proteins und eine Stabilisierung und Erhöhung der effektiven intrazellulären Proteinkonzentration ab, die durch die Mutation und die daraus resultierende Konformationsänderung, Destabilisierung

und frühzeitige Degradation reduziert ist. Z. B. konnte für die Phenylketonurie die Behandlung mit BH₄ als Routinetherapie etabliert werden, wobei zwischen BH₄-responsiven und nicht-BH₄-responsiven Varianten unterschieden werden muss (Muntau *et al.*, 2002; Pey *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2007; Gersting *et al.*, 2008; Zürflüh *et al.*, 2008; Belanger-Quintana *et al.*, 2011; Staudigl *et al.*, 2011; Quirk *et al.*, 2012; Utz *et al.*, 2012; Aldamiz-Echevarria *et al.*, 2013; Couce *et al.*, 2013a; Aldamiz-Echevarria *et al.*, 2015; Scala *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2015; Trefz *et al.*, 2015; Muntau *et al.*, 2017; van Wegberg *et al.*, 2017; Muntau *et al.*, 2019). Die thermische Entfaltung war ein Indikator dafür, dass eine partielle Rückfaltung möglich ist. Deswegen wurden unter Beobachtung der thermischen Proteinentfaltung - d.h. mittels DSF Messungen - breite Screenings durchgeführt, um mögliche Kandidatenmoleküle zu identifizieren (Niesen *et al.*, 2007).

Zur Überprüfung der Hypothese, ob auch das GCDH-Protein durch Bindung pharmakologischer Dosen eines *small molecule* stabilisiert werden kann, erfolgten in der vorliegenden Arbeit DSF Messungen unter Zugabe von FAD. Im Anschluss erfolgte der Vergleich mit den entsprechenden Enzymen ohne Cofaktor. Hierbei konnten wir zeigen, dass FAD grundsätzlich, durch die Verschiebung der entsprechenden T_m-Werte zu höheren Temperaturen, auf alle Varianten einen stabilisierenden Einfluss hat. Zu unterscheiden waren in diesem Kontext jedoch mehrere Phasen der Entfaltung, wodurch sich aufgrund von Überlagerung verschiedene Entfaltungsübergänge ergaben. Diesbezüglich zeigte sich eine Stabilisierung verschiedener Übergänge durch FAD, was auf einen separaten Einfluss von FAD auf die verschiedenen Untereinheiten spricht. FAD hatte einen unterschiedlichen Einfluss auf die entsprechenden Domänen – je nach Variante – was sich im Verschwinden einzelner Übergänge oder in der Stabilisierung nur eines Überganges zeigte. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich auch für die Fluoreszenz im Grundzustand bei niedrigen Temperaturen ein hochgradig unterschiedliches Ansprechen der einzelnen Varianten zeigte. Für die Varianten R88C, R138G, M263V und A421V war eine Verringerung der Fluoreszenz im Grundzustand nach Zugabe von FAD zu beobachten. Für die anderen Varianten zeigte sich eine vergleichbare, oder - wie bei F71S - sogar erhöhte Fluoreszenz im Grundzustand. Dies spricht für die Bindung von FAD durch die erstgenannten Varianten. Es erscheint hier möglich, dass einige Varianten FAD verstärkt binden, andere nur einen FAD-Überschuss, wieder andere jedoch - wie in den Vorexperimenten gezeigt – in zu stark aggregierter Form vorliegen, um FAD binden zu können. Dies könnte auf das Vorliegen von nur bestimmten FAD-sensitiven Varianten hinweisen. Außerdem erscheint perspektivisch ein mutationsspezifisches Vorgehen hinsichtlich eventueller alternativer stabilisierender *small molecules* vor dem Hintergrund eines unterschiedlichen Einflusses auf unterschiedliche fehlgefaltete Domänen des GCDH-Proteins sinnvoll. Dies muss jedoch durch weiterführende Studien untersucht werden, um ein tiefergehendes Verständnis der einzelnen Entfaltungsphasen des Proteins zu erreichen.

Zusammenfassend handelt es sich bei der GA1 um eine schwere, verheerende Erkrankung. Für Patienten und Familienangehörige ist die Erkrankung in der klinischen Praxis extrem belastend und mit häufiger Hospitalisierung verbunden. Bisherige Therapiemaßnahmen sind unspezifisch und symptomatisch. Zudem besteht trotz differenzierter Therapiestrategien ein Restrisiko für enzephalopathische Krisen mit anschließender kaum reversibler, primär dystonischer Bewegungsstörung von 10 – 20 % (Viau *et al.*, 2012; Couce *et al.*, 2013b; Afroze *et al.*, 2014). Kausale Therapiestrategien fehlen zum aktuellen Zeitpunkt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Aufklärung des molekularen Phänotyps der Erkrankung. Darüber hinaus haben wir zeigen können, dass pharmakologische Dosen der natürlichen Substanz FAD den molekularen Phänotyp einiger *missense*-induzierter Varianten korrigieren können. Damit

konnten wir erstmalig experimentelle Evidenz für eine gezielte pharmakologische Korrektur der GA1 generieren. Die weitere pharmazeutische Entwicklung dieses Ansatzes wird hoffentlich in Zukunft zu einer präventiven Therapie für Kinder mit GA1 führen, die das Restrisiko für das Auftreten einer enzephalopathischen Krise mit schwerstem neurologischem Residualsyndrom weiter senkt.

6. Zusammenfassung

Der Glutaryl-CoA-Dehydrogenasemangel führt zur neurometabolischen Erkrankung GA1, einer Erkrankung mit schwerer, nicht reversibler dystonisch-dyskinetischer bis choreathetotischer Bewegungsstörung, wobei die neurokognitiven Fähigkeiten der Patienten weitgehend bestehen bleiben. Die aktuellen etablierten Therapien bestehen aus einer lysinfreien Diät, sowie aus intensivmedizinischer Betreuung mit Glucoseinfusionen und Supplementierung von L-Carnitin während kataboler Krisen. Trotz der Durchführung präventiver Therapiemaßnahmen erleidet eine signifikante Anzahl von Patienten eine enzephalopathische Krise mit Verlust sämtlicher motorischer Fähigkeiten. Ein tieferes Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung und insbesondere der intrazellulären molekularen Mechanismen auf Proteinebene ist die Voraussetzung für die Entwicklung kausaler Therapiestrategien.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Fragen ob (i) Mutationen im *GCDH*-Gen Proteinfehlfaltung und Proteininstabilität induzieren, (ii) biochemische und biophysikalische Charakteristika der Proteinvarianten einen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung haben und, ob (iii) *GCDH*-Varianten durch das *small molecule* FAD stabilisierbar sind.

Zur Beantwortung dieser Fragen nutzten wir ein *high-throughput* Verfahren, das sowohl ein breites Spektrum an Methoden als auch einen Ansatz im prokaryoten und eukaryoten System beinhaltete. Hiermit konnten wir nachweisen, dass Mutationen im *GCDH*-Gen die Proteinfaltung und Proteininstabilität je nach Lokalisation in der Quartärstruktur beeinträchtigen. Hiermit ist die GA1 in die Klasse der Proteinfaltungserkrankungen mit *loss-of-function* einzuordnen. Eine klare Korrelation von Genotyp zu klinischem Phänotyp konnten wir nicht nachweisen. Hierfür bedarf es weiterer Studien, die auch die Enzymrestaktivität beinhalten.

Wir haben gezeigt, dass pharmakologische Dosen des *small molecule* FAD zu einer Stabilisierung des varianten *GCDH*-Proteins führen, wobei wir FAD-sensitive und nicht-sensitive Varianten identifiziert haben.

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit sind daher (i) die GA1 ist eine Proteinfaltungserkrankung mit *loss-of-function*. (ii) Die Proteinfehlfaltung ist pharmakologisch korrigierbar und stellt damit die experimentelle Grundlage für die pharmazeutische Entwicklung eines *orphan drugs* für Kinder mit GA1 dar.

Referenzen

1. Afroze B. and Yunus Z. M. (2014). "Glutaric aciduria type 1--importance of early diagnosis and treatment." *J Pak Med Assoc* 64(5): 593-595.
2. Aldamiz-Echevarria L., Bueno M. A., Couce M. L., Lage S., Dalmau J., Vitoria I., Andrade F., Llarena M., Blasco J., Alcalde C., Gil D., Garcia M. C., Gonzalez-Lamuno D., Ruiz M., Ruiz M. A., Gonzalez D. and Sanchez-Valverde F. (2013). "Tetrahydrobiopterin therapy vs phenylalanine-restricted diet: impact on growth in PKU." *Mol Genet Metab* 109(4): 331-338.
3. Aldamiz-Echevarria L., Bueno M. A., Couce M. L., Lage S., Dalmau J., Vitoria I., Llarena M., Andrade F., Blasco J., Alcalde C., Gil D., Garcia M. C., Gonzalez-Lamuno D., Ruiz M., Ruiz M. A., Pena-Quintana L., Gonzalez D. and Sanchez-Valverde F. (2015). "6R-tetrahydrobiopterin treated PKU patients below 4 years of age: Physical outcomes, nutrition and genotype." *Mol Genet Metab* 115(1): 10-16.
4. Amm I., Sommer T. and Wolf D. H. (2014). "Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system." *Biochim Biophys Acta* 1843(1): 182-196.
5. Baric I., Zschocke J., Christensen E., Duran M., Goodman S. I., Leonard J. V., Muller E., Morton D. H., Superti-Furga A. and Hoffmann G. F. (1998). "Diagnosis and management of glutaric aciduria type I." *J Inherit Metab Dis* 21(4): 326-340.
6. Belanger-Quintana A., Burlina A., Harding C. O. and Muntau A. C. (2011). "Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 104 Suppl: S19-25.
7. Biery B. J., Stein D. E., Morton D. H. and Goodman S. I. (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." *Am J Hum Genet* 59(5): 1006-1011.
8. Bjugstad K. B., Goodman S. I. and Freed C. R. (2000). "Age at symptom onset predicts severity of motor impairment and clinical outcome of glutaric acidemia type 1." *J Pediatr* 137(5): 681-686.
9. Boy N., Garbade S. F., Heringer J., Seitz A., Kölker S. and Harting I. (2019). "Patterns, evolution, and severity of striatal injury in insidious- vs acute-onset glutaric aciduria type 1." *J Inherit Metab Dis* 42(1): 117-127.
10. Boy N., Haege G., Heringer J., Assmann B., Mühlhausen C., Ensenaer R., Maier E. M., Lucke T., Hoffmann G. F., Muller E., Burgard P. and Kölker S. (2013). "Low lysine diet in glutaric aciduria type I--effect on anthropometric and biochemical follow-up parameters." *J Inherit Metab Dis* 36(3): 525-533.

11. Boy N., Heringer J., Haege G., Glahn E. M., Hoffmann G. F., Garbade S. F., Kölker S. and Burgard P. (2015). "A cross-sectional controlled developmental study of neuropsychological functions in patients with glutaric aciduria type I." *Orphanet J Rare Dis* 10: 163.
12. Boy N., Mengler K., Thimm E., Schiergens K. A., Marquardt T., Weinhold N., Marquardt I., Das A. M., Freisinger P., Grunert S. C., Vossbeck J., Steinfeld R., Baumgartner M. R., Beblo S., Dieckmann A., Nake A., Lindner M., Heringer J., Hoffmann G. F., Mühlhausen C., Maier E. M., Ensenauer R., Garbade S. F. and Kölker S. (2018). "Newborn screening: A disease-changing intervention for glutaric aciduria type 1." *Ann Neurol* 83(5): 970-979.
13. Boy N., Mühlhausen C., Maier E. M., Heringer J., Assmann B., Burgard P., Dixon M., Fleissner S., Greenberg C. R., Harting I., Hoffmann G. F., Karall D., Koeller D. M., Krawinkel M. B., Okun J. G., Opladen T., Posset R., Sahm K., Zschocke J., Kölker S. and Additional individual c. (2017). "Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision." *J Inherit Metab Dis* 40(1): 75-101.
14. Brockow I. and Nennstiel U. (2019). "Neugeborenen-Screening auf Mukoviszidose." *Gynäkologische Praxis* 44: 602-610.
15. Busquets C., Merinero B., Christensen E., Gelpi J. L., Campistol J., Pineda M., Fernandez-Alvarez E., Prats J. M., Sans A., Arteaga R., Marti M., Campos J., Martinez-Pardo M., Martinez-Bermejo A., Ruiz-Falco M. L., Vaquerizo J., Orozco M., Ugarte M., Coll M. J. and Ribes A. (2000a). "Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct." *Pediatr Res* 48(3): 315-322.
16. Busquets C., Soriano M., de Almeida I. T., Garavaglia B., Rimoldi M., Rivera I., Uziel G., Cabral A., Coll M. J. and Ribes A. (2000b). "Mutation analysis of the GCDH gene in Italian and Portuguese patients with glutaric aciduria type I." *Mol Genet Metab* 71(3): 535-537.
17. Chalmers R. A., Bain M. D. and Zschocke J. (2006). "Riboflavin-responsive glutaryl CoA dehydrogenase deficiency." *Mol Genet Metab* 88(1): 29-37.
18. Christensen E., Ribes A., Merinero B. and Zschocke J. (2004). "Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." *J Inherit Metab Dis* 27(6): 861-868.
19. Coelho T., Maia L. F., da Silva A. M., Cruz M. W., Plante-Bordeneuve V., Suhr O. B., Conceicao I., Schmidt H. H., Trigo P., Kelly J. W., Labaudiniere R., Chan J., Packman J. and Grogan D. R. (2013). "Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy." *J Neurol* 260(11): 2802-2814.
20. Couce M. L., Boveda M. D., Fernandez-Marmiesse A., Miras A., Perez B., Desviat L. R. and Fraga J. M. (2013a). "Molecular epidemiology and BH4-responsiveness in patients with phenylalanine hydroxylase deficiency from Galicia region of Spain." *Gene* 521(1): 100-104.

21. Couce M. L., Lopez-Suarez O., Boveda M. D., Castineiras D. E., Cocho J. A., Garcia-Villoria J., Castro-Gago M., Fraga J. M. and Ribes A. (2013b). "Glutaric aciduria type I: outcome of patients with early- versus late-diagnosis." *Eur J Paediatr Neurol* 17(4): 383-389.
22. Cudré-Cung H. P., Remacle N., do Vale-Pereira S., Gonzalez M., Henry H., Ivanisevic J., Schmiesing J., Mühlhausen C., Braissant O. and Ballhausen D. (2019). "Ammonium accumulation and chemokine decrease in culture media of Gcdh(-/-) 3D reagggregated brain cell cultures." *Mol Genet Metab* 126(4): 416-428.
23. Dixon M. A. and Leonard J. V. (1992). "Intercurrent illness in inborn errors of intermediary metabolism." *Arch Dis Child* 67(11): 1387-1391.
24. Dwyer T. M., Rao K. S., Goodman S. I. and Frerman F. E. (2000). "Proton abstraction reaction, steady-state kinetics, and oxidation-reduction potential of human glutaryl-CoA dehydrogenase." *Biochemistry* 39(37): 11488-11499.
25. Fu Z., Wang M., Paschke R., Rao K. S., Frerman F. E. and Kim J. J. (2004). "Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions." *Biochemistry* 43(30): 9674-9684.
26. Germain D. P., Hughes D. A., Nicholls K., Bichet D. G., Giugliani R., Wilcox W. R., Feliciani C., Shankar S. P., Ezgu F., Amartino H., Bratkovic D., Feldt-Rasmussen U., Nedd K., Sharaf El Din U., Lourenco C. M., Banikazemi M., Charrow J., Dasouki M., Finegold D., Giraldo P., Goker-Alpan O., Longo N., Scott C. R., Torra R., Tuffaha A., Jovanovic A., Waldek S., Packman S., Ludington E., Viereck C., Kirk J., Yu J., Benjamin E. R., Johnson F., Lockhart D. J., Skuban N., Castelli J., Barth J., Barlow C. and Schiffmann R. (2016). "Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat." *N Engl J Med* 375(6): 545-555.
27. Gersting S. W., Kemter K. F., Staudigl M., Messing D. D., Danecka M. K., Lagler F. B., Sommerhoff C. P., Roscher A. A. and Muntau A. C. (2008). "Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability." *Am J Hum Genet* 83(1): 5-17.
28. Goodman S. I., Markey S. P., Moe P. G., Miles B. S. and Teng C. C. (1975). "Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism." *Biochem Med* 12(1): 12-21.
29. Goodman S. I., Stein D. E., Schlesinger S., Christensen E., Schwartz M., Greenberg C. R. and Elpeleg O. N. (1998). "Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations." *Hum Mutat* 12(3): 141-144.
30. Gregersen N., Bross P. and Andresen B. S. (2004). "Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships." *Eur J Biochem* 271(3): 470-482.
31. Hammarström P., Wiseman R. L., Powers E. T. and Kelly J. W. (2003). "Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics." *Science* 299(5607): 713-716.

32. Hanna J., Guerra-Moreno A., Ang J. and Micoogullari Y. (2019). "Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease." *Am J Pathol* 189(1): 94-103.
33. Hartl F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* 381(6583): 571-579.
34. Hartl F. U., Bracher A. and Hayer-Hartl M. (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." *Nature* 475(7356): 324-332.
35. Hartl F. U. and Hayer-Hartl M. (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." *Nat Struct Mol Biol* 16(6): 574-581.
36. Hartl F. U. and Hayer-Hartl M. (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." *Science* 295(5561): 1852-1858.
37. Hedlund G. L., Longo N. and Pasquali M. (2006). "Glutaric acidemia type 1." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C(2): 86-94.
38. Heringer J., Boy S. P., Ensenauer R., Assmann B., Zschocke J., Harting I., Lucke T., Maier E. M., Mühlhausen C., Haegi G., Hoffmann G. F., Burgard P. and Kölker S. (2010). "Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I." *Ann Neurol* 68(5): 743-752.
39. Herskovitz M., Goldsher D., Sela B. A. and Mandel H. (2013). "Subependymal mass lesions and peripheral polyneuropathy in adult-onset glutaric aciduria type I." *Neurology* 81(9): 849-850.
40. Hoffmann G. F., Gibson K. M., Trefz F. K., Nyhan W. L., Bremer H. J. and Rating D. (1994). "Neurological manifestations of organic acid disorders." *Eur J Pediatr* 153(7 Suppl 1): S94-100.
41. Hoffmann G. F., Trefz F. K., Barth P. G., Bohles H. J., Biggemann B., Bremer H. J., Christensen E., Frosch M., Hanefeld F., Hunneman D. H. and et al. (1991). "Glutaryl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a distinct encephalopathy." *Pediatrics* 88(6): 1194-1203.
42. Hyman D. B. and Tanaka K. (1984). "Specific glutaryl-CoA dehydrogenating activity is deficient in cultured fibroblasts from glutaric aciduria patients." *J Clin Invest* 73(3): 778-784.
43. Jafari P., Braissant O., Bonafe L. and Ballhausen D. (2011). "The unsolved puzzle of neuropathogenesis in glutaric aciduria type I." *Mol Genet Metab* 104(4): 425-437.
44. Jafari P., Braissant O., Zavadakova P., Henry H., Bonafe L. and Ballhausen D. (2013). "Ammonium accumulation and cell death in a rat 3D brain cell model of glutaric aciduria type I." *PLoS One* 8(1): e53735.

45. Jahn T. R. and Radford S. E. (2005). "The Yin and Yang of protein folding." *FEBS J* 272(23): 5962-5970.
46. Jank J. M., Maier E. M., Reibeta D. D., Haslbeck M., Kemter K. F., Truger M. S., Sommerhoff C. P., Ferdinandusse S., Wanders R. J., Gersting S. W. and Muntau A. C. (2014). "The domain-specific and temperature-dependent protein misfolding phenotype of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase." *PLoS One* 9(4): e93852.
47. Kamate M., Patil V., Chetal V., Darak P. and Hattiholi V. (2012). "Glutaric aciduria type I: A treatable neurometabolic disorder." *Ann Indian Acad Neurol* 15(1): 31-34.
48. Kennedy S., Potter B. K., Wilson K., Fisher L., Geraghty M., Milburn J. and Chakraborty P. (2010). "The first three years of screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD) by newborn screening ontario." *BMC Pediatr* 10: 82.
49. Keyser B., Mühlhausen C., Dickmanns A., Christensen E., Muschol N., Ullrich K. and Braulke T. (2008). "Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH)." *Hum Mol Genet* 17(24): 3854-3863.
50. Kim J. J. and Miura R. (2004). "Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences." *Eur J Biochem* 271(3): 483-493.
51. Kim J. J., Wang M. and Paschke R. (1993). "Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16): 7523-7527.
52. Kölker S., Boy S. P., Heringer J., Muller E., Maier E. M., Ensenaer R., Mühlhausen C., Schlune A., Greenberg C. R., Koeller D. M., Hoffmann G. F., Haegel G. and Burgard P. (2012). "Complementary dietary treatment using lysine-free, arginine-fortified amino acid supplements in glutaric aciduria type I - A decade of experience." *Mol Genet Metab* 107(1-2): 72-80.
53. Kölker S., Christensen E., Leonard J. V., Greenberg C. R., Boneh A., Burlina A. B., Burlina A. P., Dixon M., Duran M., Garcia Cazorla A., Goodman S. I., Koeller D. M., Kyllerman M., Mühlhausen C., Muller E., Okun J. G., Wilcken B., Hoffmann G. F. and Burgard P. (2011). "Diagnosis and management of glutaric aciduria type I--revised recommendations." *J Inherit Metab Dis* 34(3): 677-694.
54. Kölker S., Garbade S. F., Boy N., Maier E. M., Meissner T., Mühlhausen C., Hennermann J. B., Lucke T., Haberle J., Baumkotter J., Haller W., Muller E., Zschocke J., Burgard P. and Hoffmann G. F. (2007). "Decline of acute encephalopathic crises in children with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening in Germany." *Pediatr Res* 62(3): 357-363.
55. Kölker S., Garbade S. F., Greenberg C. R., Leonard J. V., Saudubray J. M., Ribes A., Kalkanoglu H. S., Lund A. M., Merinero B., Wajner M., Troncoso M., Williams M., Walter J. H., Campistol J., Marti-Herrero M., Caswill M., Burlina A. B., Lagler F., Maier E. M., Schwahn B.,

Tokatli A., Dursun A., Coskun T., Chalmers R. A., Koeller D. M., Zschocke J., Christensen E., Burgard P. and Hoffmann G. F. (2006). "Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." *Pediatr Res* 59(6): 840-847.

56. Kölker S., Garcia-Cazorla A., Valayannopoulos V., Lund A. M., Burlina A. B., Sykut-Cegielska J., Wijburg F. A., Teles E. L., Zeman J., Dionisi-Vici C., Baric I., Karall D., Augoustides-Savvopoulou P., Aksglaede L., Arnoux J. B., Avram P., Baumgartner M. R., Blasco-Alonso J., Chabrol B., Chakrapani A., Chapman K., EC I. S., Couce M. L., de Meirleir L., Dobbelaere D., Dvorakova V., Furlan F., Gleich F., Gradowska W., Grunewald S., Jalan A., Haberle J., Haege G., Lachmann R., Laemmle A., Langereis E., de Lonlay P., Martinelli D., Matsumoto S., Mühlhausen C., de Baulny H. O., Ortez C., Pena-Quintana L., Ramadza D. P., Rodrigues E., Scholl-Burgi S., Sokal E., Staufner C., Summar M. L., Thompson N., Vara R., Pinera I. V., Walter J. H., Williams M. and Burgard P. (2015a). "The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 1: the initial presentation." *J Inherit Metab Dis* 38(6): 1041-1057.

57. Kölker S., Koeller D. M., Okun J. G. and Hoffmann G. F. (2004). "Pathomechanisms of neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency." *Ann Neurol* 55(1): 7-12.

58. Kölker S., Valayannopoulos V., Burlina A. B., Sykut-Cegielska J., Wijburg F. A., Teles E. L., Zeman J., Dionisi-Vici C., Baric I., Karall D., Arnoux J. B., Avram P., Baumgartner M. R., Blasco-Alonso J., Boy S. P., Rasmussen M. B., Burgard P., Chabrol B., Chakrapani A., Chapman K., Cortes I. S. E., Couce M. L., de Meirleir L., Dobbelaere D., Furlan F., Gleich F., Gonzalez M. J., Gradowska W., Grunewald S., Honzik T., Horster F., Ioannou H., Jalan A., Haberle J., Haege G., Langereis E., de Lonlay P., Martinelli D., Matsumoto S., Mühlhausen C., Murphy E., de Baulny H. O., Ortez C., Pedron C. C., Pintos-Morell G., Pena-Quintana L., Ramadza D. P., Rodrigues E., Scholl-Burgi S., Sokal E., Summar M. L., Thompson N., Vara R., Pinera I. V., Walter J. H., Williams M., Lund A. M. and Garcia-Cazorla A. (2015b). "The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype." *J Inherit Metab Dis* 38(6): 1059-1074.

59. Komatsuzaki S., Ediga R. D., Okun J. G., Kölker S. and Sauer S. W. (2018). "Impairment of astrocytic glutaminolysis in glutaric aciduria type I." *J Inherit Metab Dis* 41(1): 91-99.

60. Kyllerman M., Skjeldal O., Christensen E., Hagberg G., Holme E., Lonquist T., Skov L., Rotwelt T. and von Dobeln U. (2004). "Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1." *Eur J Paediatr Neurol* 8(3): 121-129.

61. Kyllerman M. and Steen G. (1980). "Glutaric aciduria. A "common" metabolic disorder?" *Arch Fr Pediatr* 37(4): 279.

62. Lamp J., Keyser B., Koeller D. M., Ullrich K., Bräulke T. and Mühlhausen C. (2011). "Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells." *J Biol Chem* 286(20): 17777-17784.

63. Lee C. S., Chien Y. H., Peng S. F., Cheng P. W., Chang L. M., Huang A. C., Hwu W. L. and Lee N. C. (2013). "Promising outcomes in glutaric aciduria type I patients detected by newborn screening." *Metab Brain Dis* 28(1): 61-67.
64. Levy H. L., Milanowski A., Chakrapani A., Cleary M., Lee P., Trefz F. K., Whitley C. B., Feillet F., Feigenbaum A. S., Bebhuk J. D., Christ-Schmidt H., Dorenbaum A. and Sapropterin Research G. (2007). "Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study." *Lancet* 370(9586): 504-510.
65. Lindner M., Ho S., Fang-Hoffmann J., Hoffmann G. F. and Kölker S. (2006). "Neonatal screening for glutaric aciduria type I: strategies to proceed." *J Inherit Metab Dis* 29(2-3): 378-382.
66. Macdonald B., McCarley S., Noeen S. and van Giessen A. E. (2015). "Protein-protein interactions affect alpha helix stability in crowded environments." *J Phys Chem B* 119(7): 2956-2967.
67. Maier E. M., Gersting S. W., Kemter K. F., Jank J. M., Reindl M., Messing D. D., Truger M. S., Sommerhoff C. P. and Muntau A. C. (2009). "Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening." *Hum Mol Genet* 18(9): 1612-1623.
68. Masaki S., Hashimoto K., Kihara D., Tsuzuki C., Kataoka N. and Suzuki K. (2020). "The cysteine residue at 424th of pyruvate kinase M2 is crucial for tetramerization and responsiveness to oxidative stress." *Biochem Biophys Res Commun* 526(4): 973-977.
69. Monavari A. A. and Naughten E. R. (2000). "Prevention of cerebral palsy in glutaric aciduria type 1 by dietary management." *Arch Dis Child* 82(1): 67-70.
70. Mühlhausen C., Ergun S., Strauss K. A., Koeller D. M., Crnic L., Woontner M., Goodman S. I., Ullrich K. and Bräulke T. (2004). "Vascular dysfunction as an additional pathomechanism in glutaric aciduria type I." *J Inherit Metab Dis* 27(6): 829-834.
71. Muntau A. C., Adams D. J., Belanger-Quintana A., Bushueva T. V., Cerone R., Chien Y. H., Chiesa A., Coskun T., de Las Heras J., Feillet F., Katz R., Lagler F., Piazzon F., Rohr F., van Spronsen F. J., Vargas P., Wilcox G. and Bhattacharya K. (2019). "International best practice for the evaluation of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 127(1): 1-11.
72. Muntau A. C., Burlina A., Eyskens F., Freisinger P., De Laet C., Leuzzi V., Rutsch F., Sivri H. S., Vijay S., Bal M. O., Gramer G., Pazdirkova R., Cleary M., Lotz-Havla A. S., Munafo A., Mould D. R., Moreau-Stucker F. and Rogoff D. (2017). "Efficacy, safety and population pharmacokinetics of sapropterin in PKU patients <4 years: results from the SPARK open-label, multicentre, randomized phase IIIb trial." *Orphanet J Rare Dis* 12(1): 47.

73. Muntau A. C., Leandro J., Staudigl M., Mayer F. and Gersting S. W. (2014). "Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators." *J Inher Metab Dis* 37(4): 505-523.
74. Muntau A. C., Roschinger W., Habich M., Demmelmair H., Hoffmann B., Sommerhoff C. P. and Roscher A. A. (2002). "Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria." *N Engl J Med* 347(26): 2122-2132.
75. Nasser I., Mohsen A. W., Jelesarov I., Vockley J., Macheroux P. and Ghisla S. (2004). "Thermal unfolding of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and iso(3)valeryl-CoA dehydrogenase: study of the effect of genetic defects on enzyme stability." *Biochim Biophys Acta* 1690(1): 22-32.
76. Nennstiel U., Lüders A., Blankenstein O., Ensenauer R., Fingerhut R., Gramer G., Janzen N., Klein J., Lankes E., Lindner M., Lukacs Z., Mauerer R., Maier E., Müller C., Rönicke S., Röschinger W., Sommerburg O., Stopsack M., Zeyda M. and Ceglarek U. (2019). "Nationaler Screeningreport Deutschland 2017."
77. Neumaier-Probst E., Harting I., Seitz A., Ding C. and Kölker S. (2004). "Neuroradiological findings in glutaric aciduria type I (glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency)." *J Inher Metab Dis* 27(6): 869-876.
78. Niesen F. H., Berglund H. and Vedadi M. (2007). "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability." *Nat Protoc* 2(9): 2212-2221.
79. Parini R. and Corbetta C. (2011). "Metabolic screening for the newborn." *The Journal of Fetal and Neonatal Medicine*(1476-4954 (Electronic)).
80. Pey A. L., Perez B., Desviat L. R., Martinez M. A., Aguado C., Erlandsen H., Gamez A., Stevens R. C., Thorolfsson M., Ugarte M. and Martinez A. (2004). "Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations." *Hum Mutat* 24(5): 388-399.
81. Pey A. L., Ying M., Cremades N., Velazquez-Campoy A., Scherer T., Thony B., Sancho J. and Martinez A. (2008). "Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria." *J Clin Invest* 118(8): 2858-2867.
82. Pfeil J., Listl S., Hoffmann G. F., Kölker S., Lindner M. and Burgard P. (2013). "Newborn screening by tandem mass spectrometry for glutaric aciduria type 1: a cost-effectiveness analysis." *Orphanet J Rare Dis* 8: 167.
83. Pusti S., Das N., Nayek K. and Biswas S. (2014). "A treatable neurometabolic disorder: glutaric aciduria type 1." *Case Rep Pediatr* 2014: 256356.
84. Quirk M. E., Dobrowolski S. F., Nelson B. E., Coffee B. and Singh R. H. (2012). "Utility of phenylalanine hydroxylase genotype for tetrahydrobiopterin responsiveness classification in patients with phenylketonuria." *Mol Genet Metab* 107(1-2): 31-36.

85. Ribeiro J. V., Lucas T. G., Bross P., Gomes C. M. and Henriques B. J. (2020). "Potential complementation effects of two disease-associated mutations in tetrameric glutaryl-CoA dehydrogenase is due to inter subunit stability-activity counterbalance." *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1868(1): 140269.
86. Rocha H., Castineiras D., Delgado C., Egea J., Yahyaoui R., Gonzalez Y., Conde M., Gonzalez I., Rueda I., Rello L., Vilarinho L. and Cocho J. (2014). "Birth Prevalence of Fatty Acid beta-Oxidation Disorders in Iberia." *JIMD Rep* 16: 89-94.
87. Sauer S. W., Opp S., Hoffmann G. F., Koeller D. M., Okun J. G. and Kölker S. (2011). "Therapeutic modulation of cerebral L-lysine metabolism in a mouse model for glutaric aciduria type I." *Brain* 134(Pt 1): 157-170.
88. Scala I., Concolino D., Della Casa R., Nastasi A., Ungaro C., Paladino S., Capaldo B., Ruoppolo M., Daniele A., Bonapace G., Strisciuglio P., Parenti G. and Andria G. (2015). "Long-term follow-up of patients with phenylketonuria treated with tetrahydrobiopterin: a seven years experience." *Orphanet J Rare Dis* 10: 14.
89. Scaturro G., Sanfilippo C., Piccione M., Piro E., Giuffre M. and Corsello G. (2013). "Newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: past, present and future." *Pediatr Med Chir* 35(3): 105-109.
90. Schmiesing J., Lohmoller B., Schweizer M., Tidow H., Gersting S. W., Muntau A. C., Braulke T. and Mühlhausen C. (2017). "Disease-causing mutations affecting surface residues of mitochondrial glutaryl-CoA dehydrogenase impair stability, heteromeric complex formation and mitochondria architecture." *Hum Mol Genet* 26(3): 538-551.
91. Schmiesing J., Schluter H., Ullrich K., Braulke T. and Mühlhausen C. (2014). "Interaction of glutaric aciduria type 1-related glutaryl-CoA dehydrogenase with mitochondrial matrix proteins." *PLoS One* 9(2): e87715.
92. Schmiesing J., Storch S., Dorfler A. C., Schweizer M., Makrypidi-Fraune G., Thelen M., Sylvester M., Gieselmann V., Meyer-Schwesinger C., Koch-Nolte F., Tidow H., Mühlhausen C., Waheed A., Sly W. S. and Braulke T. (2018). "Disease-Linked Glutarylation Impairs Function and Interactions of Mitochondrial Proteins and Contributes to Mitochondrial Heterogeneity." *Cell Rep* 24(11): 2946-2956.
93. Seminotti B., Amaral A. U., Ribeiro R. T., Rodrigues M. D. N., Colin-Gonzalez A. L., Leipnitz G., Santamaria A. and Wajner M. (2016). "Oxidative Stress, Disrupted Energy Metabolism, and Altered Signaling Pathways in Glutaryl-CoA Dehydrogenase Knockout Mice: Potential Implications of Quinolinic Acid Toxicity in the Neuropathology of Glutaric Acidemia Type I." *Mol Neurobiol* 53(9): 6459-6475.
94. Somaraju U. R. and Merrin M. (2015). "Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria." *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD008005.

95. Staudigl M., Gersting S. W., Danecka M. K., Messing D. D., Woidy M., Pinkas D., Kemter K. F., Blau N. and Muntau A. C. (2011). "The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response." *Hum Mol Genet* 20(13): 2628-2641.
96. Strauss K. A. and Morton D. H. (2003a). "Type I glutaric aciduria, part 2: a model of acute striatal necrosis." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C(1): 53-70.
97. Strauss K. A., Puffenberger E. G., Robinson D. L. and Morton D. H. (2003b). "Type I glutaric aciduria, part 1: natural history of 77 patients." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 121C(1): 38-52.
98. Tan M., Peng C., Anderson K. A., Chhoy P., Xie Z., Dai L., Park J., Chen Y., Huang H., Zhang Y., Ro J., Wagner G. R., Green M. F., Madsen A. S., Schmiesing J., Peterson B. S., Xu G., Ilkayeva O. R., Muehlbauer M. J., Braulke T., Mühlhausen C., Backos D. S., Olsen C. A., McGuire P. J., Pletcher S. D., Lombard D. B., Hirschey M. D. and Zhao Y. (2014). "Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5." *Cell Metab* 19(4): 605-617.
99. Tao J., Li N., Jia H., Liu Z., Li X., Song J., Deng Y., Jin X. and Zhu J. (2015). "Correlation between genotype and the tetrahydrobiopterin-responsive phenotype in Chinese patients with phenylketonuria." *Pediatr Res* 78(6): 691-699.
100. Trefz F. K., Muntau A. C., Lagler F. B., Moreau F., Alm J., Burlina A., Rutsch F., Belanger-Quintana A., Feillet F. and investigators K. (2015). "The Kuvan((R)) Adult Maternal Paediatric European Registry (KAMPER) Multinational Observational Study: Baseline and 1-Year Data in Phenylketonuria Patients Responsive to Sapropterin." *JIMD Rep* 23: 35-43.
101. Tuncel A. T., Boy N., Morath M. A., Horster F., Mutze U. and Kölker S. (2018). "Organic acidurias in adults: late complications and management." *J Inherit Metab Dis* 41(5): 765-776.
102. Tyedmers J., Mogk A. and Bukau B. (2010). "Cellular strategies for controlling protein aggregation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(11): 777-788.
103. Utz J. R., Lorentz C. P., Markowitz D., Rudser K. D., Diethelm-Okita B., Erickson D. and Whitley C. B. (2012). "START, a double blind, placebo-controlled pharmacogenetic test of responsiveness to sapropterin dihydrochloride in phenylketonuria patients." *Mol Genet Metab* 105(2): 193-197.
104. Vabulas R. M., Raychaudhuri S., Hayer-Hartl M. and Hartl F. U. (2010). "Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a004390.
105. van der Watt G., Owen E. P., Berman P., Meldau S., Watermeyer N., Olpin S. E., Manning N. J., Baumgarten I., Leisegang F. and Henderson H. (2010). "Glutaric aciduria type 1 in South Africa-high incidence of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in black South Africans." *Mol Genet Metab* 101(2-3): 178-182.

106. van Wegberg A. M. J., MacDonald A., Ahring K., Belanger-Quintana A., Blau N., Bosch A. M., Burlina A., Campistol J., Feillet F., Gizewska M., Huijbregts S. C., Kearney S., Leuzzi V., Maillot F., Muntau A. C., van Rijn M., Trefz F., Walter J. H. and van Spronsen F. J. (2017). "The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment." *Orphanet J Rare Dis* 12(1): 162.
107. Viau K., Ernst S. L., Vanzo R. J., Botto L. D., Pasquali M. and Longo N. (2012). "Glutaric acidemia type 1: outcomes before and after expanded newborn screening." *Mol Genet Metab* 106(4): 430-438.
108. Waters P. J., Parniak M. A., Hewson A. S. and Scriver C. R. (1998). "Alterations in protein aggregation and degradation due to mild and severe missense mutations (A104D, R157N) in the human phenylalanine hydroxylase gene (PAH)." *Hum Mutat* 12(5): 344-354.
109. Westover J. B., Goodman S. I. and Frerman F. E. (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.
110. Wilcken B., Hammond J. and Silink M. (1994). "Morbidity and mortality in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency." *Arch Dis Child* 70(5): 410-412.
111. Yannicelli S., Rohr F. and Warman M. L. (1994). "Nutrition support for glutaric acidemia type I." *J Am Diet Assoc* 94(2): 183-188,191; quiz 189-190.
112. Yusupov R., Finegold D. N., Naylor E. W., Sahai I., Waisbren S. and Levy H. L. (2010). "Sudden death in medium chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency (MCADD) despite newborn screening." *Mol Genet Metab* 101(1): 33-39.
113. Zhou S., Cheng J., Yang T., Ma M., Zhang W., Yuan S., Lo G. V. and Dou Y. (2019). "Exploration of the Misfolding Mechanism of Transthyretin Monomer: Insights from Hybrid-Resolution Simulations and Markov State Model Analysis." *Biomolecules* 9(12).
114. Zielonka M., Braun K., Bengel A., Seitz A., Kölker S. and Boy N. (2015). "Severe Acute Subdural Hemorrhage in a Patient With Glutaric Aciduria Type I After Minor Head Trauma: A Case Report." *J Child Neurol* 30(8): 1065-1069.
115. Zschocke J., Quak E., Guldberg P. and Hoffmann G. F. (2000). "Mutation analysis in glutaric aciduria type I." *J Med Genet* 37(3): 177-181.
116. Zürflüh M. R., Zschocke J., Lindner M., Feillet F., Chery C., Burlina A., Stevens R. C., Thony B. and Blau N. (2008). "Molecular genetics of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency." *Hum Mutat* 29(1): 167-175.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Struktur des GCDH-Enzyms | 7 |
| Abbildung 2: Ablauf der LR-Reaktion..... | 23 |
| Abbildung 3: SEC der Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne | 30 |
| Abbildung 4: SEC der Varianten der Beta-Faltblatt Domäne..... | 31 |
| Abbildung 5: SEC der Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne | 32 |
| Abbildung 6: SEC der Varianten gereinigt in Kaliumphosphatpuffer mit Glycerin | 32 |
| Abbildung 7: RALS des GCDH-Wiltyps bei verschiedenen Proteinkonzentrationen..... | 33 |
| Abbildung 8: RALS der Varianten der N-terminalen Alpha-Domäne | 34 |
| Abbildung 9: RALS der Varianten der Beta-Faltblatt Domäne..... | 35 |
| Abbildung 10: RALS der Varianten der C-terminalen Alpha-Domäne | 35 |
| Abbildung 11: RALS der Varianten A293T und A433V | 36 |
| Abbildung 12: DSF des GCDH-Wiltyps bei verschiedenen SYPRO® Orange Konzentrationen | 37 |
| Abbildung 13: DSF sämtlicher Varianten | 40 |
| Abbildung 14: Native Fluoreszenz im Grundzustand..... | 42 |
| Abbildung 15: Ergebnis der Site Directed Mutagenesis | 45 |
| Abbildung 16: LR-Reaktion der pENTRY-Klone in den Zielvektor pEF DEST51..... | 48 |
| Abbildung 17: Westernblot des GCDH-Wiltyps und der Varianten aus COS-7 Zellen | 50 |
| Abbildung 18: Westernblot des GCDH-Wildtyps und Varianten aus COS-7 Zellen (BN-PAGE)..... | 51 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle. 1: Cluster der untersuchten GCDH Varianten | 27 |
| Tabelle. 2: Oligomerisierung von GCDH-Wildtyp und Varianten im prokaryoten System (HEPES) | 29 |
| Tabelle. 3: Oligomerisierung von GCDH-Wildtyp und Varianten im prokaryoten System (Kaliumphosphat mit Glycerin)..... | 29 |
| Tabelle 4: T _m -Werte von GCDH-Wildtyp und Varianten..... | 41 |
| Tabelle 5: T _m -Werte des GCDH-Wildtyps und Varianten nach Hinzugabe von FAD..... | 45 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|-------------------------------------------------------|
| 3-OHGA: | 3-hydroxy Glutarsäure |
| NPA: | 3-Nitropropionsäure |
| ACADM-Gen: | acyl-CoA-dehydrogenase-medium-chain-Gen |
| BN-PAGE: | BlueNative-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| CACT: | Carnitin/Acylcarnitin-Translokase |
| CPT: | Carnitin-Palmitoyltransferase |
| DLST: | Dihydrolipoamid-S-succinyltransferase |
| DNA: | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS: | Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline |
| DSF: | Differential Scanning Fluometry |
| EDTA: | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ETFB: | Elektron-Transfer-Flavoproteins, Beta-Subunit |
| FAD: | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| GA: | Glutarsäure |
| GA1: | Glutarazidurie, Typ 1 |
| GABA: | Gamma-Amino-Buttersäure |
| GAPDH: | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GCDH: | Glutaryl-CoA-Dehydrogenase |
| HEPES: | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HRP: | horseradish-Peroxidase |
| IPTG: | Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid |
| LB-Medium: | lysogeny-broth-Medium |
| LCHAD: | Long-Chain-3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase |
| LCHADD: | Long-Chain-3-OH-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel |
| LDS: | Lithiumdodecylsulfat |
| MBP: | Maltose-binding-protein |
| MCAD: | Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase |
| MCADD: | Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel |
| MOPS: | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure |
| NaCl: | Natrium-Chlorid |
| PBS: | phosphate buffered saline |
| PCR: | Polymerase Chain Reaction |
| PKM2: | Pyruvat Kinase Isoform M2 |
| PVDF: | Polyvinylidenfluorid |
| RALS: | Right-angle-light-scattering |
| SDM: | Site Directed Mutagenesis |
| SCID: | schwerer kombinierter Immundefekt |
| TBS: | Tris-buffered-saline |
| TTR: | Transthyretin |
| VLCAD: | (Very-)Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase |
| VLCADD: | (Very-)Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel |

Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank meiner Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht hat. Speziell meiner Mutter möchte ich danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und die mich immer anfeuerte durchzuhalten, auch wenn es einmal schwer wurde. Darüber hinaus möchte ich meiner Doktormutter Frau Professor Ania Muntau und unserem Laborleiter Herrn Professor Søren Gersting danken, die mir die Möglichkeit gaben, mich im Rahmen dieses Projektes mit der Erhebung von wissenschaftlichen Daten vertraut zu machen, die mir beibrachten replizierbare Daten in einen neuen Kontext zu setzen und von verschiedenen Blickwinkeln aus zu betrachten. Zusätzlich möchte ich mich für die exzellente Betreuung und Unterstützung bei der Erarbeitung dieser Dissertation bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Frau Petra Kleucker für die Beratung während des Promotionsstudienganges molekulare Medizin und bei allen Beteiligten des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Frau Doktor Dunja Reiß und Frau Doktor Marta Danecka bedanken, die mich stets durch meinen Alltag im Labor begleitet haben und mich zusammen mit Herrn Andreas Sturm und Frau Heike Preißler in die Methoden eingearbeitet und mich bei der Datenauswertung unterstützt haben. Außerdem gilt mein Dank meinem ehemaligen Oberarzt, Herrn Privatdozent Rüter und meinem Klinikdirektor Herrn Professor Falkai, die mich immer antrieben am Ball zu bleiben und meine Dissertation abzuschließen. Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinem Partner Herrn Florian Belhocine bedanken, der in der Zeit des redigierens Großteile der alltäglich anfallenden Aufgaben übernommen hat. Ihnen und Euch allen gilt mein besonderer Dank und ohne Sie und Euch hätte ich diese Arbeit nie abschließen können. Danke!

Eidesstattliche Versicherung

Gertzen, Marcus

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Störung der Proteinfaltung und zur stabilisierenden Wirkung
niedermolekularer Verbindungen auf das Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Protein

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

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

München, 27.06.2021

Ort, Datum

Marcus Gertzen

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand