

**Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase:
Charakterisierungen des Enzyms
und des Enzymdefektes**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften an
der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Sonja C. Stadler

Dissertation eingereicht am: 14.06.2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. H. Weiß

2. Berichterstatter: PD Dr. J. Meurer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Die biotinabhängigen Carboxylasen	1
1.1.1	Die Bindung des Biotins in biotinabhängigen Carboxylasen	1
1.1.2	Gemeinsamer katalytischer Mechanismus der biotinabhängigen Carboxylasen	2
1.1.3	Die Gruppe der humanen biotinabhängigen Carboxylasen	4
1.2	Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC)	5
1.2.1	Die Geschichte des Enzyms	5
1.2.2	Biochemische Grundlagen	5
1.2.3	Molekularbiologische Grundlagen	7
1.3	Mitochondrialer Proteinimport	8
1.3.1	Mechanismen des Imports von Präproteinen	8
1.3.2	Mitochondriale Signalpeptide	11
1.4	Der humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel	12
2.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
3.	MATERIAL	16
3.1	Chemikalien	16
3.2	Enzyme und Nukleotide	16
3.3	Allgemeine Puffer und Lösungen	16
3.4	Synthese- und Nachweis-Kits	17
3.5	Längen- und Molekulargewichtsstandards	17
3.6	Bakterienstämme	17
3.7	Anzuchtmedien	17
3.8	Eukaryontische Zellen und Zell-Linien	18
3.9	Oligonukleotide	18
3.10	Vektoren und Plasmide	21
3.11	Antikörper, sekundäre Antikörper, Nachweisreagenzien	21
3.12	Membranen und Blottingpapier	22
3.13	Affinitäts-Säulen und -Matrices	22
3.14	Patientenkollektiv	22
3.15	Spezielle Geräte	23
4.	METHODEN	24
4.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren	24
4.1.1	Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren	24
4.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
4.1.3	Isolierung von Nukleinsäuren	24
4.1.4	Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	26

4.1.5	Reinigung von PCR-Produkten	28
4.1.6	Subklonierung von PCR-Produkten	29
4.1.7	Nachweis einer Insertion in rekombinante Plasmide mittels PCR	29
4.1.8	DNA-Sequenzierung durch Cycle Sequencing	29
4.1.9	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	30
4.1.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
4.1.11	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
4.1.12	Dephosphorylierung von DNA-Enden	31
4.1.13	Ligation von DNA-Fragmenten	32
4.1.14	Erstellung von Expressionsvektoren	32
4.2	Arbeiten mit Bakterien	34
4.2.1	Lagerung	34
4.2.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> (DH5 α) Zellen	35
4.2.3	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	35
4.3	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	36
4.3.1	Herstellung einer humanen Hautfibroblastenkultur	36
4.3.2	Allgemeine Zellkultur	36
4.3.3	Magnetofektion von eukaryontischen Zellen	38
4.4	Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen	39
4.4.1	Herstellung von Zell-Lysaten für den 3-MCC-Enzymaktivitätsassay	39
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford	39
4.4.3	Messung der spezifischen 3-MCC-Aktivität	40
4.4.4	Immunfluoreszenzfärbung	41
4.4.5	Fluoreszenzmikroskopie	42
4.4.6	Isolierung von MCC α und MCC β aus humanem Nierengewebe	43
4.4.7	2D-Gelelektrophorese von Proteinen	45
4.4.8	Peptidmassenfingerprint (PMF-MALDI-MS) von Proteinen	45
4.4.9	Aminoterminaler Sequenzierung von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β	45
4.4.10	In vitro Import-Assay mit isolierten Hefemitochondrien	45
4.4.11	Generierung von Peptid-Antikörpern gegen MCC α und MCC β	46
4.4.12	Reinigung der Peptid-Antikörper gegen MCC α und MCC β mit dem SulfoLink [®] Kit	47
4.4.13	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	48
4.4.14	Aufschluss geernteter <i>E. coli</i> Zellen	48
4.4.15	Präparation und Solubilisierung von <i>Inclusion Bodies</i>	49
4.4.16	In vitro Translation von MBP-MCC α und MBP-MCC β	50
4.4.17	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen	50
4.4.18	Western Blot und Immundetektion von Proteinen	51
4.4.19	Ankonzentrieren und Entsalzen von Proteinlösungen	52
4.4.20	Präparative Proteinreinigung mittels FPLC	53
4.4.21	Proteolytische Spaltung der MBP-Fusionsproteine mittels Faktor Xa	54

5.	ERGEBNISSE	55
5.1	Klonierung der <i>MCCB</i> -cDNA in pGEM-T Easy	55
5.2	Alignments mit <i>MCCα</i> - und <i>MCCβ</i> -Primärstrukturen anderer Spezies weisen auf aminoternale Signalpeptide hin	55
5.3	Erstellung von cDNA-Vektoren für die Expression von <i>MCCα</i> und <i>MCCβ</i> in eukaryontischen Systemen	57
5.3.1	<i>MCCα</i> - und <i>MCCβ</i> - <i>Myc</i> -His-Fusionsproteine werden in die Mitochondrien humaner Fibroblasten importiert	58
5.4	<i>MCCα</i> und <i>MCCβ</i> werden in die Matrix von Hefemitochondrien importiert	59
5.5	Native Reinigung von <i>MCCα</i> und <i>MCCβ</i> aus humanem Nierengewebe	61
5.6	<i>MCCα</i> und <i>MCCβ</i> können durch 2D-Gelelektrophorese und Peptidmassenfingerprint (PMF-MALDI-MS) identifiziert werden	62
5.7	Aminoternale Sequenzierung der 3-MCC und PCC-Untereinheiten definiert die prozessierten Peptide	67
5.8	Rekombinante Expression und Reinigung von MBP- <i>MCCα</i> und MBP- <i>MCCβ</i> -Fusionsproteinen	68
5.8.1	Bestimmung der Enzymaktivität rekombinant exprimierter MBP- <i>MCCα</i> - und MBP- <i>MCCβ</i> -Fusionsproteine	69
5.8.2	In vitro Translation der Fusionsproteine MBP- <i>MCCα</i> und MBP- <i>MCCβ</i> mit den Chaperoninen groES und groEL	69
5.8.3	Affinitätsreinigung der Fusionsproteine MBP- <i>MCCα</i> - und MBP- <i>MCCβ</i>	71
5.8.4	Abtrennen des MBP-Tags durch die Protease Faktor Xa	73
5.9	Generierung von Peptidantikörpern gegen <i>MCCα</i> und <i>MCCβ</i>	74
5.9.1	Reinigung der Peptidantikörper gegen <i>MCCα</i> und <i>MCCβ</i> mit dem SulfoLink® Kit	76
5.10	Klonierung, Expression und Reinigung von <i>MCCα</i> - und <i>MCCβ</i> -Proteinanteilen für die Generierung von polyklonalen Antikörpern	79
5.10.1	Klonierung, Expression und Reinigung von <i>MCCβ</i> (AS 321-543)	79
5.10.2	Klonierung, Expression und Reinigung von <i>MCCα</i> (AS 402-643)	82
5.11	Biochemische und genotypische Charakterisierung von Individuen mit 3-MCC-Mangel	84
5.11.1	Identifizierung des 3-MCC-Mangels durch das erweiterte Neugeborenen-Screening in Bayern	84
5.11.2	Mutationsanalyse von 28 Individuen mit bestätigtem 3-MCC-Mangel	85
5.11.3	Das Spektrum der <i>MCCA</i> - und <i>MCCB</i> -Mutationen	85
5.11.4	Mutationen im <i>MCCA</i> -Gen	87
5.11.5	Mutationen im <i>MCCB</i> -Gen	89
5.11.6	Messungen der in vitro 3-MCC-Aktivität in Patienten-Fibroblasten	90
5.11.7	Gegenüberstellung der Genotypen und biochemischen bzw. klinischen Phänotypen der untersuchten Individuen	93
5.11.8	Klinische Phänotypen bisher beschriebener Individuen mit 3-MCC-Mangel (Literaturanalyse) und Vergleich mit der hier analysierten Kohorte	97

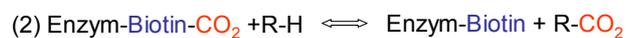
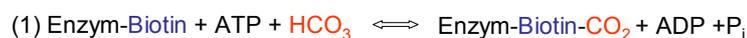
6.	DISKUSSION	101
6.1	Alignments aminoterminaler Abschnitte von MCC α und MCC β verschiedener Spezies	101
6.2	MCC α -Myc-His- und MCC β -Myc-His-Fusionsproteine werden in die Mitochondrien humaner Hautfibroblasten importiert	103
6.3	Mitochondrialer in vitro Import-Assay der Untereinheiten MCC α und MCC β	104
6.4	Native Reinigung von MCC α und MCC β aus humanem Nierengewebe	105
6.5	Identifizierung von MCC α und MCC β durch die Kombination von 2D-Gelelektrophorese und PMF-MALDI-Massenspektrometrie	106
6.6	Aminoterminaler Sequenzierung von MCC α und MCC β	108
6.7	Rekombinante Expression und Reinigung von MBP-MCC α und MBP-MCC β -Fusionsproteinen	110
6.8	In vitro Translation der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β mit den Chaperoninen groES und groEL	111
6.9	Affinitätsreinigung der MBP-Fusionsproteine und Abtrennen des MBP-Tags durch Faktor Xa	112
6.10	Generierung von Peptidantikörpern gegen MCC α und MCC β	113
6.11	Klonierung, Expression und Reinigung von MCC α - und MCC β -Proteinanteilen für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern	115
6.12	Genotypische, biochemische und klinische Charakterisierung von Individuen mit 3-MCC-Mangel	116
6.13	Ausblick	121
7.	ZUSAMMENFASSUNG	122
8.	LITERATURVERZEICHNIS	124
9.	ANHANG	132
9.1	Verwendete Vektoren	132
9.2	Alignments von Proteinsequenzen	133
9.3	Phosphorylierungsvorhersagen des NetPhos 2.0 Servers für MCC α (725 AS)	137
9.4	Phosphorylierungsvorhersagen des NetPhos 2.0 Servers für MCC β (563 AS)	139
9.5	ELISA-Bindungstests der Peptidantikörper gegen die Peptide MCC α 3032 und MCC β 3034	141
10.	ABKÜRZUNGEN	142

1. Einleitung

Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, die in der vorliegenden Arbeit behandelt wird, gehört zur Familie der biotinabhängigen Carboxylasen. Diese Enzyme besitzen viele katalytische und strukturelle Gemeinsamkeiten, die im Folgenden näher erläutert werden sollen.

1.1 Die biotinabhängigen Carboxylasen

Die Familie der biotinabhängigen Carboxylasen setzt sich aus Enzymen zusammen, die Biotin als kovalent gebundene prosthetische Gruppe benötigen. Zu dieser Gruppe zählen Acetyl-CoA-Carboxylase, Pyruvat-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase, 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, Geranoyl-CoA-Carboxylase, Oxaloacetat-Decarboxylase, Methylmalonyl-CoA-Carboxylase, Glutaconyl-CoA-Decarboxylase, Transcarboxylase und Harnstoff-Amidolyase (Lane et al., 1974). Diese Enzyme erfüllen unterschiedliche Aufgaben in verschiedenen Stoffwechselprozessen und sind sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten zu finden. Die Reaktionen, die von den meisten Mitgliedern dieser Enzymklasse katalysiert werden, können in zwei Schritte eingeteilt werden: (1) Die Carboxylierung von Biotin unter Verbrauch von ATP und Bicarbonat und (2) die Transcarboxylierung des CO₂ von Biotin auf spezifische Akzeptor-Substrate (R):



1.1.1 Die Bindung des Biotins in biotinabhängigen Carboxylasen

Biotin, oder auch Vitamin H genannt, dient als Cofaktor für eine Gruppe von Enzymen, welche Carboxylierungen, Decarboxylierungen oder auch Transcarboxylierungen katalysieren (Lane et al., 1964). Biotin ist aus einem bizyklischen Ring,

gebunden an eine Valerat-Seitenkette, aufgebaut (Abb. 1). Biotin wird über eine Amid-Bindung zwischen seiner Valerat-Seitenkette und der ϵ -amino-Gruppe eines spezifischen Lysinrests des Enzyms kovalent an dieses gebunden (McAllister und Coon, 1966). Diese Art der posttranslationalen Modifikation wird durch das Enzym Holocarboxylase-Synthetase (EC 6.3.4.10) bewerkstelligt und ist außerordentlich spezifisch für Biotin-Akzeptor-Proteine. Unter Anwesenheit von ATP bindet die Holocarboxylase-Synthetase Biotin kovalent an eine Apocarboxylase, die dadurch zur Holocarboxylase wird. Nach katalytischer Degradierung der aktiven Holocarboxylase in kurze Biotinyl-Peptide und Biocytin, wird Biotin durch das Enzym Biotinidase aus dem Komplex entfernt, um wieder verwendet zu werden.

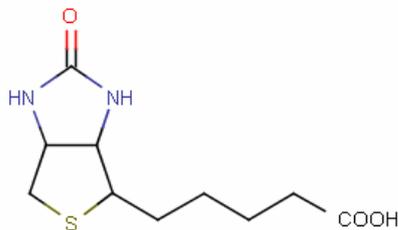


Abb.1: Strukturformel von Biotin.

1.1.2 Gemeinsamer katalytischer Mechanismus der biotinabhängigen Carboxylasen

Die Reaktionen, die durch biotinabhängige Carboxylasen katalysiert werden, haben einen sehr ähnlichen katalytischen Mechanismus. Die meisten dieser Enzyme besitzen drei funktionelle Domänen gemeinsam: Die Biotin-Carboxylierungs-Domäne (BC), die Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne (BCC) und die Carboxyltransferase-Domäne (CT). Die erste Teilreaktion involviert die Fixierung von CO_2 an Biotin (Abb. 2). Für diese Reaktion ist die Kooperation der Domänen BC und BCC notwendig, da das Biotin, gebunden an BCC, in Richtung BC bewegt werden muss, um carboxyliert zu werden. Das Carboxybiotin bewegt sich in einem zweiten Schritt zur CT-Komponente, was in der Carboxylierung des jeweiligen spezifischen Substrats oder in der Generierung von freiem CO_2 resultiert (Abb. 3). Die Carboxylierung des Biotins erfolgt über einen Zwischenschritt, bei dem zunächst aus ATP und Bicarbonat Carboxyphosphat gebildet wird, welches dann CO_2 auf das Biotin überträgt (Knowles, 1989).

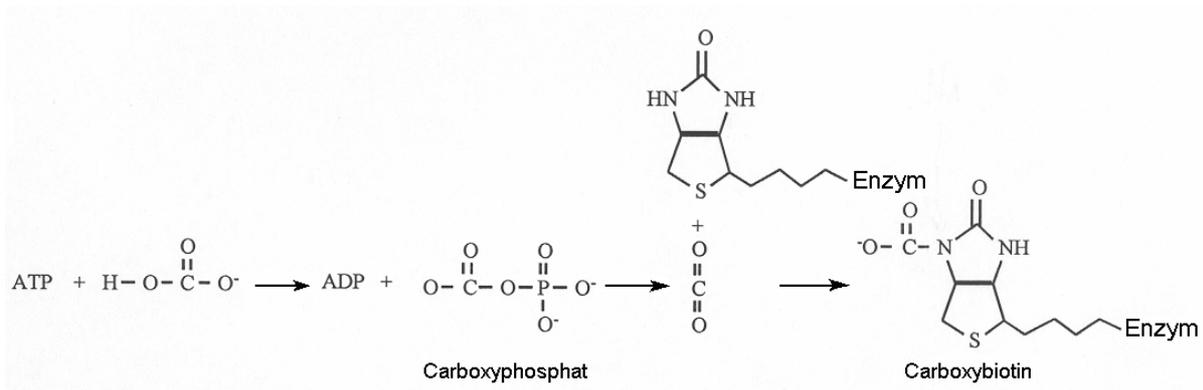


Abb. 2: Die Bildung von Carboxybiotin. Die Reaktion läuft über den Zwischenschritt der Carboxyphosphatbildung.

Die drei funktionell wichtigen Domänen sind in fast allen biotinabhängigen Carboxylasen strukturell hoch konserviert. Beispielsweise findet sich innerhalb der BC Domäne eine Glycin-reiche Region (GGGGRG), welche zur Bildung der ATP-Bindungstasche beiträgt (Kondo et al., 1991). Die BCC-Domänen der biotinabhängigen Enzyme beinhalten typischerweise die Aminosäure-Abfolge AMKM. Das für die Funktionsfähigkeit erforderliche Biotin wird kovalent an den Lysinrest (K) dieser Sequenz gebunden. Die Sequenzabfolge AMKM ist in fast allen biotinabhängigen Carboxylasen circa 35 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt. Die korrekte Position des Lysinrestes ist für die Erkennung durch das Enzym Holocarboxylase-Synthetase überaus wichtig (Reche et al., 1998).

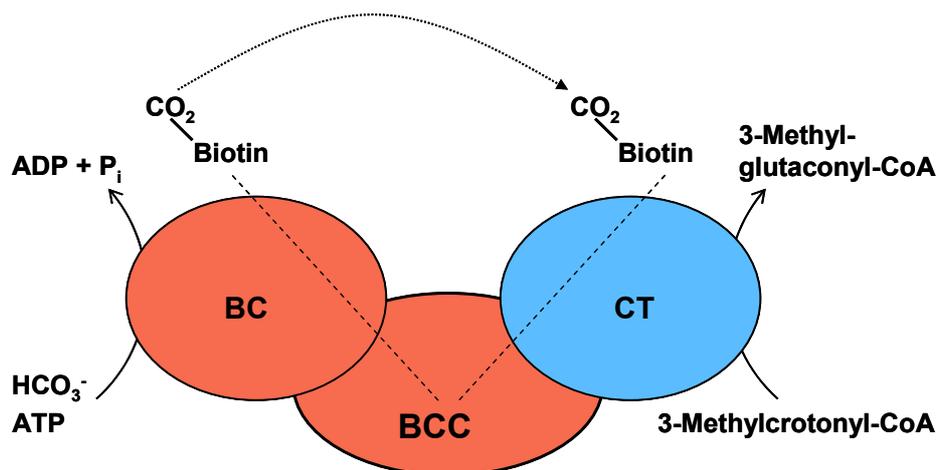


Abb. 3: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen und des Reaktionsmechanismus von biotinabhängigen Enzymen. Am Beispiel der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wird das Zusammenspiel der Domänen BCC und BC gezeigt, welches zur Bildung von Carboxybiotin führt. Das carboxylierte Biotin wird in einem zweiten Schritt zur Domäne CT bewegt, welche die Carboxylierung des Substrats (3-Methylcrotonyl-CoA) katalysiert. BCC=Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne, BC=Biotin-Carboxylierungs-Domäne, CT=Carboxyltransferase-Domäne.

1.1.3 Die Gruppe der humanen biotinabhängigen Carboxylasen

Der Mensch besitzt vier biotinabhängige Carboxylasen, die an unterschiedlichen Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Die cytosolische Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC, EC 6.4.1.2) katalysiert die Carboxylierung von Acetyl-CoA, woraus Malonyl-CoA entsteht, welches ein Vorläufer für die *de novo* Fettsäure-Biosynthese ist (Wakil et al., 1983). Pyruvat-Carboxylase (PCC, EC 6.4.1.1), Propionyl-CoA-Carboxylase (PYC, EC 6.4.1.3) und 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC, EC 6.4.1.4) sind mitochondrial lokalisiert. Die Pyruvat-Carboxylase katalysiert die ATP-getriebene Carboxylierung von Pyruvat, woraus Oxaloacetat entsteht. Oxaloacetat wiederum spielt in verschiedenen biosynthetischen Stoffwechselwegen, wie der Gluconeogenese und der Fettsäure-Synthese eine wichtige Rolle (Jitrapakdee und Wallace, 1999). Die Propionyl-CoA-Carboxylase ist am Katabolismus der Aminosäuren Valin, Isoleucin, Methionin und Threonin, ungeradzahligter Fettsäuren und Cholesterin beteiligt. Die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase ist in den Abbau der Aminosäure L-Leucin involviert und wird im Folgenden näher erläutert. Die mitochondrialen Carboxylasen besitzen große strukturelle Übereinstimmungen (Abb. 4), wobei die Homologie zwischen PCC und 3-MCC besonders stark ausgeprägt ist.

ATP-Bindungstasche Aminosäuren 206-217

MCCA	180	GYHGEDQSDQCLKEHARRIGYPVMIKAVR	GGGKGMRIVRSEQEFQLESARREAKKSF
PCCA	169	GFDGVVKDAEEAVRIAREIGYPVMIKASA	GGGKGMRIAWDDEETRDGFERLSSQEAASF
PYC	169	GTDAPITSLHEAHEFSNTYGFPIIFKAAY	GGGGRGMRVHVSYELEENYTRAYSEALAF

Biotin-Bindungsdomäne Aminosäuren 678-682

MCCA	664	AGDKVKAGDSLMMVMIAMKMEHTIKSPKDGTVKKV	FYREGCAQANRHTPLVFEFEESDKRE
PCCA	652	PGDAVAEGQEIFCVTEAMKMONSMTAGKTGTVK	SVHCQAGDTVGEGLLVELE-----
PYC	1127	AGAKVAKGQPLCVLSAMKMEIVVTSPMEGTVRKVH	VTKDMTLEGDDLILELE-----

Abb. 4: Aminosäuresequenz-Alignment der mitochondrialen biotinabhängigen Carboxylasen. Die Darstellung zeigt Alignments der hoch konservierten AS-Sequenzen der ATP-Bindungstasche und der Biotinbindestelle (beide rot eingerahmt) der humanen 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, Propionyl-CoA-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase.

1.2 Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC)

1.2.1 Die Geschichte des Enzyms

1959 wurde von 3-MCC als einem Enzym berichtet, welches an der Carboxylierung von 3-Methylcrotonyl-CoA in Hühnerleber beteiligt ist (Del Campillo-Campbell et al., 1959). Zwei Jahre später konnten Lynen et al. 3-MCC der Gruppe der biotinabhängigen Carboxylasen zuordnen (Lynen et al., 1961). In den anschließenden Jahren folgte die Entdeckung der 3-MCC, und ihrer Rolle im L-Leucin-Abbau, in vielen verschiedenen Säugetieren und Bakterien wie *Achromobacter* und *P. citronellis* (Wood und Barden, 1977). 1979 gelang die Isolierung des Enzyms aus Rinderniere und es konnte erstmals gezeigt werden, dass 3-MCC aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten besteht (Lau et al., 1979). Darauf folgte die Aufklärung der subzellulären Lokalisation. Lau et al. konnten 1980 zeigen, dass bovine 3-MCC mitochondrial lokalisiert ist (Lau et al., 1980). In den Jahren darauf folgte die Aufklärung des Enzyms in verschiedenen Pflanzen wie *Daucus carota*, *Zea mays* und *Brassica napus* (Wurtele und Nikolau, 1990). Anfang der 90er Jahre wurde die cDNA des für die Biotin enthaltende α -Untereinheit kodierenden 3-MCC-Gens (*MCCA*) in verschiedenen Pflanzen beschrieben: *Glyzine max* (Song et al., 1994), *Lycopersicon esculentum* (Wang et al., 1994) und *Arabidopsis thaliana* (Weaver et al., 1995). 2000 gelang auch die molekulare Charakterisierung des *MCCB*-Gens in *A. thaliana*, welches für die kleinere β -Untereinheit kodiert. Diese Arbeiten, in Verbindung mit dem hohen Konservierungsgrad der MCC-Gene in Pflanzen, Säugetieren und Menschen, bildeten die Grundlage für die erfolgreiche Klonierung der humanen *MCCA* und *MCCB* cDNA-Sequenzen im Jahr 2001 (Holzinger et al., 2001, Baumgartner et al., 2001, Gallardo et al., 2001). Diese Klonierungen waren der Startschuss für funktionelle Untersuchungen der humanen 3-MCC.

1.2.2 Biochemische Grundlagen

3-MCC (3-Methylcrotonyl-CoA: Kohlendioxid Ligase; ADP bildend) ist am Abbau der essentiellen verzweigtkettigen Aminosäure L-Leucin beteiligt (Abb.5). Diese wird mit Hilfe des Natrium-unabhängigen System-L-Transporters der Plasmamembran in die

Zelle aufgenommen (Prentki und Renold, 1983). L-Leucin wird zunächst im Cytosol reversibel zu 2-Oxoisocaproinsäure desaminiert. Die gebildete 2-Oxosäure wird durch einen für verzweigtkettige Aminosäuren (AS) spezifischen BCKA-Transporter (Branched-Chain-Keto-Acid-Transporter) in die mitochondriale Matrix geschleust (Hutson und Rannels, 1985), wobei durch eine irreversible oxidative Decarboxylierung Isovaleryl-CoA entsteht. Die anschließende Dehydrogenierung zu 3-Methylcrotonyl-CoA durch eine spezifische Acyl-CoA-Dehydrogenase ist vergleichbar mit der von Fettsäuren in der β -Oxidation. Für die folgende Bildung von 3-Methylglutaconyl-CoA sind ATP und Bicarbonat notwendig (Lynen et al., 1961). 3-Methylglutaconyl-CoA wird dann zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA hydratisiert, aus dem Acetyl-CoA und Acetoacetat oder Mevalonat hervorgehen. Diese gehen beispielsweise in den Citratzyklus oder in die Cholesterin- bzw. Fettsäuresynthese ein.

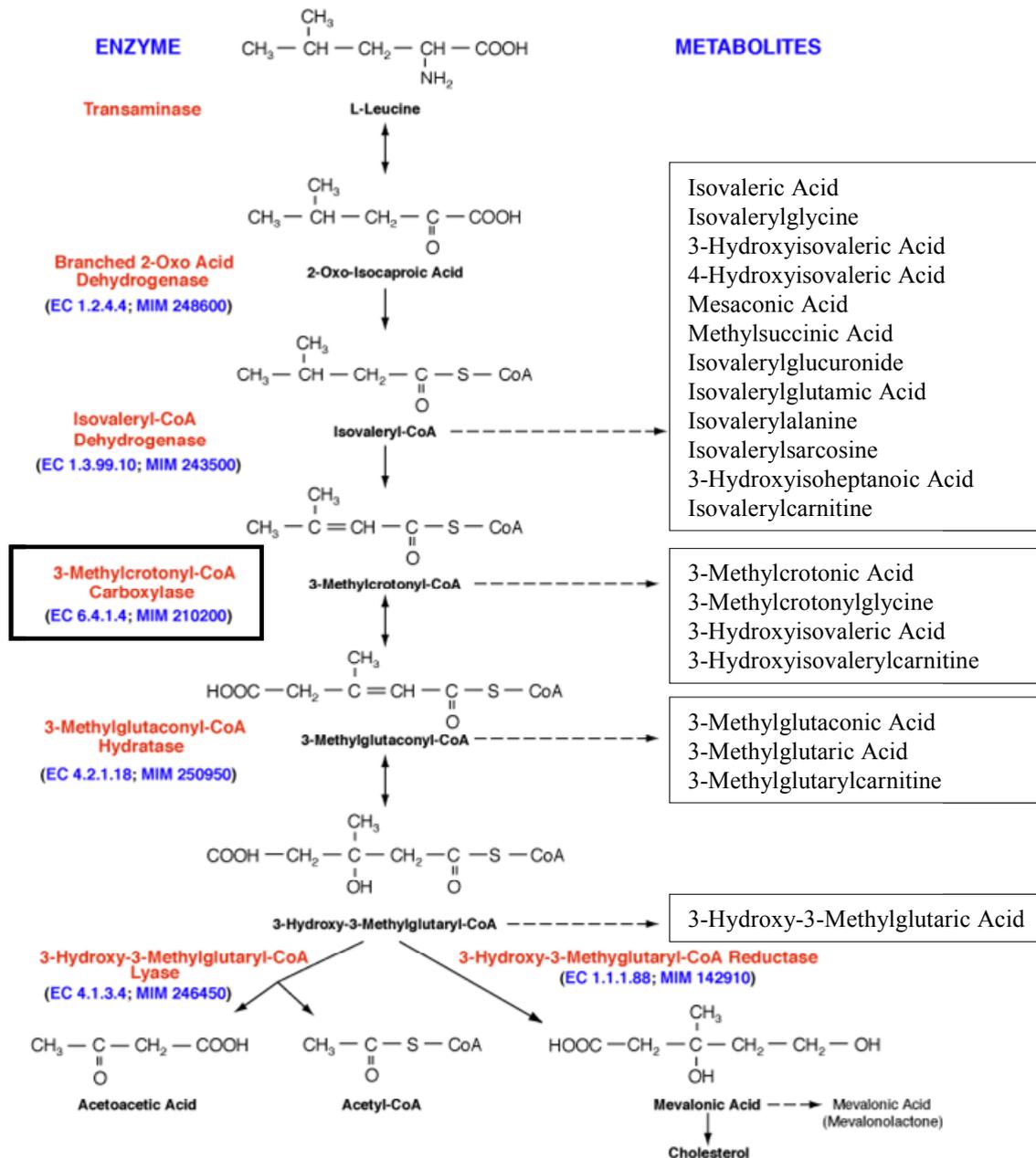


Abb. 5: Abbauweg von L-Leucin. Das Enzym 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase katalysiert den vierten Schritt des Leucin-Abbaus und carboxyliert 3-Methylcrotonyl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA.

1.2.3 Molekularbiologische Grundlagen

3-MCC setzt sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten zusammen (Abb. 6). Die größere α -Untereinheit (MCC α) umfasst 80,5 kDa (725 AS) und beinhaltet die Biotin-Carboxylierungs-Domäne (BC) und die Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne (BCC).

MCC β ist mit 61,3 kDa (563 AS) die kleinere Untereinheit und wird fast vollständig von der Carboxyltransferase-Domäne eingenommen. Der Aufbau des bovinen

3-MCC-Holoenzym ist aufgrund von detaillierten Studien des aus der Rinderniere isolierten Enzyms bekannt. Es bildet ein Dodecamer aus jeweils sechs α - und β -Untereinheiten ($\alpha\beta$)₆ (Lau et al., 1980). Für das humane Enzym wird derselbe Aufbau vermutet, bisher gibt es jedoch keine experimentell bestätigten Erkenntnisse zum oligomeren Status der humanen 3-MCC.

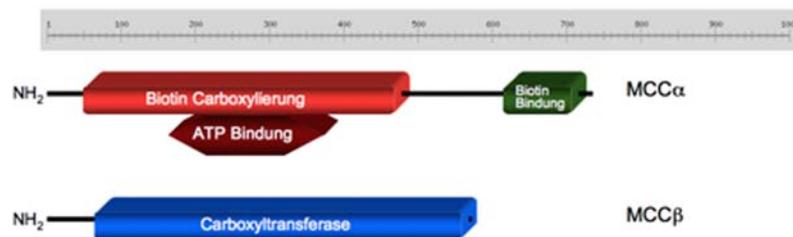


Abb. 6: Die Untereinheiten MCC α und MCC β und ihre funktionellen Domänen. Die α -Untereinheit enthält die Biotin-Carboxylierungs-Domäne (AS 48-494), welche die ATP-Bindestelle (AS 167-364) einschließt. Am Carboxylterminus von MCC α ist die Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne (AS 629-714) lokalisiert. MCC β wird fast vollständig von der Carboxyltransferase-Domäne (AS 55-557) eingenommen. Die Informationen für diese Darstellung wurden dem Protein-Analyse-Portal ExPASy (www.expasy.org) entnommen.

Die beiden Untereinheiten MCC α und MCC β werden durch die Gene *MCCA* und *MCCB* codiert. *MCCA* ist auf Chromosom 3 lokalisiert (3q26-28) und umfasst 19 Exone (2178 Basenpaare). Das *MCCB*-Gen besteht aus 17 Exonen (1692 Basenpaare) und ist auf Chromosom 5 (5q13) lokalisiert (Holzinger et al., 2001).

1.3 Mitochondrialer Proteinimport

1.3.1 Mechanismen des Imports von Präproteinen

Abgesehen von wenigen Proteinen, die in den Mitochondrien selbst synthetisiert werden, stammen alle mitochondrialen Proteine aus dem Cytosol der Zelle. Mitochondrien enthalten circa 15-20% aller zellulären Proteine, was bedeutet, dass diese Organellen an die 1000 Proteine importieren. Die korrekte Sortierung und der korrekte Import dieser Proteine sind für das Überleben jeder Zelle essentiell. Die Translokation von Proteinen in die Mitochondrien ist komplex, da diese Organellen aus vier Subkompartimenten bestehen: Der äußeren Membran, dem Intermembranraum, der inneren Membran und der Matrix. Hydrophile Präproteine,

die in die mitochondriale Matrix eingebracht werden sollen, müssen zwei Membranen und den Intermembranraum überwinden, um zu ihrem endgültigen Bestimmungsort zu gelangen. Die Vorläufer hydrophober Proteine der inneren Mitochondrienmembran müssen die äußere Membran passieren, ohne in ihr verankert zu werden und müssen zusätzlich den wässrigen Intermembranraum überqueren. Die Mitochondrien besitzen hoch entwickelte molekulare Mechanismen, um die Richtigkeit der Proteinsortierung zu gewährleisten (Abb. 7).

Die meisten mitochondrialen Präproteine tragen aminoternale oder auch interne Signalpeptide (Hurt et al., 1984, Horwich et al., 1985) und werden im ungefalteten Zustand zur äußeren Mitochondrienmembran geleitet. Hilfsproteine wie das cytosolische Chaperon Hsp70 und MSF (Mitochondrial import Stimulating Factor) verhindern dabei eine Degradation oder spontane Faltung der Proteine (Lithgow, 2000). Die Signalpeptide werden von der so genannten Translokase der äußeren Membran erkannt (translocase of outer membrane, TOM) (Sollner et al., 1992, Bolliger et al., 1995, Brix et al., 1997, Abe et al., 2000). Die Maschinerie der TOM besteht aus drei Rezeptorproteinen Tom20, Tom22 und Tom70, aus dem Kanalbildenden Protein Tom40 und drei kleinen Tom-Proteine mit den Bezeichnungen Tom5, Tom6 und Tom7 (Sollner et al., 1992, Dekker et al., 1998, Kunkele et al., 1998, Meisinger et al., 2001, Dietmeier et al., 1997). Die Proteine Tom22, Tom40 und die kleinen Tom-Proteine bilden den stabilen TOM-Kernkomplex (circa 400 kDa), der als GIP (general import pore) bezeichnet wird. Nach dem Überqueren der äußeren Membran durch die GIP der Translokase werden die Präproteine zu einer der zwei Translokasen der inneren Membran (translocase of inner membrane, TIM) dirigiert. Alle Proteine, die aminoternale Signalpeptide besitzen, werden zum Komplex Tim23 transportiert, der einen Kanal durch die Membran bildet (Dekker et al., 1997) (Lohret et al., 1997, Bauer et al., 1996). Das Membranpotential $\Delta\psi$ der inneren Membran treibt den Transfer der Proteine durch den Kanal an (Martin et al., 1991). In der Matrix sorgt ein ATP-getriebener Motor, der von einem Chaperonsystem gebildet wird, für den Import der Präproteine (Kang et al., 1990, Horst et al., 1997, Voos et al., 1996, Schneider et al., 1996). Die Signalpeptide der eingeschleusten Präproteine werden hier von der Mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten (Hawliitschek et al., 1988) und die Proteine falten sich zu ihrer aktiven Form. Dieser Prozess kann von Helferproteinen wie Hsp70, dem Chaperonin Hsp60 oder Peptidyl-Prolyl-Isomerasen unterstützt

werden (Kang et al., 1990, Ostermann et al., 1989, Rassow und Pfanner, 1995, Rospert et al., 1996). Hydrophobe Proteine der inneren Mitochondrienmembran mit internen Signalpeptiden, werden mit Hilfe der so genannten tiny TIMs zur zweiten Translokase TIM22 transportiert. Diese sorgt in einer Membranpotential-abhängigen Weise für die Insertion dieser Proteine in die innere Mitochondrienmembran (Sirrenberg et al., 1996, Kerscher et al., 1997, Sirrenberg et al., 1998, Koehler et al., 1998).

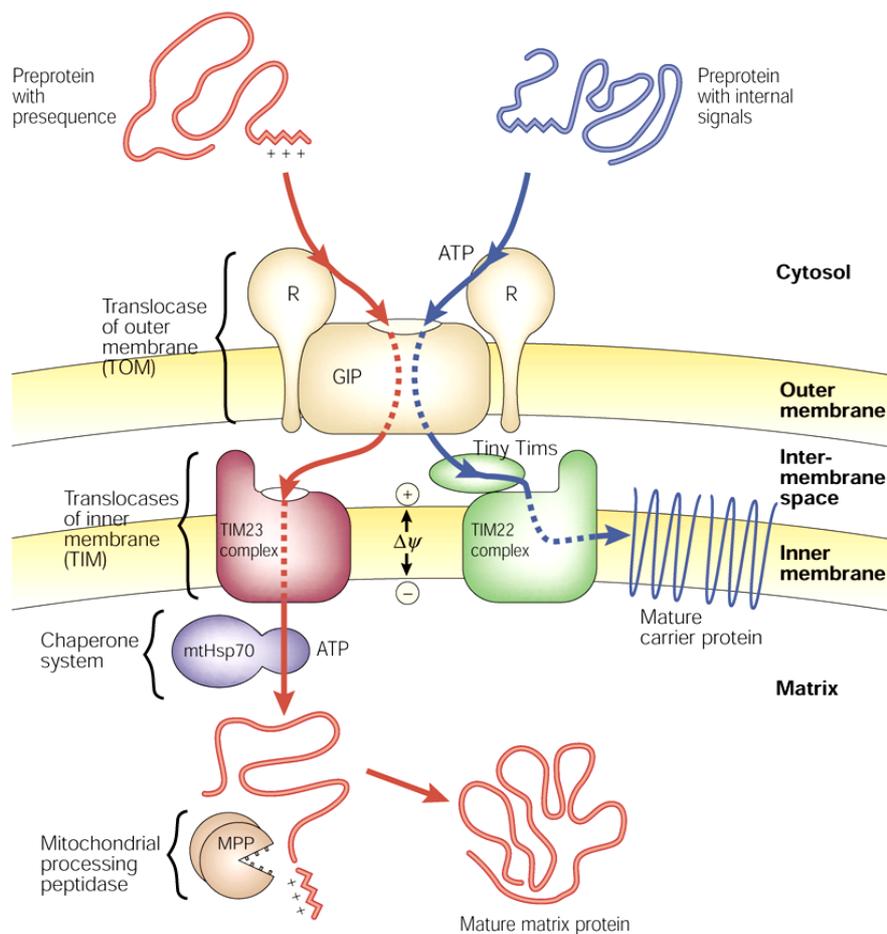


Abb. 7: Import von Präproteinen in das Mitochondrium. Die schematische Darstellung zeigt exemplarisch den Import eines Präproteins, das in die Matrix dirigiert wird (rot) und eines Präproteins, das in die innere Mitochondrienmembran integriert wird (blau). Die Proteine werden nach Erkennung des mitochondrialen Signalpeptids durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum geleitet, wo sie von spezifischen TIM-Komplexen entweder in die innere Membran oder in die mitochondriale Matrix transferiert werden. Matrixproteine werden entlang des elektrochemischen Gradienten der inneren Membran in die Matrix eingeschleust und von einem Hsp70-Chaperon-System weiter transportiert. Nach der Abspaltung des Signalpeptids durch die mitochondriale Prozessierungs-peptidase (MPP) entsteht das vollständig gefaltete, aktive Matrixprotein. (Nach Pfanner N. und Geissler A., 2001)

1.3.2 Mitochondriale Signalpeptide

Das klassische mitochondriale Signalpeptid ist eine spaltbare, aminoterminal lokalisierte Präsequenz von 10-80 Aminosäuren, welche als Targetingsignal für die mitochondriale Matrix fungiert (Abb. 8). Präsequenzen enthalten viele positiv geladene, hydrophobe und hydroxylierte Aminosäure-Reste (von Heijne, 1986). Negativ geladene Aminosäuren hingegen finden sich selten. Mitochondriale Signalpeptide haben charakteristischerweise die Fähigkeit, eine amphipatische α -Helix zu bilden, die eine positiv geladene und eine hydrophobe Oberfläche besitzt (Abe et al., 2000, Roise et al., 1986). Studien weisen darauf hin, dass die unterschiedlichen Oberflächen der amphipatischen α -Helix durch die verschiedenen Rezeptoren des TOM-Komplexes erkannt werden (Brix et al., 1997). Während die hydrophoben Aminosäuren der Präsequenz für die Interaktion mit der Bindungsfurche von Tom20 ausschlaggebend sind, werden die positiv geladenen Reste von Tom22 erkannt (Abe et al., 2000). Zusätzlich scheint die positive Nettoladung der Signalpeptide wichtig für den elektrophoretischen Effekt zu sein, den das Membranpotential $\Delta\psi$ der inneren Membran auf die Präsequenzen hat (Martin et al., 1991). Im Gegensatz zu Signalpeptiden anderer Zellorganellen, besitzen die mitochondrialen Präsequenzen kein einheitliches Aminosäuremotiv, das als Erkennungsmerkmal dient.



Abb. 8: Darstellung eines klassischen mitochondrialen Signalpeptids eines Matrixproteins. Die mitochondriale Präsequenz ist aminoterminal lokalisiert und bildet eine amphipatische α -Helix aus. Durch das abwechselnde Auftreten von mehreren hydrophoben (blau) und positiv geladenen (rot) Aminosäuren entsteht eine α -Helix mit einer hydrophoben und einer positiv geladenen Oberfläche. Die unterschiedlichen Oberflächen spielen bei der Erkennung durch den mitochondrialen TOM Komplex eine wichtige Rolle.
(Nach Pfanner N. und Geissler A., 2001)

Durch statistische Sequenzanalysen konnten mehrere Abfolgen von vier bis fünf Aminosäuren identifiziert werden, die häufig durch die MPP prozessiert werden. Hierbei scheint wichtig zu sein, dass die Aminosäure Arginin zwei bis drei Positionen von der Spaltstelle entfernt lokalisiert ist. Oftmals ist dann ein Serinrest an erster Stelle des prozessierten Peptids zu finden (Gavel und von Heijne, 1990, Hendrick et

al., 1989, Schneider et al., 1998). Die Abspaltung des Signalpeptids ist für die Funktionalität der importierten Proteine von entscheidender Bedeutung.

1.4 Der humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel

1982 berichteten Beemer et al. über einen fünfjährigen vietnamesischen Jungen, der mit seinen Eltern in die Niederlande immigriert war und mit rezidivierendem Erbrechen auffällig wurde. Anzeichen für eine Infektion waren zu diesem Zeitpunkt nicht vorhanden. Der Zustand des Patienten besserte sich unter Flüssigkeits- und Kohlenhydratzufuhr. Allerdings setzte nach Aufnahme von proteinhaltiger Nahrung das Erbrechen erneut ein. Der Junge konnte erst durch Einhaltung einer Proteinrestriktion stabilisiert werden (Beemer et al., 1982).

Die Analyse der organischen Säuren im Urin mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) führte zum Nachweis von erhöhten Konzentrationen an 3-Hydroxyisovaleriansäure (3-HIVA) und 3-Methylcrotonylglycin (3-MCG).

Dieser Befund ließ einen 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel vermuten, der anschließend enzymatisch bestätigt werden konnte. Die Substitution mit dem Cofaktor Biotin führte zu keiner biochemischen Veränderung der Laborparameter. Damit wurde erstmals ein Patient mit isoliertem 3-MCC-Mangel beschrieben.

Der isolierte 3-MCC-Mangel (OMIM *210200) wird autosomal rezessiv vererbt. Die Enzymdefizienz führt zu einer Anhäufung von 3-Methylcrotonyl-CoA, welche eine vermehrte renale Ausscheidung der organischen Säuren 3-HIVA und 3-MCG nach sich zieht. Zugleich werden akkumulierende Acyl-CoA-Verbindungen intramitochondrial zu Acylcarnitinen umgesetzt (siehe Abb. 9). 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin (3-HIVA-Carnitin) ist der quantitativ bedeutsamste pathologische Metabolit, der sich sowohl im Blut als auch im Urin nachweisen lässt. Dieser Metabolit entsteht vermutlich primär durch Hydratisierung von 3-Methylcrotonyl-CoA zu 3-HIVA-CoA gefolgt von einer Esterkoppelung mit Carnitin (Röschinger et al., 1995).

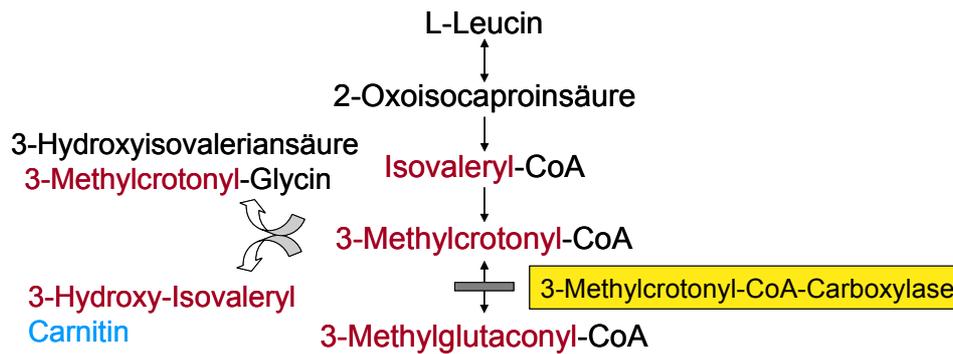


Abb. 9: Darstellung des Enzymblocks der 3-MCC. Der Enzymdefekt führt zur vermehrten renalen Ausscheidung der organischen Säuren 3-Hydroxyisovaleriansäure und 3-Methylcrotonyl-Glycin. Zusätzlich kommt es zur Bildung von Acylcarnitinen, wie 3-Hydroxy-Isovaleryl-Carnitin.

Die Diagnosestellung beruht auf der Bestimmung des Acylcarnitinprofils im Vollblut oder Plasma mittels Tandem-Massenspektrometrie (Tandem-MS) zum Nachweis von 3-HIVA-Carnitin sowie auf der Analyse von organischen Säuren im Urin mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) zum Nachweis von 3-HIVA und 3-MCG. Unter den Betroffenen findet sich regelmäßig, aufgrund der Ausschleusung der akkumulierenden Acyl-CoA-Verbindungen durch die Bindung an Carnitin, ein sekundärer Carnitinmangel (Röschinger et al., 1995, Bartlett et al., 1984, Lehnert et al., 1996). Differentialdiagnostisch muss immer ein biotinabhängiger multipler Carboxylase-Mangel (Holocarboxylase-Synthetase, OMIM *253270 bzw. Biotinidase, OMIM *253260) ausgeschlossen werden. Bei erneuter Evaluation der ersten beschriebenen Patienten mit einem vermeintlichen 3-MCC-Mangel konnte nachträglich eine biotinabhängige Störung nachgewiesen werden.

Bis 1999 erfasste das Neugeborenen-Screening (NGS) in Deutschland flächendeckend die Erkrankungen Galaktosämie, Phenylketonurie und Hypothyreose. Die Erweiterung des NGS durch die Einführung der Tandem-Massenspektrometrie machte es möglich, zusätzlich bis zu 30 angeborene Stoffwechselerkrankungen zu identifizieren. Zu diesen Erkrankungen zählen unter anderem Störungen der Fettsäureoxidation, Störungen im Aminosäurestoffwechsel und organische Azidämien, zu welchen auch der 3-MCC-Mangel gehört. Die meisten organischen Azidämien gehen mit einem schweren Krankheitsbild einher und zeigen eine hohe Penetranz.

Der 3-MCC-Mangel wurde lange Zeit für eine sehr seltene Erkrankung gehalten. Die Daten aus den NGS-Programmen verschiedener Länder zeigen allerdings eine Inzidenz von 1:64.000 bis 1:250.000 (Chace et al., 2002, Koeberl et al., 2003,

Schulze et al., 2003, Wilcken et al., 2003, Zytkovicz et al., 2001). Im Rahmen des bayerischen NGS wurde der 3-MCC-Mangel mit einer Frequenz von 1:85.000 diagnostiziert, was für eine sehr große Anzahl von asymptomatischen Betroffenen spricht, welche klinisch unauffällig bleiben und daher vor Einführung des NGS nicht identifiziert wurden (Stadler et al. 2006, in press). Dennoch werden in der Literatur neben Betroffenen mit schweren Krankheitsverläufen auch 4 verstorbene Patienten beschrieben (Bannwart et al., 1992, Baykal et al., 2005, Dodelson de Kremer et al., 2002, Jurecki und Packman, 1992, Kobori et al., 1989).

Bisherige Therapieempfehlungen bestehen aus der vorsorgenden Aufklärung von betroffenen Familien und präventiven Maßnahmen, um metabolischen Krisen zu verhindern. Katabole Episoden, die im Rahmen von Fastenperioden, fieberhaften Infekten und nach Operationen entstehen, können durch den Abbau von körpereigenem Eiweiß (und damit auch der Aminosäure Leucin) hervorgerufen werden. Zusätzlich soll auch eine überhöhte Aufnahme von eiweißreichen Nahrungsmitteln wie Milch oder Fleisch vermieden werden. Eine angepasste Diät mit einer Proteinrestriktion von 1,5 g/kg x d, bei gleichzeitiger Zufuhr einer Leucin-freien Aminosäuren-Mischung, kann hier hilfreich sein. Initial wird die Gabe von Biotin empfohlen, wenn auch bisher nur zwei Individuen beschrieben wurden, bei welchen die Zufuhr des Kofaktors Biotin in pharmakologischer Dosierung zu einem Abfall der akkumulierenden Metabolite und in einem Fall auch zur Besserung der Symptomatik geführt hatte (Baumgartner et al., 2004). Bei allen Patienten wird die Substitution mit Carnitin empfohlen, um akkumulierende Metabolite auszuschleusen und einen sekundären Carnitinmangel zu verhindern.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziele dieser Arbeit waren biochemische Charakterisierungen des Enzyms 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase und seiner Untereinheiten auf Proteinebene, um Voraussetzungen für detaillierte Expressionsstudien in eukaryontischen und prokaryontischen Systemen zu schaffen.

Ein Schwerpunkt war die Aufklärung der strukturellen Voraussetzungen der 3-MCC-Untereinheiten für den mitochondrialen Import. Die Durchführung eines mitochondrialen in vitro Import-Assays sollte Erkenntnisse zur Prozessierung und Größe vorhandener Signalpeptide bringen. Zusätzlich sollten Informationen zur subkompartimentären Lokalisation des Enzyms und zum Importmechanismus gewonnen werden.

Mit einer aminoterminalen Ansequenzierung nativ gereinigter humaner MCC α - und MCC β -Proteine sollten die exakten Aminotermini der prozessierten Peptide bestimmt werden. Diese Ergebnisse sollten als Grundlage für die Entwicklung eines prokaryontischen Expressionssystems dienen.

Die Generierung von Peptidantikörpern gegen MCC α und MCC β sollte die Nachweismöglichkeit rekombinant exprimierter 3-MCC-Proteine gewährleisten.

Neben den Charakterisierungen auf Proteinebene sollten betroffene Individuen mit bestätigtem 3-MCC-Mangel genotypisch und biochemisch analysiert werden. Die Analyse dieser Daten und der Vergleich mit einer retrospektiven, in der Literatur beschriebenen, Kohorte an Betroffenen sollte Erkenntnisse bezüglich möglicher Korrelationen zwischen biochemischem bzw. klinischem Phänotyp und zugrunde liegender Allelvarianten bringen.

3. Material

3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *p.a.*-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Bio-Rad (München), Biozym Diagnostik (Oldendorf), GibcoBRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), OXOID LTD. (Basingstoke, England), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH GmbH (Steinheim, Taufkirchen), Pharmacia (Freiburg).

Radiochemikalien

[¹⁴C]Natriumbicarbonat (250 µCi/ml) wurde von der Firma Hartmann Analytik, Braunschweig bezogen.

3.2 Enzyme und Nukleotide

Sämtliche Restriktionsenzyme sowie dazugehörige Puffer wurden von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), bezogen. Weitere Enzyme und Nukleotide wie nachfolgend aufgelistet:

Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Polymerization Mix (20 mM/dNTP)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CIP	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
Faktor Xa Cleavage Kit	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
DNase 1	SIGMA-ALDRICH GmbH, Steinheim
Lysozym	SIGMA-ALDRICH GmbH, Steinheim

3.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteile	Hersteller/Anmerkungen
PBS		SIGMA-ALDRICH GmbH, Steinheim
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA	ad 1000 ml H ₂ O bidest, pH 8,0 einstellen
TBS-Puffer	20 mM Tris, 140 mM NaCl	ad 1000 ml H ₂ O bidest, pH 7,5 einstellen
TE-Puffer	10 mM TrisHCl, pH=8,0; 1 mM EDTA	ad 1000 ml H ₂ O bidest, pH 8,0 einstellen

Die allgemein gebräuchlichen Puffer und Lösungen wurden mit H₂O bidest, welches von der Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU bezogen wurde, hergestellt. Anwendungsspezifische Puffer werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

3.4 Synthese- und Nachweis-Kits

Kits zur Synthese von Nukleinsäuren, Sequenzier-Kits

First Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Expand High Fidelity PCR System	Roche GmbH, Mannheim
Expand Long Template PCR System	Roche GmbH, Mannheim
dRhodamin Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Warrington, USA
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Warrington, USA

Kit für die in vitro Translation von zirkulärer DNA

E. coli S30 Extract System for circular DNA	Promega Corporation, Madison, USA
---	-----------------------------------

Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration

BIO-RAD Protein Assay	BIO-RAD, München
-----------------------	------------------

Nachweis-Kit für Mycoplasmen in kultivierten Zellen

Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
------------------------------------	------------------------------

3.5 Längen- und Molekulargewichtsstandards

DNA-Längenstandards

1 kb DNA Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA Molecular Weight Marker V	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Protein-Molekulargewichtsstandards

SeeBlue Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MultiMark Standard (1x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PageRuler™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.6 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15), hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>
<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ , <i>ompT, hsdS(r_B m_B), dcm⁺, Tet^r, gal, endA, Hte [argU, ileY, leuW, Cam^r]</i> (Fa. Stratagene, La Jolla, USA)

3.7 Anzuchtmedien

Medium	Bestandteile	Anmerkungen
LB-Medium	10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl	ad 1 l H ₂ O bidest, pH 7,4 einstellen, autoklavieren
Rich broth	5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl	ad 500 ml H ₂ O bidest, pH 7,4 einstellen, autoklavieren
Selektive LB-Agarplatten	20 g Agar, 50 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Chloramphenicol	ad 1000 ml LB-Medium, autoklavieren, Zugabe des AB nach Abkühlung auf 50°C

3.8 Eukaryontische Zellen und Zell-Linien

Bezeichnung	Zellart	Herkunft
HF1/D3	SV40 immortalisierte humane Fibroblasten	Institut für Bodenkultur, Wien Department für Biotechnologie
Patient 01-B-n 01-B-s 02-A-n 04-A-n 09-A-n 10-B-n 15-A-m	Humane Hautfibroblasten	Hautbiopsie der jeweiligen Patienten

Medien, Puffer und Antibiotika für die eukaryontische Zellkultur

DMEM Low Glucose (1,0 g/l)	PAA, Pasching, Österreich
Versen-Trypsin	Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
FCS	Biochrom AG, Berlin
Antibiotic/Antimycotic; 5 ml auf 500 ml Medium	PAA, Pasching, Österreich

3.9 Oligonukleotide

T_A gibt die in der jeweiligen PCR verwendete Annealingtemperatur an.

Oligonukleotide zur Amplifikation der *MCCA* bzw. *MCCB* cDNA nach RT-PCR

Primername	Sequenz	T_A
<i>MCCA</i> 5'UTR	5'-CGC AGC TGC CTC TGT ACT G-3'	53°C
<i>MCCA</i> Exon 11 rev	5'-ACT CCA GTT TCA ATC CTG GTG G-3'	53°C
<i>MCCA</i> Exon 11 for	5'-GCA GCA GGA GAG AAG ATT CC-3'	53°C
<i>MCCA</i> 3'UTR	5'- AGA GAG AAG ACA CTA CTT AAC TGG-3'	53°C
<i>MCCB</i> 5'UTR	5'-GGCCAGCGTGGGCCGCTCTCTCG-3'	53°C
<i>MCCB</i> 3'UTR	5'-GGCTACTACATGTGTTAATTTTCAG-3'	53°C

Oligonukleotide für die Herstellung der Expressionskonstrukte

Amplifikationsprimer	Sequenz	T_A
<i>MCCA</i> pDNA3.1 <i>EcoRI</i>	5'-AAAGAATTCGCCATGGCGGCGGCCTCT-3'	52°C
<i>MCCA</i> pDNA3.1 <i>XbaI</i> Δ Stop	5'-AAATCTAGATTCCGATTCCCTTTTGTCTGA-3'	52°C
<i>MCCB</i> pDNA3.1 <i>EcoRI</i>	5'-AAAGAATTCGCCATGTGGGCCGTCCTG-3'	52°C
<i>MCCB</i> pDNA3.1 <i>XbaI</i> Δ Stop	5'-AAATCTAGACATCCTGAAGATACCGAAGTC-3'	52°C
<i>MCCAp</i> ThioHis <i>EcoRI</i>	5'-AAAGAATTCGCCATGGCGGCGGCCTCT-3'	52°C
<i>MCCAp</i> ThioHis <i>XbaI</i>	5'-AAATCTAGATTCCCTTTTGTCTGA-3'	52°C
<i>MCCBp</i> ThioHis <i>EcoRI</i>	5'-AAAGAATTCGCCATGTGGGCCGTCCTG-3'	52°C
<i>MCCBp</i> ThioHis <i>XbaI</i>	5'-AAATCTAGATTACATCCTGAAGATACCGAA-3'	52°C
<i>MCCAp</i> MAL-c2 X <i>EcoRI</i>	5'-CCGAATTC AATGACAACAGCCACAG-3'	52°C
<i>MCCAp</i> MAL-c2 X <i>HindIII</i>	5'-AAAAGCTTTTATTCCGATTCCCTTTTG-3'	52°C
<i>MCCBp</i> MAL-c2 X <i>EcoRI</i>	5'-GGGAATTCATGTATCACGGGGAC-3'	52°C
<i>MCCBp</i> MAL-c2 X <i>HindIII</i>	5'-ATAGGATCCGCTAACCTTAAGAGG-3'	52°C
<i>MCCA</i> _AKpGEX-3X <i>BamHI</i>	5'-CAGGGATCCTAGTGCACCTCTCT-3'	52°C
<i>MCCA</i> _AKpGEX-3X <i>EcoRI</i>	5'-TTGGAATCTTAAGAAGATAAGTATTG-3'	52°C
<i>MCCB</i> _AKpMAL-c2X <i>EcoRI</i>	5'-ATAGGATCCGCTAACCTTAAGAGG-3'	52°C
<i>MCCB</i> _AKpMAL-c2X <i>HindIII</i>	5'-AAAAGCTTTTACATCCTGAAGATACC-3'	52°C

Oligonukleotide für die Sequenzierung der *MCCA* cDNA

cDNA	Sequenzierprimer	5' Sequenz 3'
<i>MCCA1</i>	600r	GCAGATGGAGGAGGGCCTAT
	biotEx8r	GCCATGGTGATCACCAAACACC
	1280r	CGAAGGCATGGCCCTGCAGAG
<i>MCCA2</i>	3r	GATGAAATCAGTGTGCACGTTCC
	1920r	GGTAAGTGCAGTCTCCCTCGC
	7r	AGAGAGAAGACACTACTTAACTGG

Oligonukleotide für die Sequenzierung der *MCCB* cDNA

cDNA	Sequenzierprimer	5' Sequenz 3'
gesamt	330r	CCTCTTGATATGTGAAGTGCTCG
	IIr	CGGCCAAAGTGGTCTCGATCTGG
	IIIr	AACTATTCCATACAATTCATCAGC
	IVr	CATAGTTTCCGGCTCCATAGGAGC
	Vr	GGCTACTACATGTGTTAATTTTCAG

Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzanalyse der genomischen *MCCA*-DNA

Exon	Bezeichnung	5' Sequenz 3'	T _A	PCR-Produkt in bp
1	<i>MCCA</i> int 1f	CGCAGCTGCCTCTGTACTGG	62°C	
	<i>MCCA</i> int1r	CCTCGCTCCCGCCTCTGCC	62°C	185
2	<i>MCCA</i> int 2f	CCCACTAAGAAAGTCTTACTAAAGC	62°C	
	<i>MCCA</i> int 2r	CTTAAACACTTCCAGTCTGAAGC	62°C	238
3	<i>MCCA</i> int 3f	CTCATTCTCATTCTTTGCTCTCC	60°C	
	<i>MCCA</i> int 3r	CCTACTTCAACCCTGATAACAC	60°C	312
4	<i>MCCA</i> int 4f	GTATAGTGTATGAGTATGTACTAGC	60°C	
	<i>MCCA</i> int 4r	CATCAGTTGCACAAAACGTATTCC	60°C	214
5	<i>MCCA</i> int 5f	CATTAAGGTGTTGCCAGTTGAGC	62°C	
	<i>MCCA</i> int 5r	GGCCCAAACACTATTTCAACTGACC	62°C	244
6	<i>MCCA</i> int 6f	GTAGAATTTGGGGCATGTTG	60°C	
	<i>MCCA</i> int 6r	CATAAATAAAACAAGAAGACAAGCC	60°C	247
7	<i>MCCA</i> int 7f	GGCTTGTCTTCTTTGTTTTATTATG	60°C	
	<i>MCCA</i> int 7r	GTCAGAAAATAAGGCCAACCC	60°C	203
8	<i>MCCA</i> int 8f	CCTAACAGTTTAGCTTAACG	55°C	
	<i>MCCA</i> int 8r	CAGAGTAAGATTCACATTACG	55°C	245
9	<i>MCCA</i> int 9f	CTAGTAAGGCAAGCTACTAATGG	55°C	
	<i>MCCA</i> int 9r	CTAAAACATAAATTAACACTGTTACG	55°C	325
10	<i>MCCA</i> int 10f	GCGGTAAAACCTTGATGTGATGC	60°C	
	<i>MCCA</i> int 10r	CCACCGCACCCAGCCAAGGC	60°C	263
11	<i>MCCA</i> int 11f	GTAGCCGCTATACGGTAGATTTTC	60°C	
	<i>MCCA</i> int 11r	GACTCAGGGATAAGAATGTGTCC	60°C	316
12	<i>MCCA</i> int 12f	CCTTCGTGTTTTGACTTGAAGAGG	62°C	
	<i>MCCA</i> int 12r	GGTGCTGACCAAACACATCAAGG	62°C	206
13	<i>MCCA</i> int 13f	CCCCACTCAGCAGGAACCTGGG	64°C	
	<i>MCCA</i> int 13r	TTTGCAAAACTTGACAAGCAGAGG	64°C	301
14	<i>MCCA</i> int 14f	TGTAAGGTGTAATTTTCATAGGC	55°C	
	<i>MCCA</i> int 14r	CAGATTAATGTGATACATTTCTATG	55°C	212

15	MCCA int 15f	GAGAGTGAGATTCTTTATATCTCGG	62 °C	
	MCCA int 15r	GTATAAAAGCGGTCAGATTCAGC	62 °C	189
16	MCCA int 16f	GATCTTATTAATTCTGTAGTGTGTTTC	55 °C	
	MCCA int 16r	GGTCAAACAGTTTTCTCCCATGC	55 °C	257
17	MCCA int 17f	GGTATATTAGTAAAAATATAGTGATAGG	55 °C	
	MCCA int 17r	TAAATGACAAGTTTAAACAAAGCCA	55 °C	244
18	MCCA int 18f	GCAGATGAACATATCTAGGACC	62 °C	
	MCCA int 18r	GGTATGATTGCTCCCAAAGTCC	62 °C	187
19	MCCA int 19f	CTCAGTCCTCATTAGTATTGCAGC	62 °C	
	MCCA int 19r	AGAGAGAAGACACTACTTAACTGG	62 °C	225

Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzanalyse der genomischen MCCB-DNA

Exon	Bezeichnung	5' Sequenz 3	T _A	PCR-Produkt in bp
1	MCCB int 1f	TGGACAGGCCTGAGAATCAGAG	64°C	+ 5% DMSO
	MCCB int 1r	CTCCTCCACTTGCTTCCTAGCC	64°C	330
2	MCCB int 2f	GAGCTTGAACAAGACAGGCAGG	60°C	
	MCCB int 2r	AAAGCAATAACTATTTTAGGACATC	60°C	330
3	MCCB int 3f	GAGACCTTTTTATCGTGTCAATCTAAT	62°C	
	MCCB int 3r	GTAATGGAACAGAGAACAC TC	62°C	188
4	MCCB int 4f	CATGTGTAAGTGTAAATGTGTAG	60°C	
	MCCB int 4r	TGGATGCCTGTGCCTCATCAAAGTC	60°C	237
5	MCCB int 5f	ATTGGGGTATCTTGTAATGAGTG	60°C	
	MCCB int 5r	ATACATACAGCCTTCCAAACTATC	60°C	283
6	MCCB int 6f	CGTAGCACATTTAGTTCATAGAG	60°C	
	MCCB int 6r	AGCCATCCCAGAGTACCTAATTCCG	60°C	245
7	MCCB int 7f	GCATCTCATGTGTTTGTCGTGTGC	62°C	
	MCCB int 7r	TACTAAACGTCACCAAGCTGTAAGT	62°C	312
8	MCCB int 8f	TGTCTGATGGACCGATTTCACTG	62°C	
	MCCB int 8r	TGGTGTGGTCTGGCAAGTTTAGC	62°C	214
9	MCCB int 9f	GAGAAGATACTTGGGACCTGAG	62°C	
	MCCB int 9r	CATGATTTCAAGGTGCAGTGAGTC	62°C	251
10	MCCB int 10f	TTGAAATCATGTCTTTAAACAGG	55°C	
	MCCB int 10r	ACATACAAAGAGACTCACAGCTGG	55°C	197
11	MCCB int 11f	GTGAAAGTGACAACTTCACTGTG	60°C	
	MCCB int 11r	AAGTCTTGAAACAAGAGATTCCTG	60°C	253
12	MCCB int 12f	GAAAAGCACAAAGACATAAATCTTC	60°C	
	MCCB int 12r	GGTTGCTGAGGCATCTAGTTAAGC	60°C	236
13	MCCB int 13f	TAGAATGCATGATGATAATAGAG	55°C	
	MCCB int 13r	ATGGTACAGCTCTGGAATCAATAC	55°C	184
14	MCCB int 14f	GGCGAGAGGCATTTAGTAAGATG	62°C	
	MCCB int 14r	ATCTGGGAATGGCATTCTATATTTTC	62°C	376
15	MCCB int 15f	CATGGGCCTCTGAAAATCTATGTTG	62°C	
	MCCB int 15r	GCAGCACAGTCTAAATATGGCCAGG	62°C	327
16	MCCB int 16f	AGTTGTTCACTGAAGCTGACTTAC	62°C	
	MCCB int 16r	ACCATCTCAACTACATAGAGCTCTG	62°C	219
17	MCCB int 17f	TAGTTTGGTGGTAAATTCATAACTC	60°C	
	MCCB int 17r	GGCTACTACATGTGTTAATTTTCAG	60°C	218

Oligonukleotide für Clone Screen PCR

Primername	Sequenz
malE	5'-GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC-3'
pGEX-3Xr	5'-CACCGAAACGCGCGAGGCAG-3'
SP6	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

3.10 Vektoren und Plasmide**Subklonierung von *MCCB*-cDNA**pGEM[®]-T Easy

Promega Corporation, Madison, USA

Expressionsvektoren:pcDNA3.1/*Myc-His A* (Amp^R)

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pMAL-c2X (Amp^R)

New England BioLabs GmbH, Frankfurt

pGEX-3X (Amp^R)

Pharmacia, Uppsala, Schweden

pGroESL (Cam^R)

Dr. T. Lamparter, Institut für Pflanzenphysiologie, FU Berlin

3.11 Antikörper, sekundäre Antikörper, Nachweisreagenzien

Bezeichnung	Spezifität	Spezies	Hersteller
Avidin-AP Konjugat (1:5000)	Biotin		Bio-Rad, München
Anti- <i>myc</i> (1:5000)	<i>myc</i> -Tag von Fusionsproteinen	IgG Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-MBP-Antiserum (1:10.000)	MBP-Tag von Fusionsproteinen	Kaninchen	New England BioLabs

Sekundäre Antikörper und Nachweisreagenzien:

Anti-Mouse IgG AP-Conjugate (1:7500)

Promega Corporation,
Madison, USA

Anti-Rabbit IgG AP-Conjugate (1:7500)

Promega Corporation
Madison, USA

FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000)

Jackson Immuno
Research Europe Ltd.
Soham, UK

MitoTracker[®] Red (Chloromethyl-X-Rosamin)Molecular Probes, Leiden,
NiederlandenCDP-Star[™]

Boehringer Mannheim

3.12 Membranen und Blottingpapier

Die Nitrocellulosemembran Optitran BA-S85 für den Proteintransfer und das Blot-Filterpapier wurden von der Schleicher & Schuell GmbH (Dassel) bezogen.

3.13 Affinitäts-Säulen und -Matrices

Reinigung von Plasmiden und PCR-Produkten

QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden

Reinigung von (Fusions-) Proteinen und Antikörpern

µMACS Streptavidin Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Glutathion Sepharose [™] 4 Fast Flow	GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Schweden
Amylose-Resin E8021L	New England BioLabs GmbH, Frankfurt
SulfoLink [®] Kit	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn

3.14 Patientenkollektiv

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 28 Patienten aus 23 Familien genotypisch und biochemisch charakterisiert.

Für die Beschreibung dieser Individuen wurde ein Code erstellt, der sich folgendermaßen zusammensetzt:

Familie (**1-23**), Variation im *MCCA*- oder *MCCB*-Gen, wobei beide Allele betroffen sind (**A** oder **B**), Familienmitglied durch Neugeborenen-Screening (NGS) identifiziert (**n**), Familienmitglied durch Familienscreening identifiziert: Geschwisterkind (**s**) oder Mutter (**m**), Patient durch Hochrisiko-Screening identifiziert (**hr**).

Beispiel: **10-B-n**

Dieser Patient gehört zur Familie mit der Nummer 10 (**10**), trägt Veränderungen in beiden *MCCB*-Gen Allelen (**B**) und wurde im NGS identifiziert (**n**).

Elf der untersuchten Individuen wurden durch das erweiterte NGS in Bayern identifiziert. Zu dieser Gruppe gehören 6 Neugeborene (**01-B-n, 02-A-n, 03-A-n1, 03-A-n2, 04-A-n, 05-A-n**), 2 ältere Geschwister (**01-B-s, 05-A-s**), die durch das Familien-Screening gefunden und 3 betroffene Mütter (**06-B-m, 07-B-m, 08-B-m**), die durch die erhöhten 3-HIVA-C-Werte ihrer gesunden Neugeborenen entdeckt wurden.

Zusätzlich wurden 17 Individuen aus anderen Teilen Deutschlands, Österreichs und Süd-Australiens untersucht:

8 Neugeborene (**09-A-n, 10-B-n, 12-A-n, 13-B-n, 17-A-n, 18-B-n, 21-A-n, 22-B-n**), 2 ältere Geschwisterkinder (**10-B-s1, 10-B-s2**), 6 Mütter (**11-A-m, 14-B-m, 15-A-m, 16-A-m, 19-A-m, 20-A-m**) und ein Kind, das durch das Hochrisiko-Screening aufgeklärt wurde (**23-A-hr**).

3.15 Spezielle Geräte

Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Touchdown Thermocycler	Hybaid Touchdown, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
PAGE-Apparatur	XCell SureLock™ Mini Cell, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
β-Szintillationszähler	Liquid Scintillation System LS1801, Beckmann, München
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Zeiss, Göttingen
Objektive	Plan NEOFLUAR 100x / 1,3 Oil; Zeiss LD ACHROPLAN 63x / 0,75 Korr P2; Zeiss LD A-Plan 40x / 0,50 Ph2; Zeiss
Kamera / Bilddarstellungssoftware	AxioCam MRm / Axiovision Software, Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskopie-Filter F31-005, D 548/10, 565 DCLP, D 630/60 F41-028, HQ 500/20, Q 515 LP, HQ 535/30	Zeiss, Göttingen
Ultraschallstab	Sonifier W-2500, Branson, Danbury, USA
Homogenisator	Polytron PT2100, Kinematica AG, Luzern, Schweiz
Elektroblotapparatur	X Cell II Blot Module, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FLUOstar Optima Platten-Multifunktionsreader	BMG Labtech, Offenburg
Spektrophotometer	Ultrospec 1000. Pharmacia Biotech, Cambridge, England
ÄKTAprime FPLC-Anlage	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Chromatographie-Säule XK 16/20	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Größenausschluss-Chromatographie-Säule HiLoad Superdex 75	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

4. Methoden

4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.1.1 Reinigung und Konzentration von Nukleinsäuren

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 1/10 Volumen NaAcetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt und für mindestens 30 min auf Eis gefällt. Nach anschließender Zentrifugation (12.000 g, 4°C, 20 min) wurde das Präzipitat zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen. Das Pellet wurde luftgetrocknet, bis sich der Alkohol verflüchtigt hatte und in H₂O bidest gelöst.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde UV-photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die verwendete Quarzküvette besitzt eine Schichtdicke von 1 cm, somit entspricht eine Extinktion von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA, 40 µg/µl RNA und 30 µg/µl Oligonukleotiden.

4.1.3 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von RNA aus humanen Lymphozyten

HBSS Hank's Balanced Salt Solution	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
NaCl physiologisch (0,9%)	B. Braun, Melsungen

Für die Isolierung von RNA wurden jeweils 20 ml Heparin-Blut verwendet, welches in vier 5 ml-Portionen aufgeteilt wurde. Diese 5 ml wurden mit je 3 ml NaCl gemischt. In vier frischen Zentrifugenröhrchen wurden jeweils 3 ml Biocoll vorgelegt und mit dem gemischten Heparin-Blut vorsichtig überschichtet. In der anschließenden Zentrifugation (20 min, 3000 rpm ohne Zentrifugenbremse, Hettich Rotanta/S T-302278) wurden die Blutzellen in Abhängigkeit ihres Dichtegradients getrennt. Der resultierende weißliche Lymphozyten-Ring wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in 6 ml Hank's-Lösung überführt. Die Lösung wurde für 10 min bei

1200 rpm (Rotor s.o.) abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 3 ml Hank´s-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 800 rpm, Rotor s.o.). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 350 µl Lyse-Puffer des RNAeasy Mini Kits (QIAGEN) aufgenommen. Die weitere Aufbereitung der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Isolierung von RNA aus humanen Fibroblasten

Die RNA-Isolierung aus Patienten-Fibroblasten erfolgte unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (50) der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers. Für einen Ansatz wurden $3-4 \times 10^5$ Zellen verwendet, die in einer T75 Zellkulturflasche kultiviert wurden.

Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut nach der Aussalzmethode

Puffer/Lösung	Bestandteile	Anmerkung
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM Na-EDTA	ad 5000 ml H ₂ O bidest; pH 7,4
Proteinase K-Puffer	1 M Tris-HCl, pH7,5; 0,5 M NaEDTA, pH 8,0; 0,5 M NaCl	ad 1000 ml H ₂ O bidest
20%ige SDS-Lösung	28,84 g SDS	ad 500 ml H ₂ O bidest

Erythrozyten-Lysepuffer, Proteinase K-Puffer und TE-Puffer wurden nur autoklaviert verwendet.

Mindestens 2 ml EDTA-Blut wurden mit 13 ml Erythrozyten-Lysepuffer versetzt und gemischt. Die Lösung wurde so lange bei RT inkubiert, bis die Erythrozyten lysiert waren, was durch eine so genannte Lackfarbe des Blutes angezeigt wird. Anschließend wird die Lösung für 10 min bei 1000-1500 rpm (Hettich Rotanta/S, T-302278) zentrifugiert und der resultierende Überstand abgekippt. Das Pellet wurde erneut in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 1000-1500 rpm (Rotor s.o.) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Leukozyten durch vorsichtiges Aufwirbeln resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml Proteinase K-Puffer, 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 50 µl 20%igem SDS versetzt und im Wasserbad bei

37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden dem Gemisch 300 µl 5M NaCl zugegeben. Die Lösung wurde für 20 min bei 6000 rpm (Rotor s.o.) zentrifugiert und der ÜS in frische 15 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 4 ml 100% Ethanol zugegeben und die Röhrchen geschwenkt (DNA fällt aus). Die Nukleinsäure wurde mit einer Pipettenspitze herausgefischt, in 350 µl 70% Ethanol überführt und durch Zentrifugation gewaschen. Der Alkohol wurde abgenommen und das Pellet im Trockenschrank getrocknet. Dieses wurde nach der Trocknung in TE-Puffer gelöst, wobei sich die Menge nach der DNA-Pelletgröße richtete. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Plasmidisolierung mit dem QIAGEN Plasmid Mini bzw. Midi Kit

Bis zu 5 ml einer *E. coli* Übernacht-Kultur wurden mit dem Mini Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Für die Midi Kit Präparation wurden bis zu 35 ml einer Übernacht-Kultur eingesetzt.

4.1.4 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

In die cDNA-Synthese wurden 1 µg Gesamt-RNA und 200 ng pd(N)₆ Primer eingesetzt. Die reverse Transkription wurde mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die cDNA-Synthese aus Patienten-RNA wurde strikt im so genannten Prä-PCR-Raum durchgeführt, um mögliche Kontaminationen mit veränderten *MCCA*- und *MCCB*-cDNA-Sequenzen aus dem Hauptlabor zu vermeiden.

Amplifikation der cDNA von *MCCA* und *MCCB*

Die Vervielfältigung der cDNA von *MCCA* und *MCCB* für die anschließenden Mutationsanalysen und für die Erstellung von Expressionskonstrukten wurde mit Hilfe des Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche GmbH durchgeführt. Dieses

PCR Kit enthält eine einheitliche Enzymmischung aus einer thermostabilen *Taq* DNA-Polymerase und einer thermostabilen *Tgo* DNA-Polymerase, die eine „proofreading“ Aktivität besitzt. Das System wurde speziell für längere DNA-Fragmente mit einer Größe von bis zu 5 kb optimiert. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Für die Patienten-Mutationsanalysen wurde cDNA amplifiziert, welche zuvor durch RT-PCR mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit generiert worden war (siehe 4.1.4.). Hier wurde jedes Reaktionsgemisch zusätzlich mit 2,5 µl DMSO versetzt. Die Reaktionen wurden mit den Primerpaaren durchgeführt, die unter 3.9 aufgeführt sind. Die *MCCA*-cDNA wurde in zwei PCR-Ansätzen amplifiziert, die zu überlappenden cDNA-Fragmenten führte (Primerpaare: *MCCA* 5'UTR/*MCCA* Exon 11 rev und *MCCA* Exon 11 for/*MCCA* 3'UTR). Diese Amplifikationen wurden ebenfalls strikt im so genannten Prä-PCR-Raum durchgeführt.

High Fidelity PCR-Programm für *MCCA* und *MCCB*:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	2 min	1x
2	94 °C	45 sec	
3	53 °C	45 sec	
4	68 °C	3 min	Schritt 2 bis 4 x 34
5	68 °C	10 min	1x
6	4 °C	hold	

Für die Erstellung von Expressionskonstrukten dienten vollständige *MCCA*- und *MCCB*-cDNA-Sequenzen als Matrize, die kloniert in den Vektoren pOTB7, respektive pGEM-T Easy vorlagen. Die jeweils verwendeten Primer sind unter 3.9 angegeben. Für die Amplifikation wurden die Programme EXP52S und EXPHIGHFI verwendet.

Programme EXP52S / EXPHIGHFI:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94 °C	2 min	1x
2	94 °C	45 sec	
3	52 °C	45 sec	
4	72 °C	1 min	Schritt 2 bis 4 29 x/34 x
5	72 °C	12 min/10 min	1x
6	4 °C	hold	

Die Amplifikate wurden in einem 1%igem Agarosegel überprüft. Als Molekulargewichtsstandard diente der 1 kb Marker der Firma Invitrogen.

Amplifikation genomischer DNA aus Patienten-Blut

Für die Vervielfältigung genomischer DNA wurde der HotStarTaq-MasterMix der Firma QIAGEN verwendet. Für jedes einzelne Exon des *MCCA*- bzw. *MCCB*-Gens wurde eine Polymerase-Kettenreaktion angesetzt (*MCCA*: 19 Exone, *MCCB*: 17 Exone). Die Oligonukleotide sind unter 3.9 aufgelistet. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt. In einen 50 µl-Ansatz wurde maximal 1 µg genomische DNA eingesetzt.

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

25 µl HotStarTaq-Reaktionsgemisch

22 µl H₂O

1 µl Primer forward (10 pmol/µl)

1 µl Primer reverse (10 pmol/µl)

1 µl DNA (0,4-1,0 µg/µl)

HotStarTaq-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	95 °C	15 min	1x
2	94 °C	45 sec	
3	55-64°C	45 sec	
4	72 °C	45 sec	Schritt 2 bis 4 x34
5	72 °C	10 min	1x
6	4 °C	hold	

Die Annealing-Temperatur richtete sich nach den jeweils verwendeten Primern und ist unter 3.9 angegeben. Die Amplifikate wurden in einem 3%igem Agarosegel überprüft. Als Molekulargewichtsstandard diente der Marker V (Roche Diagnostics, Mannheim).

4.1.5 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) nach Anleitung des Herstellers.

4.1.6 Subklonierung von PCR-Produkten

Die amplifizierte *MCCB*-cDNA (volle Länge) wurde in den Vektor pGEM-T Easy subkloniert. Dafür wurde die *MCCB*-cDNA mit den Primern *MCCB* 5'UTR und *MCCB* 3'UTR nach der cDNA-Synthese amplifiziert. Der Vektor verfügt über eine Insertionsstelle mit überhängenden Thymidinen, die eine einfache Insertion des cDNA-Fragments erlauben, welches bei der Amplifikation mit einer thermostabilen Polymerase mit überzähligen Adenosinen an den 5' und 3' Enden versehen wurde. Die Erstellung von Expressionskonstrukten wird unter 4.1.14 beschrieben.

4.1.7 Nachweis einer Insertion in rekombinante Plasmide mittels PCR

Bakterien wurden mit Hilfe eines so genannten Clone Screens auf die Aufnahme eines Plasmids mit dem korrekten Insert überprüft. Dafür wurde mit einer gelben Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von der Agarplatte gepickt und in 20 µl H₂O bidest gelöst. 5 µl dieser Suspension wurden in eine Standard-PCR eingesetzt. Bei dieser PCR wird die Anfangsdenaturierung bei 94°C auf 10 min verlängert, um die Lyse der Bakterienzellwand zu gewährleisten. Die Clone Screen Primer wurden je nach kloniertem Insert ausgewählt.

Clone Screen PCR-Standard-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1	94°C	10 min	1x
2	94°C	40 sec	
3	52°C	40 sec	
4	72°C	40 sec	Schritt 2 bis 4 x24
5	72°C	5 min	1x
6	4°C	hold	

4.1.8 DNA-Sequenzierung durch Cycle Sequencing

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden mittels Cycle Sequencing beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (Sanger et al., 1977). Bei dieser Methode werden vier mit Fluorescein-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Terminatoren) verwendet. Der Einbau der markierten Nukleotide erfolgt in einer Amplifikation mit nur einem Primer. Da jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist, wird nur ein Sequenzier-Ansatz benötigt.

Für die Sequenzierreaktionen wurde zunächst das Ready Reaction dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit, später dann das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet.

Für die Sequenzierung von Patienten-cDNA und von subklonierter cDNA wurden die Primer verwendet, die unter 3.9.3 und 3.9.4 aufgelistet sind. Genomische Patienten-DNA wurde mit den Oligonukleotiden sequenziert, die unter 3.9.5 und 3.9.6 aufgeführt sind.

Sequenzieransatz:

Gereinigtes PCR-Produkt	0,5-2 µl
Sequenzier-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Ready Reaction dRhodamin / BigDye v3.1 Sequencing Mix	2 µl
H ₂ O bidest	ad 5 µl

Cycle Sequencing-Programm dRhodamin / Big Dye v3.1

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96°C/95°C	15 sec/2 min	
Annealing	55°C/50°C	15 sec/30 sec	30x/29x
Elongation	60°C/60°C	4 min/4 min	

Die Proben wurden von der Firma Medigenomix, Martinsried präzipitiert, gereinigt und auf einem ABI 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Sequence Navigator™ der Firma Applied Biosystems, Weiterstadt.

4.1.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

SeaKem LE Agarose	Cambex BioScience, Rockland, ME, USA
Ethidiumbromid Dropper Bottle 0,625mg/ml	Olerup SSP AB, Stockholm, Schweden
Gel Loading Solution	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

Die Analyse von DNA-Fragmenten fand in horizontalen, nicht denaturierenden Agarosegelen statt, wobei die eingesetzte Agarosekonzentration (0,7% bis 3%) nach den aufzutrennenden Fragmentgrößen gewählt wurde. Die Agarose wurde in 100 ml 1x TBE-Puffer, welcher auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit 2 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung (0,625 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden mit Auftragspuffer gemischt. Als Längenstandard wurden 200 ng einer 1 kb DNA-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 bis 120 V, wobei sich die Dauer nach dem

erwünschten Trennungseffekt richtete. Die Gele wurden bei 312 nm UV-Durchlicht photographiert.

4.1.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu isolierende Fragment wurde auf einem UV-Tisch möglichst präzise ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers resuspendiert und gereinigt. Die Konzentration wurde durch Auftrag eines Aliquots auf ein Agarosegel und Vergleich mit dem Größenstandard bestimmt.

4.1.11 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen können einen DNA-Strang unter Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten (McClarin et al., 1986). Restriktionsansätze wurden in einem Volumen von 10-20 µl durchgeführt.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

DNA	0,2-1,0 µg
10fach Reaktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym	1 µl (10 Units/µl)
H ₂ O bidest	ad 50 µl

Die Ansätze wurden für 2-3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) gereinigt.

4.1.12 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden ist notwendig, um bei Klonierungen in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Diese Reaktion wird durch die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm katalysiert (New England BioLabs).

1 µl des Enzyms (10 Units/µl) wurden 20 min vor Ablauf der Inkubationszeit eines Restriktionsansatzes (siehe 4.1.11) hinzupipettiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch Erhitzen (70°C für 10 min) deaktiviert.

4.1.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Insertion von Genfragmenten in einen geschnittenen Vektor müssen die Enden der DNA-Doppelstränge wieder kovalent über Phosphodiesterbindungen verknüpft werden. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert diese endergonische Reaktion mittels ATP-Hydrolyse. Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

5fach Ligasepuffer (inkl. ATP)	4 µl
geschnittener Vektor (0,1-0,2 µg/µl)	2-3 µl
Fragment (0,25-0,4 µg/µl)	4-8 µl
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O bidest	ad 20 µl

Für die Ligation wurde ein fünffacher molarer Überschuss des Insertfragments gegenüber dem Vektor eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Kryostat über Nacht bei 16-17 °C.

4.1.14 Erstellung von Expressionsvektoren

Herstellung von cDNA-Vektoren für die Expression von MCC α und MCC β in eukaryontischen Zellen:

MCCA Δ Stop_pcDNA3.1Myc-His A: Im Labor stand bereits ein pOTB7-Konstrukt mit der kompletten cDNA von *MCCA* zur Verfügung. Mit dem Primerpaar *MCCAp*cDNA3.1*EcoRI* / *MCCAp*cDNA3.1*XbaI* Δ Stop wurde cDNA von diesem Template amplifiziert. Es entstand die *MCCA*-cDNA mit den Schnittstellen für *EcoRI* und *XbaI*. Durch den Primer *MCCAp*cDNA3.1 *XbaI* Δ Stop wurde das Stoppcodon der *MCCA*-cDNA mutiert, so dass das Stoppsignal des C-terminalen Myc-His-Tags zum Tragen kam. Die cDNA wurde in einen entsprechend geschnittenen pcDNA3.1Myc-His Vektor inkloniert. Erhaltene Klone wurden mittels Clone Screen (Primerpaar *MCCAp*cDNA3.1*EcoRI*; biotEx8r) und Restriktionsverdau überprüft. Die Richtigkeit der cDNA-Sequenz von *MCCA* und des Leserahmens wurden durch Sequenzierung bestätigt.

MCCB Δ Stop_pcDNA3.1Myc-His A: Aus eigener Vorarbeit lag die *MCCB*-cDNA kloniert in pGEM-T easy vor. Dieses Template wurde genutzt, um mit dem

Primerpaar *MCCBpcDNA3.1EcoRI* / *MCCBpcDNA3.1XbaIΔStop* die cDNA zu amplifizieren und mit den Schnittstellen für *EcoRI* und *XbaI* zu versehen. Analog zu *MCCA* wurde auch hier mit dem Primer *MCCBpcDNA3.1XbaIΔStop* das Stoppcodon der *MCCB*-cDNA mutiert, so dass das Stoppsignal des C-terminalen *Myc*-His tags zum Tragen kam. Die cDNA wurde ebenfalls in einen entsprechend geschnittenen *pcDNA3.1Myc*-His Vektor inkloniert. Erhaltene Klone wurden mittels Clone Screen (Primerpaar *MCCBpcDNA3.1EcoRI*; *MCCB* IIr) und Restriktionsverdau überprüft. Die Richtigkeit der cDNA-Sequenz von *MCCB* wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Herstellung von cDNA-Vektoren für die Expression von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ in prokaryontischen Zellen:

MCCAΔi/pMAL-c2 X: Als Template für die PCR-Amplifikation diente auch hier das Konstrukt *MCCA/pOTB7*. Durch das Primerpaar *MCCApMAL-c2XEcoRI*/*MCCApMAL-c2XHindIII* wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII* eingeführt. Zusätzlich wurde durch den Primer *MCCApMAL-c2XEcoRI* der Translationsstart von *MCCA* so versetzt, dass $MCC\alpha$ ab AS 42 hergestellt wurde, also ohne aminoterminalen Importsignal (Δi). Das Amplifikat wurde in einen entsprechend geschnittenen *pMAL-c2 X* Vektor kloniert. Erhaltene Klone wurden mittels Clone Screen (Primerpaar *malE*; *biotEx8r*) und Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* überprüft. Die Richtigkeit der cDNA-Sequenz von *MCCA* und die korrekte Nutzung des Leserahmens wurden durch Sequenzierung bestätigt.

MCCBΔi/pMAL-c2 X: Mit dem Primerpaar *MCCBpMAL-c2XEcoRI*/*MCCBpMAL-c2XHindIII* wurde vom Template *MCCB/pGEM-T Easy* amplifiziert und die Schnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* eingeführt. Analog zu *MCCA* wurde durch den Primer *MCCBpMAL-c2XEcoRI* der Translationsstart von *MCCB* so versetzt, dass $MCC\beta$ ab AS 23 hergestellt wurde, also ohne aminoterminalen Importsignal (Δi). Diese veränderte *MCCB*-cDNA wurde in den entsprechend verdauten Vektor *pMAL-c2 X* inkloniert. Erhaltene Klone wurden durch Clone Screen (Primerpaar *malE*; *MCCB* IIr) und Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* überprüft. Die Richtigkeit der cDNA-Sequenz von *MCCB* und die korrekte Nutzung des Leserahmens wurden durch Sequenzierung nachgeprüft.

Klonierung von *MCCA*- und *MCCB*-cDNA-Fragmenten in prokaryontische Expressionsvektoren für die Generierung von polyklonalen Antikörpern:

MCCA_AK/pGEX-3X: Als Template für die PCR-Amplifikation diente das Konstrukt *MCCA/pOTB7*. Mit dem Primerpaar *MCCA_AKpGEX-3XBamHI/MCCA-AKpGEX-3X EcoRI* wurde ein *MCCA*-cDNA-Fragment generiert, das die Basenpaare 1206-1929 umfasste und die Schnittstellen für *BamHI* und *EcoRI* enthielt. Das Amplifikat wurde in den Vektor *pGEX-3X* einkloniert, der zuvor entsprechend geschnitten worden war. Erhaltene Klone wurden durch Clone Screen (Primerpaar *pGEX-3Xr; MCCA 1200f*) und Restriktionsverdau mit *BamHI* und *EcoRI* überprüft. Die Richtigkeit des cDNA-Abschnitts von *MCCA* und die korrekte Nutzung des Leserahmens wurden durch Sequenzierung nachgeprüft.

MCCB_AK/pMAL-c2X: Mit dem Primerpaar *MCCB_AKpMAL-c2XEcoRI/MCCB_AKpMAL-c2XHindIII* wurde vom Template *MCCB/pGEM-T easy* amplifiziert und die Schnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* eingeführt. Es entstand ein *MCCB*-cDNA-Fragment, welches die Basenpaare 963-1629 umfasste. Dieses Fragment wurde in ein entsprechend verdautes *pMAL-c2X* Plasmid einkloniert. Erhaltene Klone wurden durch Clone Screen (Primerpaar *malE; MCCB IVr*) und Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* überprüft. Die Richtigkeit der cDNA-Sequenz von *MCCB* und die korrekte Nutzung des Leserahmens wurden durch Sequenzierung nachgeprüft.

4.2 Arbeiten mit Bakterien

4.2.1 Lagerung

Glycerol 85%

Apotheke Klinikum Großhadern

Bakterien in LB-Medien oder auf Agarplatten können für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Für die Langzeitlagerung wurden gleiche Volumina Bakterien-Übernachtskultur und Glycerol gemischt und bei – 80°C eingefroren (Glycerinstock).

4.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* (DH5 α) Zellen

Puffer, Lösung, Reagenz	Bestandteile	Anmerkungen
Puffer TFB1	100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl ₂ , 15%ige Glycerinlösung	pH 5,8; eisgekühlt einsetzen
Puffer TFB 2	10 mM MOPS, 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 15%ige Glycerinlösung	pH 6,8; eisgekühlt einsetzen
Psi- Broth	4 mM MgSO ₄ , 10 mM KCl in LB-Medium lösen	

100 ml auf 37°C vorgewärmtes Psi-Broth wurden mit 1 ml einer DH5 α -Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden solange bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis sie OD₆₀₀ = 0,5-0,6 erreicht hatten. Anschließend wurden die Zellen für 5 min auf Eis abgekühlt und ab diesem Zeitpunkt stets auf Eis weiterverarbeitet. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 4000 g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 90 min auf Eis. Die Zellen wurden erneut bei 4000 g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden jetzt in 4 ml TFB2 Puffer gelöst. In der Zwischenzeit wurden sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße in einem Ethanol/Trockeneisbad vorgekühlt. Je 100 μ l der Bakteriensuspension wurden nun in den Reaktionsgefäßen schockgefroren (1 min Stickstofftank) und anschließend bei -80°C gelagert.

4.2.3 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Subklonierung wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α eingesetzt. Um die Expression humaner MBP- und GST-Fusionsproteine zu verstärken, wurden neben *E. coli* DH5 α auch *E. coli* BL 21 CodonPlus-RIL Zellen verwendet, da diese zusätzliche Plasmide enthalten, welche tRNA-Moleküle für Codons überexprimieren, die in *E. coli* selten vorkommen.

Die kompetenten tiefgefrorenen *E. coli* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1-5 ng ungeschnittenem Plasmid oder 5-7 μ l des Ligationsgemisches versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 90 sec. Anschließend wurde der Ligationsansatz sofort für 2 min auf Eis gekühlt, mit 200-400 μ l LB-Medium vermischt und dann für 1 h bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. 150-350 μ l des Transformationsansatzes konnten schließlich auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert werden.

4.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

4.3.1 Herstellung einer humanen Hautfibroblastenkultur

Für das Anlegen einer neuen Fibroblastenkultur wurden vier kleine Zellkulturflaschen vorbereitet, indem diese kurz mit Nährmedium ausgespült wurden, um den Flaschenboden zu befeuchten. Die Hautbiopsie wurde in eine sterile Petrischale mit 15 ml Nährmedium gegeben, um die Hautzellen mit einer Pinzette vorsichtig vom Fettgewebe zu trennen. Die Biopsie wurde mit einem Skalpell in möglichst kleine Teile zerschnitten. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Gewebe nicht zerrissen wurde. Die Hautstückchen wurden anschließend mit einer 2ml-Pipette aufgenommen und auf die vier Zellkulturflaschen verteilt. Überschüssiges Medium wurde möglichst vorsichtig entfernt. Die Fibroblasten wurden 3-4 Tage im 37°C Brutschrank inkubiert. Nach dem Anwachsen der Fibroblasten (nach 3-4 Tagen) wurden vorsichtig 2 ml Medium zugegeben, ohne die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Nach 4-6 Wochen bildete sich in der Regel ein dichter Bewuchs der Flaschenböden mit adhärennten Zellen. Von allen Patientenzellen wurden zusätzlich Kulturen zur Langzeitaufbewahrung im Stickstofftank angelegt.

4.3.2 Allgemeine Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden in einer sterilen Arbeitsbank angelegt, wobei die eingesetzten Medien, Lösungen und Geräte steril waren. Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre im entsprechenden Medium inkubiert. Zur Passagierung der adhärennten Fibroblasten wurden diese zunächst mit 5 ml PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 1 ml Versen-Trypsin, später durch Inkubation mit 1,5 ml Accutase, für circa 5 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 9 ml Nährmedium gestoppt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen einer dicht bewachsenen 75 cm²-Kulturflasche abzentrifugiert (300 g, 5 min), in 7 ml Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Einfrieren von humanen Fibroblasten

<u>Einfrierlösung für eine Zelllinie:</u> 5 ml FCS 4 ml DMEM Low Glucose inklusive Antibiotikum 1,25 ml DMSO	1 h auf Eis abkühlen!
---	-----------------------

Pro Zell-Linie wurden 5 Kryoröhrchen vorbereitet und auf Eis vorgekühlt. Die adhärennten Fibroblasten wurden mit 5 ml PBS gespült und dann mit 1 ml Trypsin abgelöst. Dafür wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Kulturflaschen wurden mit 9 ml Nährmedium befüllt, um das Trypsin abzustoppen. Der Inhalt wurde in 8 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei RT und 300 g abzentrifugiert. Der ÜS wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in 0,5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Röhrchen wurden sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden der Zellsuspension tropfenweise 7 ml Einfrierlösung zugegeben, wobei die Röhrchen stets auf Eis verblieben. Das Gemisch wurde zügig auf die 5 Kryoröhrchen verteilt, welche im Anschluss in den „Mr. Frosty“ Freezing Container gestellt wurden. Der Container wurde sofort in den -80°C Gefrierschrank verbracht. „Mr. Frosty“ gewährleistet eine Abkühlleistung von -1°C/min. Am folgenden Tag konnten die Kryoröhrchen in den Flüssigstickstoffbehälter überführt werden.

Auftauen tiefgefrorener Fibroblasten

Die Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Fibroblasten wurden dem Stickstofftank entnommen und auf Eis gestellt. Dabei wurden die Röhrchendeckel leicht aufgeschraubt. Eine Styroporschachtel mit Vertiefungen für die Kryoröhrchen wurde mit lauwarmen Wasser gefüllt. Die Röhrchen wurden kurz in abwechselnde Vertiefungen eingetaucht, um ein möglichst rasches aber schonendes Auftauen zu gewährleisten. Die Zellsuspension wurde anschließend sofort in Zentrifugenröhrchen überführt, in welchen sich 8 ml vorgewärmtes (37°C) Nährmedium befanden. Die Überführung sollte stattfinden, solange sich noch Eisklumpchen in der Zellsuspension befinden. Die Zellen wurden für 5 min bei 300 g und RT abzentrifugiert und der ÜS verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml frischem Nährmedium aufgenommen und in kleine Zellkulturflaschen (T25) transferiert.

Überprüfen der kultivierten Fibroblasten auf Mycoplasmen

Aufgetaute und neu in Kultur genommene humane Fibroblasten wurden nach dem Anwachsen mit dem Mycoplasma Detection Kit nach Angaben des Herstellers auf das Vorhandensein von Mycoplasmen getestet.

Im Falle einer Infektion mit Mycoplasmen wurden die Zellen mit Mynox[®] Mycoplasmen-Eliminierungsreagenz nach Angaben des Herstellers (Minerva BioLabs GmbH, Berlin) behandelt.

4.3.3 Magnetofektion von eukaryontischen Zellen

PolyMAG BL 16/1	Chemicell GmbH, Berlin
-----------------	------------------------

Die Magnetofektion beruht auf dem Prinzip der elektrostatischen Bindung von DNA an super-paramagnetische Nanopartikel. Diese sind an einen nicht-viralen Transfektionsvektor PEI (Polyethylenimin) gekoppelt (transMAG-PEI). Nach Anlegen eines magnetischen Feldes wird die komplexierte DNA in den Zielzellen angereichert (Scherer et al., 2002). Bei der Transfektion hat sich eine DNA-Konzentration von 1-1,5 µg/ml als im Allgemeinen ausreichend effizient erwiesen, ohne gleichzeitig zu toxisch zu sein.

PolyMAG BL 16/1 ist eine gebrauchsfertige Mischung aus transMAG-PEI und freiem PEI und wird in einem Verhältnis von 1 µl/µg eingesetzter DNA verwendet.

Vorbereitend für die Magnetofektion wurden die Fibroblasten in so genannten 12-well Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zuvor wurde die Zellzahl der Fibroblasten mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Eine Zellzahl von 100.000 bis 120.000/well hat sich als optimal erwiesen.

Für die Transfektion wurden PolyMAG und die zu transfizierende DNA in jeweils gleichen Volumina Medium (ohne FCS, ohne AB) verdünnt. Der PolyMAG-Ansatz wurde mit dem DNA-Ansatz versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Transfektionsansatz überschichtet (500 µl/Vertiefung). Die Kulturplatte wurde nun auf dem Magneten platziert und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurde der Transfektionsansatz abgesaugt und die Zellen mit Nährmedium (inklusive FCS und AB) versorgt (1,5 ml/Vertiefung). Die Transfektion wurde nach maximal 24 h abgebrochen, indem die Zellen aufgeschlossen oder fixiert wurden.

Fibroblasten, welche später einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen werden sollten, wurden auf runden Deckgläschen, die sich in den Vertiefungen befanden ausgesät.

4.4 Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen

4.4.1. Herstellung von Zell-Lysaten für den 3-MCC-Enzymaktivitätsassay

Lyse-Puffer: 50 mM Tris 0,025 mM EDTA	ad 100 ml H ₂ O bidest, pH 8,0 mit HCl einstellen!
---	---

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden jeweils zwei 75 cm² Kulturflaschen verwendet, die möglichst dicht mit Fibroblasten bewachsen waren. Das Medium wurde abgesaugt und die Fibroblasten mit PBS gespült. Die adhärenen Zellen wurden mittels Zugabe von 1 ml Trypsin und einer Inkubationszeit von 5 min abgelöst und mit 4 ml PBS versetzt. Die Zellsuspensionen wurden in ein 10 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 3 min bei 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit Hilfe einer Pipette in 500 µl Lysepuffer resuspendiert (nicht vortexen!) und auf Eis abgekühlt.

Das Zell-Lysat wurde auf Eis zweimal für jeweils 10 sec sonifiziert (10% Amplitude). Dazwischen wurde eine Abkühlpause von 1 min auf Eis eingehalten. Die Ultraschallbehandlung sollte gewährleisten, dass das Enzym aus den Mitochondrien entlassen wird.

4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford

Das Prinzip dieser Methode (Bradford, 1976) beruht auf der Komplexbildung aus Coomassie Brilliant Blue G-250 und den hauptsächlich basischen und aromatischen Aminosäureresten von Proteinen. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des Protein Assay der Firma Bio-Rad, der nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Bei jeder Bestimmung wurde eine Eichgerade mit BSA als Standardprotein (0,125 mg/ml bis 2,0 mg/ml) erstellt. Aliquots der Proteinproben wurden 1:5 und 1:10 verdünnt (je ein Doppelansatz), mit 5 µl Protein Assay Reagent versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im FLUOstar Optima Multi-

Plattenreader bei 595 nm gemessen. Als Referenzwert diente das Reagenz ohne Probe.

4.4.3 Messung der spezifischen 3-MCC-Aktivität

Das Prinzip dieses 3-MCC-Assays beruht auf der Inkorporation von $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$ in das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA, um radioaktiv markiertes, nichtflüchtiges 3-Methylglutaconyl zu erhalten. Ein Überschuss an radioaktiv markiertem Bicarbonat wird durch Ansäuerung mit Ameisensäure ausgetrieben.

Puffer, Lösung, Reagenz	Bestandteile	Anmerkungen
Stocklösung 1	800 mM Tris, 48 mM MgCl_2 , 400 mM KCl, 4 mM EDTA	ad 100 ml H_2O bidest, pH 8,0 mit HCl einstellen
ATP-GSH-Stocklösung 2	26,2 mM ATP, 20 mM Glutathion, reduziert	ad 500 μl Stocklösung 1 Puffer vor Gebrauch frisch ansetzen
$\text{NaH}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$; 250 $\mu\text{Ci/ml}$		Gelöst in 5 ml H_2O bidest, eingestellt auf 50 $\mu\text{Ci/ml}$
19,2 mM 3-Methylcrotonyl-CoA (3-MCC-CoA)	25 mg 3-MCC-CoA	gelöst in 1270 μl H_2O bidest, pH 5,5 mit 1 M KOH einstellen, Aliquots bei -20°C aufbewahren!
Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A		Zinsser Analytik, Frankfurt am Main

Für den Enzym-Aktivitätstest wurden jeweils 2 Zelllysate hergestellt: Ein Lysat aus Patienten-Fibroblasten und ein Lysat aus Wildtyp-Fibroblasten zur Kontrolle (siehe 4.4.1).

Je 20 μl der Lysate wurden in jeweils sechs 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt (Doppelansätze für Proteinkonzentrationsbestimmung, Aktivitätsbestimmung der Probe und Aktivitätsbestimmung der Blanks bzw. Leerwerte):

Die Reaktionsgemische wurden wie folgt zusammengestellt:

Komponente	Ansatz Blank	Ansatz 3-MCC-CoA	
ATP-GSH-Stocklsg	25 μl	25 μl	
H_2O bidest	50 μl	25 μl	
3-MCC-CoA	---	25 μl	
$\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$	25 μl	25 μl	Zugabe von $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$ erst im Abzug!
Gesamtvolumen	100 μl	100 μl	

Nach der Zugabe von $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$ unter dem Abzug wurden jeweils 20 μl des Reaktionsgemisches zu den Sonifikaten gegeben und für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20 μl 15%iger Ameisensäure abgestoppt. Anschließend

wurden 30 µl der Reaktionsansätze auf gespannte Filterpapierstreifen pipettiert und für 15 min im Abzug inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Zugabe von 30 µl 15%iger Ameisensäure (auf die Filterpapierstreifen) und eine Inkubationszeit von 30 min. Bei diesem Schritt soll überschüssiges CO₂ durch die Ameisensäure aus den Proben ausgetrieben werden. Zum Abschluss wurden die Filterpapierstreifen in Plastikgefäße überführt, mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit und H₂O bidest überschichtet und kräftig geschüttelt. Als Kontrolle für den Reaktionsansatz an sich wurden 4 µl 3-MCC-CoA Ansatz verdünnt in 5 ml Szintillationsflüssigkeit und 5 ml H₂O bidest mitgeführt und gemessen. Die Messung erfolgte am Szintillationszähler Liquid Scintillation System LS1801.

Die spezifische 3-MCC-Enzymaktivität in den Proben wurde folgendermaßen ausgedrückt: Picomol des fixierten ¹⁴CO₂/mg Protein x min.

Die Angabe der spezifischen Aktivität in Patienten-Fibroblasten erfolgte in Prozentanteil zur jeweils mitgemessenen Wildtyp-Kontrolle. Für die Messung der 3-MCC-Enzymaktivität in MBP-MCCα- und MBP-MCCβ-Rohextrakten aus *E. coli* wurden statt der Fibroblasten-Lysate jeweils 0,5 mg Fusionsprotein (insgesamt 1,0 mg) eingesetzt. Für die Messung nach simultaner in vitro Translation von MBP-MCCα- und MBP-MCCβ wurden anstatt der 20 µl Fibroblasten-Homogenat 10-20 µl des Translations-Ansatzes eingesetzt.

4.4.4 Immunfluoreszenzfärbung

Lösung, Reagenz	Bestandteile	Anmerkungen, Herkunft
1,85%ige Formalinlösung	37%iges Formaldehyd w/v gelöst in PBS	
1% Triton X-100	gelöst in PBS	
MitoTracker® Red-Lösung	100 µl DMSO auf 50 µg MitoTracker® Red, davon 20 µl auf 10 ml DMEM-Nährmedium	
Vectashield		Vector Laboratories inc., Burlingame, CA, USA

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Funktionalität der eukaryontischen Expressionskonstrukte, die mittels Magnetofektion in humane HF1/D3-Fibroblasten eingebracht wurden, getestet. Durch die Gegenfärbung der Fibroblasten mit MitoTracker® Red wurde die Translokation der überexprimierten, mitochondrialen Proteine in das Zielorganell überprüft. MitoTracker® Red ist ein Farbstoff, der bei Akkumulation im Mitochondrium eine Bindung mit Thiolgruppen mitochondrialer

Membranproteine eingeht und bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 579 nm rot fluoresziert.

Die transfizierten Zellen, welche zuvor auf Deckgläschen in 12-well-Zellkulturplatten kultiviert worden waren (siehe 4.3.3), wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1,85% Formalin (1 ml/well) fixiert. Die Formalinlösung wurde wieder abgenommen und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten 5 min durch eine 1%ige Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Die Tritonlösung wurde entfernt und die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. Für die Inkubation der Fibroblasten mit dem primären AK wurde ein Streifen Parafilm auf dem Tisch befestigt, 50-80 µl AK-Lösung aufgetropft und die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten für 60 min aufgelegt. Nach der Einwirkzeit wurden die Deckgläschen wieder in die wells überführt und 10-12 mal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Nachweisreagenz MitoTracker[®] Red erfolgte analog zur Inkubation mit dem primären AK. Im Anschluss wurden die Deckgläschen erneut 10-12 mal mit PBS gespült, kurz abgetropft und mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Tropfen Vectashield, der zuvor auf einen Objektträger aufgebracht worden war, aufgelegt. Die an den Rändern austretende Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einem Papiertuch aufgesaugt und die Deckgläschen mit farblosem Nagellack an den Objektträgern fixiert. Die fertigen Präparate wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und beurteilt.

4.4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem invertierten Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 der Firma Zeiss durchgeführt. Das grundlegende Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist es, durch die unterschiedlichen Wellenlängen des Anregungs- und Emissionslichts eine Trennung des Lichts zu erreichen. Ein Anregungsfilter reduziert das von einer Quecksilberdampfampe erzeugte Licht auf eine geringe Spektrumbreite. Der dichromatische Strahlteiler (beamsplitter) ist ein spezieller Filter, welcher das vom Objekt zurückgestrahlte längerwellige Licht passieren lässt, die Anregungswellenlängen jedoch spiegelt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronenanordnungen hat jedes Fluorochrom ein charakteristisches Spektrum seiner Anregung und Emission. Durch den Emissionsfilter gelangen nur ausgewählte Emissionswellenlängen zum Auge oder zur CCD-Kamera.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzpräparate wurde durch die Bilddarstellungssoftware Axiovision der Firma Zeiss optimiert. Die verwendeten Filter und die CCD-Kamera sind im Materialteil unter Spezielle Geräte aufgeführt.

4.4.6 Isolierung von MCC α und MCC β aus humanem Nierengewebe

Puffer	Anmerkung
Sucrose-Puffer: 250 mM Sucrose 1 mM EDTA 1 Tablette Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail	ad 10 ml PBS

Homogenisierung des Nierengewebes

2,0 g tiefgefrorene humane Niere wurden für einen Ansatz (insgesamt 4 Ansätze) in 7 ml eiskaltem Sucrose-Puffer mit Hilfe eines Polytron Gewebehomogenisators so fein wie möglich zerkleinert. Zusätzlich wurde das Gewebe durch einen Potter-Elvehjem-Homogenisator, der zwanzigmal auf- und abgezogen wurde, weiter zerkleinert. Bei der Homogenisierung wurde auf eine konstante Temperatur von 4°C geachtet.

Differentielle Zentrifugation mit Sucrose-Puffer

Durch differentielle Zentrifugation mit Sucrose-Puffer sollte eine Anreicherung der Mitochondrienfraktion erreicht werden, um MCC α und MCC β möglichst effektiv und konzentriert isolieren zu können.

Dafür wurde das Homogenisat zunächst für 10 min bei 1000 g und 4°C in zwei 10 ml Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert. Der ÜS (ÜS1) wurde abgenommen und auf Eis gestellt, das Pellet wurde in 4 ml Sucrose-Puffer gelöst und erneut für 10 min bei 600 g und 4°C zentrifugiert. ÜS1 und der entstandene ÜS2 wurden vereinigt und auf mehrere 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt. Diese wurden für 20 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Die ÜS wurden in 2 Röhrchen vereinigt und enthielten den so genannten Gesamtzellextrakt. Die Pellets mit der Mitochondrienfraktion wurden in jeweils 150 μ l Lyse-Puffer (siehe unten) resuspendiert und ebenfalls vereinigt (2 Röhrchen mit gleichem Volumen).

Reinigung von MCC α und MCC β mit dem μ MACS Streptavidin Kit

Das μ MACS Streptavidin Kit wurde speziell für das magnetische Labeling biotinylierter DNA-Moleküle oder Proteine aus Zell-Lysaten entwickelt. Molekulare Streptavidin-Biotin-Komplexe werden in einer μ MACS Reinigungssäule, welches sich in einem starken magnetischen Feld befindet, zurückgehalten, während unspezifisch bindende Moleküle ausgewaschen werden können.

<u>Lyse-Puffer:</u> 150 mM NaCl 1% Triton X-100 50 mM Tris-HCl, pH 8,0	ad 50 ml H ₂ O bidest
<u>Waschpuffer 1:</u> PBS	
<u>Waschpuffer 2:</u> 20 mM Tris-HCl, pH 8,0	aus Streptavidin-Kit entnommen
<u>Elutionspuffer für pH-Verschiebung:</u> 0,1 M Triethylamin, pH 11,8 0,1% Triton X-100	ad 50 ml H ₂ O bidest
<u>Neutralisationspuffer</u> 1 M MES, pH 3,0	ad 50 ml H ₂ O bidest

Die Mitochondrienfraktionen und die Zellextrakte wurden mit jeweils 100 μ l superparamagnetic μ MACS Streptavidin MicroBeads versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die μ MACS Säulchen in die vorgesehenen Magnethalterungen eingesetzt und mit 100 μ l Equilibrierungspuffer gespült. Anschließend wurden die Säulchen, die für den Zellextrakt verwendet werden sollten, zweimal mit 100 μ l Sucrose-Puffer gespült. Analog dazu wurden die Säulchen für die Mitochondrienfraktionen zweimal mit 100 μ l Lyse-Puffer vorbereitet. Anschließend wurden beide Lösungen vorsichtig auf die jeweiligen Säulchen aufgetragen, um Luftblasen zu vermeiden. Nach dem Durchlauf wurden alle Säulchen 10-15mal mit 200 μ l PBS und zweimal mit 100 μ l Waschpuffer 2 gespült. Die native Elution der biotinylierten Proteine von den μ MACS Streptavidin MicroBeads erfolgte über einen pH-Verschiebung unter Anwendung eines Triethylamin-Puffers (pH 11,8). Zur Neutralisation wurde den Proben jeweils 3 μ l 1 M MES zugegeben. Anschließend wurden die Proteinlösungen unter Anwendung von Nitrocellulose-Dialysierplättchen (Millipore Bedford, USA), die vorsichtig auf eine H₂O-Oberfläche aufgelegt wurden, entsalzt.

4.4.7 2D-Gelelektrophorese von Proteinen

Die 2D-Gelelektrophorese zur Trennung von Proteinen der Mitochondrienfraktion und des Gesamtzellextraktes wurde von der Firma TopLab, Martinsried durchgeführt. Pro Gel wurden zwischen 230 µg und 500 µg Protein aufgetragen, welches zuvor aufkonzentriert, lyophilisiert und in Gelladepuffer resuspendiert worden war.

4.4.8 Peptidmassenfingerprint (PMF-MALDI-MS) zur Identifizierung von Proteinen

Der PMF zur Identifizierung von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β nach 2D-Gelelektrophorese und Verdau mit Trypsin wurde freundlicherweise von Dr. Harder der Firma TopLab, Martinsried, unter Anwendung eines Voyager DE-STR-MALDI-TOF Massenspektrometers (PerSeptive Biosystems) durchgeführt.

4.4.9 Aminoterninale Sequenzierung von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β

Die aminoterninale Sequenzierung der durch PMF identifizierten MCC α -, MCC β -, PCC α - und PCC β -Peptide wurde ebenfalls von der Firma TopLab durchgeführt. Für die Bestimmung der Aminoternini durch Edman-Abbau wurde ein ABI 490 Serien-Proteinsequenzier System (ABI Applied Biosystems) verwendet.

4.4.10 In vitro Import-Assay mit isolierten Hefemitochondrien

Der in vitro Import-Assay wurde freundlicherweise von Dr. Johannes Herrmann und Stephan Meier am Adolf Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU München durchgeführt.

MCC α und MCC β wurden im Retikulozyten-Lysat in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin synthetisiert und mit Hefe-Mitochondrien inkubiert. Als Matrize für die in vitro Translation dienten die Konstrukte *MCCA* Δ S/pcDNA3.1Myc-His und *MCCB* Δ S/pcDNA3.1Myc-His (Methoden 4.1.14). Die Importreaktionen wurden unter Zugabe von 2 mM NADH und 2 mM ATP durchgeführt, einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit von Valinomycin. Letzteres dient als Ionophor, welches den Aufbau eines mitochondrialen Membranpotentials verhindert. Die Mitochondrien

wurden in 3 Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot blieb unbehandelt (mock treated). Die beiden anderen Aliquots wurden mit 50 µg/ml Proteinase K behandelt, einmal mit und einmal ohne vorausgegangener hypotoner Schwellung der äußeren Membran durch Inkubation mit eiskaltem 20 mM Hepes-Puffer (pH 7,4). Alle drei Aliquots wurden durch Western Blot analysiert. Die Effizienz der Schwellung und der Proteinase K-Behandlung wurde durch den immunologischen Nachweis der Markerproteine Hsp70, Aco1 (Matrixproteine) und Cytochrom c Peroxidase (Intermembranraum) auf demselben Western Blot überprüft.

4.4.11 Generierung von Peptid-Antikörpern gegen MCC α und MCC β

Als Antigene für die Herstellung der Peptid-Antikörper wurden folgende AS-Sequenzen ausgewählt:

MCC α AS 178-190 VEGYHGEDQSDQC (13 Reste)
Bezeichnung der Firma INBIOS: **3031**

MCC α AS 698-710 FYREGAQANRHTPC (13 Reste + C)
Bezeichnung der Firma INBIOS: **3032**

MCC β AS 185-198 FPDRDHFGRTFYNNQC (14 Reste + C)
Bezeichnung der Firma INBIOS: **3033**

MCC β AS 484-497 TITKDQRAREGKQFC (14 Reste + C)
Bezeichnung der Firma INBIOS: **3034**

Mit der Synthese und der Immunisierung der Kaninchen wurde die Firma INBIOS, Martinsried beauftragt.

Die synthetisierten Peptide wurden an den Carrier Ovalbumin gekoppelt. Jeweils zwei Kaninchen (IN35A/B und IN36A/B) wurden mit einer äquimolaren Mischung (3-5 mg) der Peptide **3031/3032** und **3033/3034** immunisiert.

Nach 70 Tagen wurden die Präimmunsereen (jeweils 2 ml), Antiseren (jeweils 50 ml) und die synthetisierten Peptide (jeweils 5 mg, lyophilisiert) geliefert.

4.4.12 Reinigung der Peptid-Antikörper gegen MCC α und MCC β mit dem SulfoLink® Kit

SulfoLink® Coupling Gel	
SulfoLink® Sample Preparation Buffer	0,1 M Natriumphosphat, 5 mM EDTA-Na, pH 6,0
SulfoLink® Coupling Buffer	50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na, pH 8,5
SulfoLink® Wash Solution	1 M NaCl, 0,05% NaN ₃
L-Cystein-HCl, 100 mg	0,05 M L-Cystein in 2 ml Coupling Buffer
Glyzin-Elutionspuffer	100 mM Glyzin, pH 2,5-3,0
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 7,5

Für die Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern wurden die immunogenen Peptide mit einem zusätzlichen Cysteinrest am Carboxyterminus synthetisiert.

Das SulfoLink® Coupling Gel erlaubt die kovalente Bindung von Sulfhydrylhaltigen Peptiden und Proteinen an ein Agarosegelmateriale, um Affinitätsreinigungen durchzuführen. Dabei reagieren Iodoacetylgruppen des SulfoLink® Coupling Gels spezifisch mit freien Sulfhydrylgruppen (Cysteinreste) des zu bindenden Liganden.

Für die Bindung an das Agarosematerial wurden jeweils 5 mg der synthetisierten Peptide MCC α 3031, MCC α 3032, MCC β 3033 und MCC β 3034, welche lyophilisiert vorlagen, in 3 ml Coupling Buffer gelöst und jeweils einem Falcon-Röhrchen mit 2 ml Coupling Gel zugefügt. Die Kopplung wurde nach Angaben des Herstellers im batch-Verfahren durchgeführt.

Die Affinitätsreinigung der Peptid-AK aus den erhaltenen Kaninchen-Antisera wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Die Falcon-Röhrchen mit dem erfolgreich gekoppelten Coupling Gel-Peptid-Gemisch wurden wie folgt beladen:

Coupling Gel-Peptid-Gemisch	Kaninchen-Antiserum	Volumen
MCC α 3031	IN35A und IN35B (3031+3032)	jeweils 8,5 ml
MCC α 3032	IN35A und IN35B (3031+3032)	jeweils 8,5 ml
MCC β 3033	IN36A und IN36B (3033+3034)	jeweils 8,5 ml
MCC β 3034	IN36A und IN36B (3033+3034)	jeweils 8,5 ml

Nach einer kurzen Inkubation folgten mehrere Waschschrte mit PBS. Die Elution der Peptid-Antikörper erfolgte durch Zugabe von jeweils 8 ml Glyzin-Puffer.

Die gereinigten Peptid-AK wurden im Western Blot gegen rekombinante MCC α - und MCC β -Fusionsproteine getestet.

4.4.13 Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter (Fusions-) Proteine wurden 15-30 ml LB-Medium (inklusive 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion) als Vorkultur mit einer Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (220-250 rpm) inkubiert. Zum Animpfen der Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:100 in frischem LB-Medium in 2 l Schüttelkolben (bis zu 1 l Medium) verdünnt. Für die Expression von MBP-Fusionsproteinen wurde so genannter Rich broth verwendet (siehe 3.7). Die Kolben wurden so lange im Schüttelinkubator belassen, bis die Zellen eine optische Dichte von 0,5 bei 600 nm ($OD_{600}=0,5$) erreicht hatten. Die Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Bei der Expression von MCC α -Fusionsproteinen wurde das LB-Medium mit 5 µM Biotin versetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 4-6 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g für 30 min bei 4°C geerntet. Für die Präparation von *Inclusion Bodies* wurde das entstandene Bakterienpellet gewogen. Zuvor wurde das Leergewicht der Zentrifugenröhrchen bestimmt. Im Bedarfsfall wurden die Pellets bei - 24°C gelagert.

4.4.14 Aufschluss geernteter *E. coli*-Zellen

Die abzentrifugierten Bakterien wurden in anwendungsspezifischen Puffern resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Puffer, sowie Dauer und Anzahl der Ultraschall-Impulse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

<i>E. coli</i> Kultur	Puffer	Ultraschallbehandlung
MPB-MCC α	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 µM Biotin	40% Amplitude; 3 x 45 s
MBP-MCC β	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT	40% Amplitude; 3 x 45 s
MBP-MCC β (AS 321-543)	siehe oben	siehe oben

Den Puffern wurden bei Bedarf zwei Tabletten Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche GmbH, Mannheim beigelegt), um die Proteine vor Proteasen zu schützen.

4.4.15 Präparation und Solubilisierung von *Inclusion Bodies*

Puffer	Bemerkungen
<u>Lyse-Puffer:</u> 50 mM Tris-HCl; pH 8,0 1 mM EDTA 50 mM NaCl 1 mM PMSF	ad 49,5 ml H ₂ O bidest PMSF erst kurz vor Gebrauch zugeben Puffer sterilfiltrieren und entgasen
<u>Waschpuffer:</u> 1,2 g Urea (2 M) 9,5 ml Lyse-Puffer (ohne PMSF) 50 µl Triton X-100 (1% v/v)	ad 10 ml Lysepuffer Puffer sterilfiltrieren und entgasen
<u>Solubilisierungspuffer:</u> 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 8 M Urea 1 M DTT 1 Tabl. Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	ad 10 ml H ₂ O bidest Puffer sterilfiltrieren und entgasen
<u>Refoldingpuffer:</u> 50 mM Tris-HCl; pH 8,0 1 mM EDTA 100 mM NaCl 0,5 mM Glutathion, oxidiert 5 mM Glutathion, reduziert 200 mM L-Arginin 10% Glycerol (v/v)	ad 150 ml H ₂ O bidest Puffer sterilfiltrieren

Das Fusionsprotein GST-MCC α (AS 402-643) lag nach der Überexpression in *E. coli* in *Inclusion Bodies* vor und musste entsprechend präpariert werden.

Die Bakterien wurden wie unter 4.4.13 beschrieben geerntet und das entstandene Zellpellet gewogen. Pro g feuchtes Pellet wurden 3 ml Lysepuffer zur Resuspension zugegeben. Die Lösung wurde anschließend mit Lysozym versetzt (Endkonzentration 300 µg/ml) und für 30 min bei 4°C durchmischt. Nach der Zugabe von Triton X-100 (1%v/v) wurde die Suspension 3x45 sec bei einer Amplitude von 25% sonifiziert und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden DNase 1 (Endkonzentration 10 µg/ml) und MgCl₂ (Endkonzentration 10 mM) zugegeben. Die Lösung wurde 15 min bei RT gerührt, um die viskösen Nukleinsäuren abzubauen, und nachfolgend für 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der ÜS wurde verworfen, das Pellet in Waschpuffer (das Volumen des Waschpuffers soll dem Volumen des abgenommenen ÜS entsprechen) gelöst und für 10 min bei RT gemischt. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Im Anschluss wurde das Pellet für 4-5 h in 10 ml Solubilisierungspuffer gelöst und gemischt. Die Lösung wurde für 10 min bei 100.000 g und 4°C abzentrifugiert. Der ÜS wurde tropfenweise dem Refoldingpuffer zugegeben, während dieser langsam gerührt wurde. Die Suspension wurde für 2 h weiter langsam bei 4°C gemischt. Abschließend wurde die Proteinlösung bei 4°C im Dialyseschlauch gegen 2 l PBS dialysiert. Der PBS-Puffer wurde nach 2 h erneuert. Es folgte eine weitere Dialyse bei 4°C über Nacht.

4.4.16 In vitro Translation von MBP-MCC α und MBP-MCC β

Für die in vitro Translation der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β in *E. coli* wurde das S30 Extract System für zirkuläre DNA der Firma Promega verwendet. Als Matrizen dienten Midi-Präparationen der *MCCA*- und *MCCB*-pMAL-c2X-Konstrukte (4.1.14) und des Plasmids pGroESL. In diesem Plasmid lagen die Chaperonine groES und groEL co-kloniert vor (Material 3.10). Die Durchführung erfolgte unter Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin nach Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurden 5 μ M Biotin zugegeben, um die Biotinylierung zu gewährleisten. Die synthetisierten Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE (4.4.17) getrennt. Das Gel wurde im Gelrockner getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht, indem das Proteingel mit einem Röntgenfilm (WICORex[®]B+, Typon Medical Systems AG, Burgdorf, Schweiz) in einer Röntgenkassette (Hypercassette[™], Amersham, Little Chalfont, England) inkubiert wurde. Der Film wurde anschließend entwickelt und fixiert.

4.4.17 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das SDS-PAGE System der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

NuPAGE [®] BisTris Gel 4-12%	
NuPAGE [®] 4x LDS Sample Buffer	
NuPAGE [®] 10x Reducing Agent	
NuPAGE [®] 20x MOPS SDS Running Buffer	Laufpuffer 1: 50 ml NuPAGE [®] 20x MOPS SDS Running Buffer ad 1000 ml H ₂ O bidest Laufpuffer 2: 200 ml Laufpuffer 1 plus 500 μ l Antioxidant Reagent
NuPAGE [®] Antioxidant Reagent	
Coomassie Brilliant Blue	BIO-RAD, München

Probenansatz für SDS-PAGE 12-well Gel mit 20 μ l Geltaschen-Volumen:

13 μ l Probe (bis zu 10 μ g Gesamtproteinmenge)
 5 μ l 4x LDS Sample Buffer
 2 μ l 10x Reducing Agent
 20 μ l

Nach der Zugabe des Reducing Agents wurden die Proben für max. 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die äußere Gelkammer wurde mit Laufpuffer 1, die innere Kammer mit Laufpuffer 2 (200 ml) befüllt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard wurde der Marker SeeBlue oder PAGE Ruler™ verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200 V konstant und 60 –120 mA pro Gel für 55-90 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die getrennten Proteine entweder im Gel nach Angaben des Herstellers (BIO-RAD, München) mit Coomassie Brilliant Blue für 30 min gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

4.4.18 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Für die Western Blot Analysen wurde ebenfalls das NuPAGE® System der Firma Invitrogen verwendet.

NuPAGE® 20x Transfer Buffer	50 ml Transfer Buffer, 200 ml Methanol ad 1000 ml H ₂ O bidest, 1 ml Antioxidant Reagent
TBS (20 mM Tris, 140 mM NaCl)	ad 1000 ml H ₂ O bidest, pH 7,5
TBS-T	5 ml Tween 20 ad 1000 ml TBS
Blockpuffer/Inkubationspuffer 1	5 g Milchpulver ad 100 ml TBS (5%)
Inkubationspuffer 2	10 g Milchpulver ad 100 ml TBS (10%)
AP-Detektionspuffer	0,1 M TrisHCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5
CDP-Star ^{IM} 25 mM (1:100 verdünnt)	50 µl ad 5 ml AP-Detektionspuffer

Nach der Auftrennung der Proteine in der PAGE wurden diese elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Der Proteintransfer wurde für 55 min bei konstanten 30 V und 90-125 mA pro Gel in einem X Cell II Blot Modul durchgeführt.

Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die beladene Membran kurz mit TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese für mindestens 1 h oder auch über Nacht bei 4°C mit Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3 mal 5 min mit TBS gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in wenigen ml Inkubationspuffer 1, benetzt. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in wenigen ml Inkubationspuffer 2 verdünnt worden war. Nach erneuten Waschschritten mit TBS-T

wurde die Membran für 5 min in den AP-Detektionspuffer gegeben, um die Membran in ein alkalisches Milieu zu überführen. Der alkalische pH-Wert ist für die Substrat-Umsetzung durch die AP notwendig. Die chemilumineszente Verbindung CDP-*Star*TM wird durch die Anwesenheit von AP dephosphoryliert und zerfällt. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 466 nm emittiert. Diese Reaktion wurde ausgenutzt, um Röntgenfilme (WICORex[®]B+, Typon Medical Systems AG, Burgdorf, Schweiz), die mit der Membran in einer Röntgenkassette (HypercassetteTM, Amersham, Little Chalfont, England) inkubiert wurden, zu belichten. Die Filme wurden anschließend entwickelt und fixiert.

Die verwendeten AK und Nachweisreagenzien sind unter 3.11 aufgeführt.

Für die hergestellten Peptid-Antikörper (4.4.11) gegen MCC α und MCC β erwies sich eine Verdünnung von 1:200 in 0,1% Milchpulverlösung als optimal.

4.4.19 Ankonzentrieren und Entsalzen von Proteinlösungen

Zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration wurden, abhängig vom Ausgangsvolumen, die im Folgenden aufgelisteten Konzentratoren der Firma Millipore oder Vivascience verwendet. Die Wahl der Membran war abhängig von der gewünschten Ausschlussgrenze. Die Zentrifugationsbedingungen wurden nach Empfehlungen der Hersteller gewählt.

Konzentrator	Max. Probenvol.	Ausschlussgrenze	Hersteller
Amicon Centriplus RC/YM	15 ml	10.000 MWCO	Millipore Corporation, Bedford, USA
VIVASPIN	20 ml	30.000 MWCO	Vivascience AG, Hannover

Die Entsalzung von Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse gegen PBS in Dialysehschläuchen über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren. Je nach Probenvolumen und Ausschlussgrenze wurde die Dialysemembran ZelluTrans 6,0 (MWCO 8000-10.000, Durchmesser 15,9 mm; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) oder SpectraPor[®] (MWCO 15.000, Durchmesser 29 mm; Spectrum Laboratories, Inc. Rancho Dominguez, USA) verwendet.

4.4.20 Präparative Proteinreinigung mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Die säulenchromatographische Proteinreinigung wurde mit dem ÄKTAprime FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia durchgeführt. Mit dem System wurden verschiedene flüssigkeitschromatographische Methoden zur Reinigung der gewünschten Proteine durchgeführt.

Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe der Software UNICORNprime (Amersham Pharmacia) ausgewertet und bearbeitet. Vor dem Injizieren wurden die Proben stets mittels eines Spritzenfilters der Porengröße 0,45 µm filtriert.

Affinitätschromatographie von MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen mittels Amylose-Harz

Für die Reinigung der MBP-Fusionsproteine aus *E. coli*-Lysaten wurde eine XK 16/20 Säule der Firma Amersham Pharmacia verwendet, die mit 15 ml Amylose-Harz gestopft war. MBP bindet spezifisch an Amylose und ermöglicht so die Reinigung der Fusionsproteine. Vor dem Auftrag der Rohextrakte wurde die Säule mit 10 ml Säulenpuffer äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule erneut mit 60 ml Säulenpuffer gespült, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Im Anschluss wurden 30 ml Elutionspuffer auf die Säule gepumpt, um die MBP-Fusionsproteine aus der Amylose-Bindung zu verdrängen. Die eluierten Fusionsproteine wurden in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Chromatographiebedingungen sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

Probe	MBP-MCC α / MBP-MCC β / MBP-MCC β (AS 321-543)
Säule	Amersham XK 16/20 + 15 ml Amyloseharz
Säulenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT
Elutionspuffer	Säulenpuffer plus 20 mM Maltose
Probenvolumen	20 ml
Fraktionsgröße	1,5 ml
Flussrate	0,4 ml/min
Temperatur	4°C

Die Elutionsfraktionen wurden mittels Bradford-Assay hinsichtlich ihres Proteingehalts überprüft und durch SDS-PAGE analysiert.

Größenausschlusschromatographie von MBP-MCC β (AS 321-543)

Die Elutionsfraktionen des MBP-MCC β (AS 321-543) Fusionsproteins wurden nach der Affinitätschromatographie gepoolt und mit Hilfe der VIVASPIN Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert. Das Endvolumen betrug 2 ml. Diese wurden zur weiteren Aufreinigung durch Gelfiltration auf eine Amersham Pharmacia HiLoad Superdex 75 Säule (geeignet für die Trennung von Proteinen der Größen 3 kDa bis 70 kDa) gepumpt. Die Säule wurde zuvor mit drei Säulenvolumina PBS (sterilfiltriert und entgast) gespült. Die Chromatographie erfolgte bei 4°C, einer Flussrate von 0,8 ml/min und einem Drucklimit von 30 kPa durchgeführt. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, die durch SDS-Page analysiert wurden. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford bestimmt.

4.4.21 Proteolytische Spaltung der MBP-Fusionsproteine mittels Faktor Xa

Faktor Xa Kit (400 U)	Novagen, Darmstadt
<u>Schneidepuffer:</u> 20 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 6 M Urea	

Aliquots der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β wurden nach der Affinitätsreinigung einer proteolytischen Spaltung mit Faktor Xa unterzogen.

Die Spaltung wurde zunächst mit aufsteigenden Konzentrationen an Faktor Xa getestet, das heisst die MBP-Fusionsproteine wurden bei RT im Elutionspuffer (siehe 4.4.20) mit 1%, 2,5%, 5% und 7% (des Ansatzes) Faktor Xa versetzt. Die Inkubationszeiten lagen zwischen 4 h und 36 h. Die anschließende SDS-Page der Aliquots zeigte, dass keine vollständige Abtrennung der Tags stattfand. Im nächsten Schritt wurden den Proteinlösungen unterschiedliche Detergenzien zugesetzt: SDS in den Konzentrationen 0,05% (w/v) und 0,005% (w/v) des Reaktionsansatzes, 1% Triton X-100 (v/v) und 3% N-Laurylsucrosyl-Lösung (v/v). Die Inkubationszeiten lagen hier bei 8 h bis 24 h und bei Temperaturen von 20°C oder 37°C. Die anschließende Analyse durch SDS-PAGE zeigte, dass lediglich der MBP-Tag die Prozedur ohne Degradation überstand. Auch das Umpuffern der Proteinlösungen in einen speziellen Schneidepuffer und ein Schneideversuch im batch-Verfahren an Amylose-Beads blieben erfolglos.

5. Ergebnisse

Mit den Untersuchungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, sollten grundlegende Erkenntnisse zum humanen Enzym 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase gewonnen werden. Die mitochondriale Lokalisation des Enzyms, welches aus den Untereinheiten $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ besteht, war zu diesem Zeitpunkt bekannt. Allerdings gab es zur Position und zur Struktur möglicher mitochondrialer Signalpeptide nur Vermutungen. Auch der Mechanismus des mitochondrialen Imports und die genaue subkompartimentäre Lokalisation der Untereinheiten waren bisher nicht experimentell bestätigt worden. Durch die Expression der Untereinheiten in eukaryontischen Systemen sollte diesen Fragestellungen nachgegangen werden. Die Analysen sollten die Grundlage für detaillierte Expressionsstudien des Enzyms in *E. coli* bilden.

5.1 Klonierung der *MCCB*-cDNA in pGEM-T Easy

Grundvoraussetzung für die rekombinante Expression war die Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenzen von *MCCA* und *MCCB*.

Während der komplette codierende Bereich von *MCCA* bei Beginn dieser Arbeit bereits kloniert in den Vektor pOTB7 vorlag, gab es von *MCCB* noch keinen einzelnen Klon, der die komplette cDNA enthielt. Für die Proteinexpression musste die vollständige cDNA von *MCCB* (1692 bp) zunächst in einen Vektor kloniert werden. Zu diesem Zweck wurde RNA aus humanen Wildtyp-Hautfibroblasten gewonnen und durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben (first strand cDNA synthesis). Die so gewonnene cDNA wurde durch Primer amplifiziert, die in der 3'-UTR und 5'-UTR des *MCCB*-Gens binden. Es folgte die Klonierung in den Vektor pGEM-T Easy (siehe Methoden 4.1.6). Die Richtigkeit und Vollständigkeit der klonierten *MCCB*-cDNA konnte durch DNA-Sequenzierung und *MCCB*-cDNA Datenbank-Abgleich bestätigt werden.

5.2 Alignments mit MCC α - und MCC β -Primärstrukturen anderer Spezies weisen auf aminoterminalen Signalpeptide hin

Die Tatsache, dass 3-MCC zu den mitochondrialen Enzymen gehört, ließ den Schluss zu, dass die Untereinheiten des Enzyms Signalpeptide besitzen, welche diese nach ihrer Synthese im Cytosol der Zelle zu ihrem Bestimmungsort dirigieren. Die Position und die Sequenzen mitochondrialer Signalpeptide der 3-MCC-Untereinheiten waren bis zu diesem Zeitpunkt nicht experimentell untersucht worden. Das klassische mitochondriale Targetingsignal ist eine aminoterminal spaltbare Präsequenz, die reich an hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren ist (Pfanner und Geissler, 2001).

Der Vergleich von aminoterminalen Abschnitten der humanen MCC α - und MCC β -Untereinheiten mit den orthologen Proteinen anderer Spezies sollte Informationen über eine mögliche aminoterminal Lokalisation der Targetingsequenzen und deren Grad der Konservierung bringen (Abb. 10A und 10B).

A

		10	20	30	40	50	60	70	80
<i>H. sapiens</i>	MCC α	MAAASVSVLLVFAERNRWRRLPSLLLPRTWVWFCRTMKYTTATGRNITKVLIANRGETACRVMRTAKKLGVQTVAVYSEADR							
<i>M. musculus</i>	MCC α	---MFAAALLPAVDRNQIRRVFELLLCPREWFVKIIRTMKYGTTEGSSITKVLIANRGETACRVIRTAKKMGVOSVAVYSEADR							
<i>A. thalianae</i>	MCC α	---MSMFTVVALRRNVREKNSLWRYISGSASMKPKEQ---							
<i>A. tumefaciens</i>	MCC α	-----MLDKIVIANRGETALRLTRACKELGISTVAVHSSADR							

Abbildung 10A: Aminoterminalen Abschnitte der α -Untereinheiten orthologer Proteine der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana* und *Agrobacterium tumefaciens*. Identische AS sind schwarz, ähnliche AS grau hinterlegt. Erst ab AS 49 zeigen die Proteine hohe Homologie, während die AS 1-48 weniger konserviert sind. *A. tumefaciens* fehlt ein vergleichbares aminoterminalen Segment.

B

		10	20	30	40	50	60
<i>H. sapiens</i>	MCC β	-----MVAWLRLALRPCRASERGFRAVH---					
<i>M. musculus</i>	MCC β	-----MWCALRSALRPCRRAAVFPCRAYH---					
<i>A. thalianae</i>	MCC β	MLRILGRRVVSASKEITSTQQWRHREGTDSREFFERFRGLQGFVGLPDGVDNRNSPFASSNSIAMEGLSELRSHPKVL					
<i>A. tumefaciens</i>	MCC β	-----MKLTSSLNRLP-----AETANAAMSGLVEILLRGEVKEIKS					

Abbildung 10B: Aminoterminalen Abschnitte der β -Untereinheiten orthologer Proteine der Spezies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana* und *Agrobacterium tumefaciens*. Identische AS sind schwarz, ähnliche AS grau hinterlegt. Die aminoterminalen Abschnitte von *H. sapiens* und *M. musculus* zeigen noch ausgeprägte Homologie, während dieser Bereich bei *A. thaliana* deutlich weniger homolog ist und bei *A. tumefaciens* fehlt.

Für die Sequenzvergleiche wurden neben MCC α und MCC β von *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Arabidopsis thaliana* auch die entsprechenden Sequenzen von

Agrobacterium tumefaciens ausgewählt. In Abbildung 10A ist zu sehen, dass die aminoterminalen MCC α -Abschnitte von *H. sapiens* und *M. musculus* sehr hohe Homologie zeigen, während der Vergleich mit *A. thaliana*, einem Organismus der phylogenetisch weiter entfernt ist, erkennen lässt, dass der Grad der Konservierung deutlich geringer ist. Bei *A. tumefaciens* ist kein aminoterminaler Abschnitt auszumachen, der Homologie zu MCC α von *H. sapiens* zeigt. Dies ist durch die fehlende Subkompartimentierung der Prokaryonten zu erklären, die auf das Sortieren von Proteinen durch Signalpeptide verzichten können. Zusätzlich deutet das Fehlen dieses Abschnitts darauf hin, dass dieser Bereich für die Funktionalität des Enzyms nicht von Bedeutung ist. Der Bereich hoher Homologie in den AS-Sequenzen aller Spezies beginnt ab AS 49. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse nachdrücklich auf ein aminoterminales Signalpeptid innerhalb der ersten 48 AS der humanen MCC α -Untereinheit hin.

Die Homologiestudien der MCC β -Untereinheiten ergeben ein ähnliches Bild, wobei hier nicht eindeutig ein Anfangspunkt hoher Homologie festgelegt werden konnte. Dieser Befund passt zu der Tatsache, dass die Carboxyltransferase-Domäne der β -Untereinheiten generell weniger stark konserviert ist (Jitrapakdee und Wallace, 2003). Doch auch hier zeigten die aminoterminalen Abschnitte von *H. sapiens* und *M. musculus*, im Vergleich zu *A. thaliana*, noch relativ ausgeprägte Homologie, während dieser Bereich bei *A. tumefaciens* nicht zu entdecken war. Auch hier ergibt sich ein Hinweis auf ein aminoterminales Signalpeptid der MCC β -Untereinheit. Dieses könnte innerhalb der AS 1-25 lokalisiert sein.

5.3 Erstellung von cDNA-Vektoren für die Expression von MCC α und MCC β in eukaryontischen Systemen

Für weitere Charakterisierungen der beiden Enzym-Untereinheiten sollten diese zunächst im kleinen Maßstab in eukaryontischen Systemen exprimiert werden. Die Wahl fiel auf den Expressionsvektor pcDNA3.1/Myc-His, mit dessen Hilfe Fusionsproteine mit carboxyterminalem Myc-His-Tag generiert werden können. Dieser Vektor besitzt außerdem einen T7-Promotor, der für die geplante in vitro Translation im Retikulozytenlysat genutzt werden sollte.

Für die Subklonierung wurden die MCC α - und MCC β -cDNA-Sequenzen mit den selbst entworfenen Primerpaaren (siehe Material und Methoden unter 3.9.2 / 4.1.14)

*MCCA*pcDNA3.1*EcoRI*/*MCCA*pcDNA3.1*XbaI*ΔStop und *MCCB*pcDNA3.1*EcoRI*/*MCCB*pcDNA3.1*XbaI*ΔStop amplifiziert. Als Matrize dienten die Volle-Länge-cDNA-Konstrukte *MCCA*_pOTB7 und *MCCB*_pGEM-T Easy. Durch die Primer *MCCA*pcDNA3.1*XbaI*ΔStop und *MCCB*pcDNA3.1*XbaI*ΔStop wurden die Stopcodons von *MCCA* und *MCCB* mutiert, so dass die Terminationssignale der *Myc*-His-Tags zum Tragen kamen.

5.3.1 *MCC*α- und *MCC*β-*Myc*-His-Fusionsproteine werden in die Mitochondrien humaner Fibroblasten importiert

Die entstandenen *MCCA*ΔStop_pcDNA3.1-*Myc*-His- und *MCCB*ΔStop_pcDNA3.1-*Myc*-His-Konstrukte sollten in Immunfluoreszenzversuchen hinsichtlich ihrer Funktionalität überprüft werden. Die Expressionsvektoren wurden durch Magnetofektion in humane SV40-transformierte Hautfibroblasten eingeschleust. Bei dieser Methode bindet DNA an magnetische Nanopartikel, die an einen nicht-viralen Transfektionsvektor gekoppelt sind. Nach Anlegen eines magnetischen Feldes wird die komplexierte DNA in den Zielzellen angereichert (4.3.4).

Die so überexprimierten Fusionsproteine konnten durch die Kombination der Antikörper anti-*Myc*-Maus-IgG und anti-Maus-FITC dargestellt werden. Die Kolokalisation der *Myc*-His-Fusionsproteine mit den Mitochondrien wurde durch Gegenfärbung der Organellen mit MitoTracker[®]Red verifiziert (Abb. 11).

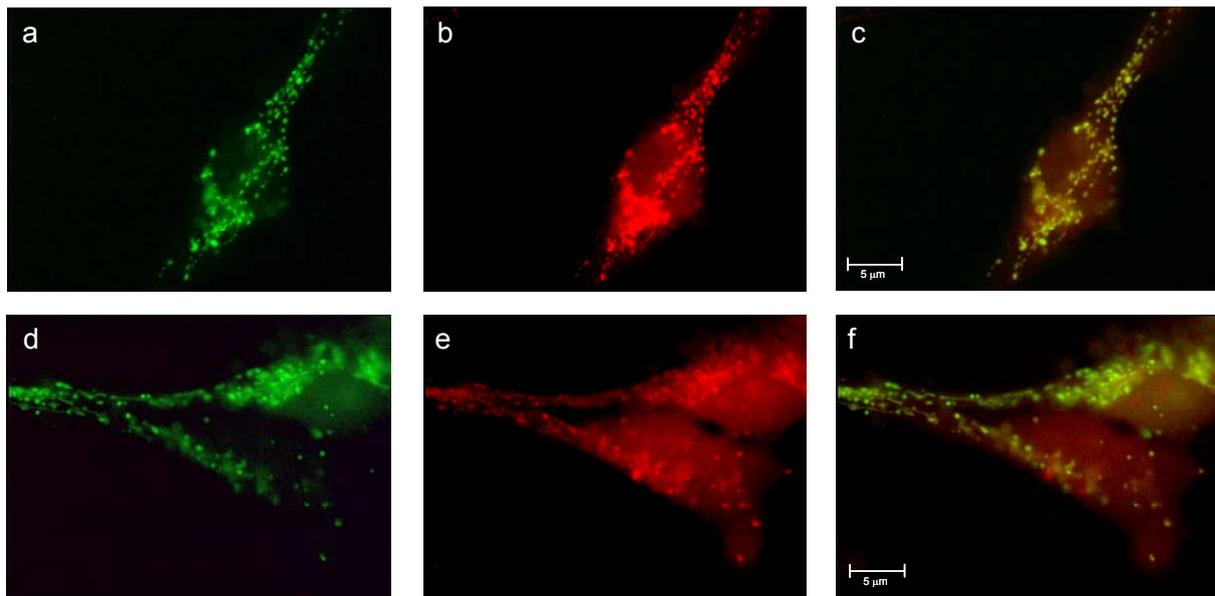


Abb. 11a-f: Kolokalisationsstudien zu MCC α - und MCC β -Myc-His-Fusionsproteinen in humanen HF1/D3 Fibroblasten. (a) Nachweis von MCC α -Myc-His durch anti-Myc-Maus-IgG und anti-Maus-FITC-Konjugat. (b) Darstellung der Mitochondrien derselben Zelle durch Anfärbung mit Mito-Tracker[®]Red. (c) Die Übereinanderlagerung der Bilder (a) und (b) zeigt die Kolokalisation von MCC α -MycHis-Fusionsproteinen und den Mitochondrien. Die Bilder (d), (e) und (f) zeigen die äquivalenten Fluoreszenzbilder für das Fusionsprotein MCC β -Myc-His.

Die Immunfluoreszenz-Versuche zeigten eindeutig, dass die MCC α - und MCC β -Myc-His-Fusionsproteine in den humanen Fibroblasten überexprimiert und in die Mitochondrien eingebracht wurden. Aus dem korrekten Targeting konnte geschlossen werden, dass die Untereinheiten intakte Signalpeptide enthalten, die von der mitochondrialen Importmaschinerie erkannt wurden und für die Translokation in die Organellen sorgten. Die Funktionalität der beiden Konstrukte konnte somit bestätigt werden.

5.4 MCC α und MCC β werden in die Matrix von Hefemitochondrien importiert

Lau et al. vermuteten 1979 (Lau, 1979), dass das bovine 3-MCC-Holoenzym mit der inneren Mitochondrienmembran verknüpft sei. Über das humane Enzym wusste man bisher diesbezüglich nur, dass es mitochondrial lokalisiert ist. Um nun die genaue mitochondriale Sublokalisierung der humanen 3-MCC bestimmen zu können, wurde von Dr. Johannes Herrmann und Stephan Meier am Adolf Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU ein in vitro Import-Assay durchgeführt. Zusätzlich sollte dieses Experiment weitere Erkenntnisse über das Vorhandensein von

Signalpeptiden und deren Prozessierung bringen. Die beiden Untereinheiten MCC α und MCC β wurden im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von [35 S]-Methionin synthetisiert. Grundlage für diese in vitro Translationen waren die Konstrukte *MCCA* Δ Stop_pcDNA3.1Myc-His und *MCCB* Δ Stop_pcDNA3.1Myc-His mit vorhandenem T7 Promotor (siehe Methoden 4.1.14). Die gebildete MCC α -Untereinheit zeigte im Proteingel eine molekulare Masse von 87 kDa, während die MCC β -Untereinheit eine molekulare Masse von 62 kDa aufwies (Abb. 12A/B, Spur 1-2). Die Proteine wurden mit isolierten Hefemitochondrien inkubiert, entweder in An- oder in Abwesenheit von Valinomycin. Dieses dient als Ionophor, welches in der Lage ist, den Aufbau eines mitochondrialen Membranpotenzials zu verhindern (Abb. 12. $-\Delta\psi$, Spur 2-4). Sowohl MCC α als auch MCC β konnten an die Hefemitochondrien binden. Das Vorhandensein eines mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 12 A/B, $+\Delta\psi$, Spur 5-7) war allerdings Voraussetzung, um die Vorläuferproteine (preMCC α , preMCC β) durch proteolytische Spaltung in ihre gereiften Zustände zu überführen (mMCC α , mMCC β). Die Tatsache, dass die prozessierten Untereinheiten die durchgeführte Proteinase K-Behandlung der Hefemitochondrien unbeschadet überstanden, auch nach selektiver Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembranen durch hypotone Schwellung, lässt den Schluss zu, dass MCC α und MCC β in der mitochondrialen Matrix lokalisiert sind. In Abbildung 12B ist klar zu erkennen, dass die Präsequenz von MCC β deutlich kürzer ist als die von MCC α . Aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens der Präproteine und der gereiften Proteine in der PAGE wurden die molekularen Massen der Signalpeptide von MCC α und MCC β auf 7,2 und 1,8 kDa geschätzt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beiden Untereinheiten klassische mitochondriale Targetingsignale enthalten, welche die Präproteine in einer membranpotential-abhängigen Weise in die mitochondriale Matrix einschleusen, wo sie zu den gereiften Proteinen prozessiert werden. Die Abhängigkeit des Imports vom Membranpotential ist charakteristisch für Proteine mit aminoterminalen Präsequenzen (Pfanner und Geissler, 2001, Martin et al., 1991), was einen weiteren Hinweis auf eine aminoterminalen Lokalisation der 3-MCC-Signalpeptide ergab.

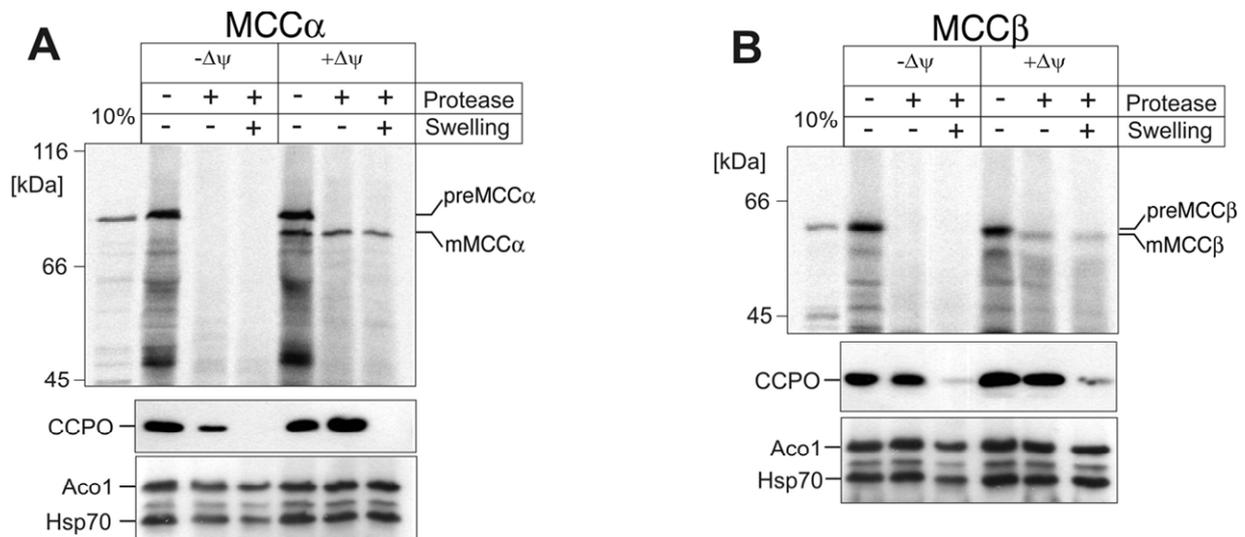


Abb. 12A und 12B: MCC α und MCC β werden in die mitochondriale Matrix importiert. Radioaktiv markierte MCC α - (A) und MCC β - (B) Vorläuferpeptide wurden für 30 min bei 25°C mit isolierten Wildtyp-Hefemitochondrien inkubiert, einmal in Abwesenheit (- $\Delta\psi$) und einmal in Anwesenheit (+ $\Delta\psi$) eines Membranpotentials. Die Proben wurden in drei Aliquots aufgeteilt. Eines blieb unbehandelt, die anderen beiden wurden mit Proteinase K inkubiert, entweder mit oder ohne hypotonischer Schwellung der äußeren Membran. Die Aliquots wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Molekulargewichtsstandard ist jeweils ganz links angeordnet. Vorläufer- und gereifte Peptide werden als preMCC α /preMCC β und mMCC α /mMCC β bezeichnet. Die Spur links, die mit 10% bezeichnet wurde, zeigt 10% der radioaktiv markierten Vorläuferproteine, die für die Importreaktion eingesetzt wurden. Zur Kontrolle wurden immunologische Nachweise der Matrix-Proteine Aconitase (Aco1) und Hitzeschock-Protein 70 (Hsp70) und des Intermembranraum-spezifischen Proteins Cytochrom c Peroxidase (CCPO) der aufgeschlossenen Mitochondrien durchgeführt. Die Abbildungen wurden von Dr. Johannes Herrmann und Stephan Meier am Adolf Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU erstellt.

5.5 Native Reinigung von MCC α und MCC β aus humanem Nierengewebe

Der in vitro Import-Assay hatte gezeigt, dass MCC α und MCC β in die mitochondriale Matrix eingebracht werden. Nach dem Einschleusen mitochondrialer Proteine in die Matrix werden diese durch die MPP (mitochondrial processing peptidase) prozessiert (Hawlitcshek et al., 1988). Erst nach Abspaltung des aminoterminalen Signalpeptids falten sich die Peptide in ihren aktiven Zustand.

Zusätzlich war aus Expressionsstudien der Propionyl-CoA-Carboxylase in *E. coli* bekannt, dass sich die Untereinheiten gut exprimieren lassen, wenn diese ohne das mitochondriale Signalpeptid kloniert wurden (Kelson et al., 1996, Chloupkova et al., 2000). Es wird vermutet, dass die Targetingsequenzen, die in *E. coli* keine Funktion erfüllen, zur Fehlfaltung des überexprimierten Proteins führen können.

Um für eine möglichst korrekte Faltung der Untereinheiten in ihren aktiven Zustand zu sorgen, sollten diese ohne Signalpeptide in prokaryontische Expressionsvektoren

kloniert werden. Dafür war es notwendig, die exakten Aminotermini der gereiften humanen MCC α - und MCC β -Proteine durch aminoterninale Ansequenzierung zu bestimmen. Für die Ausführung war es erforderlich, ausreichende, möglichst reine Mengen der beiden Enzymuntereinheiten aus geeignetem humanen Gewebe zu isolieren. 3-MCC wird bekanntermaßen besonders stark in Niere und Leber exprimiert (Sweetman und Williams, 1995). Freundlicherweise wurde von Frau Dr. K. Anslinger (Institut für Gerichtsmedizin der LMU München) humanes Nierengewebe zur Verfügung gestellt. Das tiefgefrorene Gewebe wurde in Sucrose-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines Polytron Gewebehomogenisators und eines Glas-Teflon-Homogenisators zerkleinert und auf mehrere Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach differentieller Zentrifugation in eiskaltem Sucrose-Puffer konnten die angereicherten Mitochondrienfraktionen und die Zellextrakte mit dem μ MACS Streptavidin Kit über μ MACS Säulen nativ gereinigt werden. Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass MCC α die prosthetische Gruppe Biotin trägt und somit über Streptavidin an die μ MACS Säulen gebunden werden konnte. Bei dieser Art der nativen Reinigung konnte davon ausgegangen werden, dass die Komplexbildung von MCC α und MCC β erhalten bleibt und MCC β somit über MCC α isoliert werden würde.

5.6 MCC α und MCC β können durch 2D-Gelelektrophorese und Peptidmassenfingerprint (PMF-MALDI-MS) identifiziert werden

Um die 3-MCC-Untereinheiten aminoterminal ansequenzieren zu können, mussten die Proteine der Mitochondrienfraktionen und der Zellextrakte, die durch das Streptavidinsystem isoliert und gereinigt worden waren, zunächst durch 2D-Gelelektrophorese getrennt und die entstandenen Proteinspots identifiziert werden. Die 2D-Gelelektrophorese und der Peptidmassenfingerprint wurden von Herrn Dr. Halder der Firma TopLab, Martinsried durchgeführt. Für die Proteingele wurden jeweils zweimal zwischen 230 μ g und 500 μ g Gesamtprotein aus den Mitochondrienfraktionen und Zellextrakten aufgetragen. Das erste Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen, um die Spots sichtbar zu machen und die Reinheit der Proteinfractionen abschätzen zu können (Abb. 13 und 14). Das zweite Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Ausgewählte Spots wurden aus dem Gel ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Identifizierung erfolgte

über eine PMF-MALDI-Massenspektrometrie der entstandenen Fragmente, die mit einem tryptischen *in silico* Verdau der Peptide verglichen wurde.

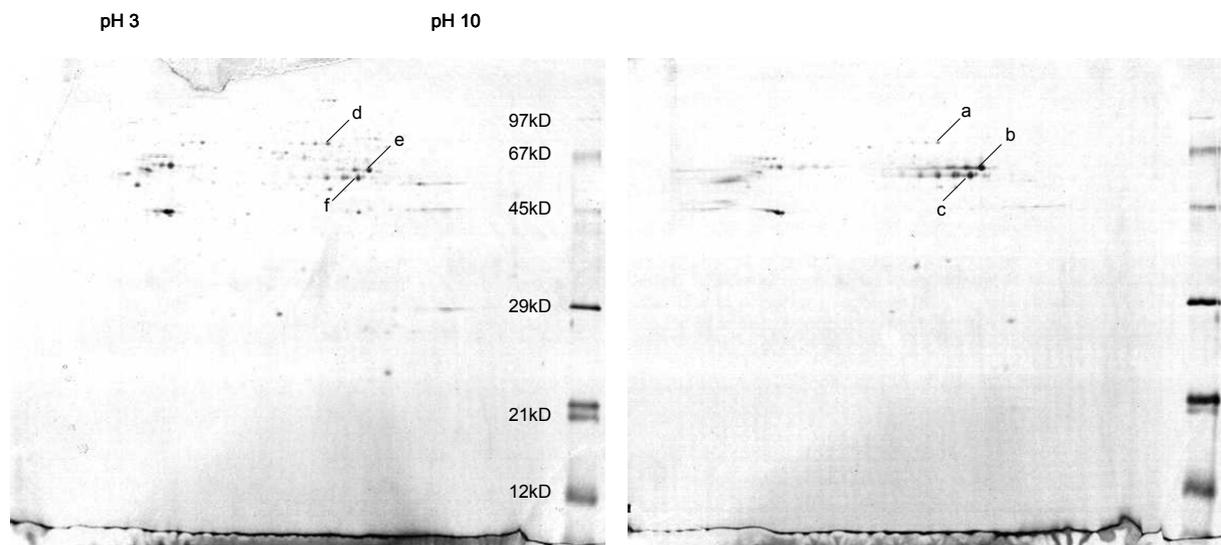


Abb. 13: Silberfärbung der 2D-Gele nach Auftrennung der gereinigten Proteine aus der Mitochondrienfraktion und dem Zellextrakt. Es wurden jeweils 230 µg Gesamtproteinmenge aufgetragen, am rechten Gelrand befindet sich jeweils ein Proteinmolekulargewichtsstandard. Die gekennzeichneten Punkte (a-f) wurden nachfolgend durch PMF-MALDI-MS identifiziert. Die 2D-Gelelektrophorese wurde von Dr. Halder der Firma TopLab, Martinsried durchgeführt.

Zunächst konnten durch PMF-MALDI-MS und Datenbankvergleiche folgende Proteine identifiziert werden:

- a) [4557833]; Propionyl-CoA-Carboxylase, α -Polypeptid; 77,96 kDa
- b) [11545863]; 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, β -Polypeptid; 61,83 kDa
- c) [455713]; Propionyl-CoA-Carboxylase, β -Polypeptid; 58,81 kDa
- d) [4557833]; Propionyl-CoA-Carboxylase, α -Polypeptid; 77,96 kDa
- e) [11545863]; 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, β -Polypeptid; 61,83 kDa
- f) [455713]; Propionyl-CoA-Carboxylase, β -Polypeptid; 58,81 kDa

MCC α befand sich nicht, wie eigentlich erwartet, unter den analysierten Proteinspots. Aus diesem Grund wurden erneut mit dem μ MACS Streptavidin Kit biotinhaltige Proteine nativ aus humaner Niere gereinigt. Für die neuen 2D-Gele konnten 500 µg Gesamtprotein aus den Mitochondrienfraktionen und den Zellextrakten auf die Gele aufgetragen werden.

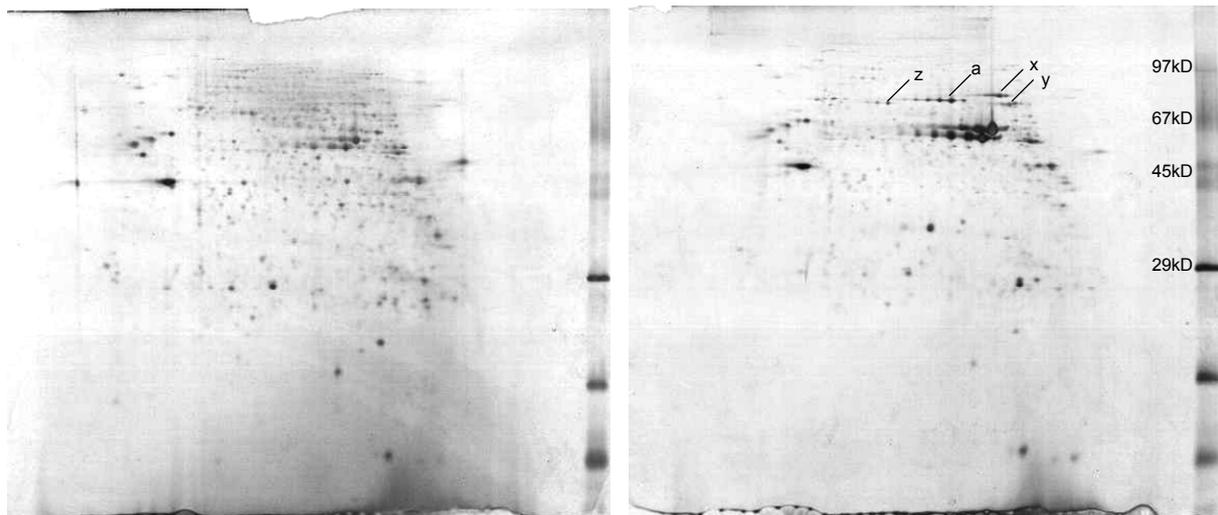


Abb. 14: Silberfärbung der 2D-Gele nach Auftrennung der gereinigten Proteine aus der Mitochondrienfraktion und dem Zellextrakt. Hier wurden 500 µg Gesamtproteinmenge aufgetragen, am rechten Gelrand befindet sich jeweils ein Molekulargewichtsstandard. Die Spots (a,x,y,z) aus dem Gesamtzellextrakt wurden nachfolgend durch PMF-MALDI-MS identifiziert. Die Mitochondrienfraktion (linkes Gelbild) enthielt keine geeigneten Proteinspots für einen PMF. Die 2D-Gelelektrophorese wurde von Dr. Halder der Firma TopLab, Martinsried durchgeführt.

Eine erneute PMF-MALDI-MS der Peptidfragmente nach tryptischem Verdau gekoppelt mit der in silico Analyse erbrachte folgendes Ergebnis:

- a) [4557833]; Propionyl-CoA-Carboxylase, α -Polypeptid; 77,96 kDa
- z) [4557833]; Propionyl-CoA-Carboxylase, α -Polypeptid; 77,96 kDa
- x) [14573195]; 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, α -Polypeptid; 80,4 kDa
- y) [14573195]; 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase, α -Polypeptid; 80,4 kDa

Bei den Spots z und y handelt es sich wahrscheinlich um MCC α - und PCC α -Peptide, die während der Reinigung teilweise degradiert wurden, und daher geringere molekulare Massen sowie andere isoelektrische Punkte aufweisen.

Exemplarisch für alle erstellten PMF-MALDI-MS Spektren wird hier das Spektrum von MCC α nach Verdau mit Trypsin dargestellt (Abb. 15).

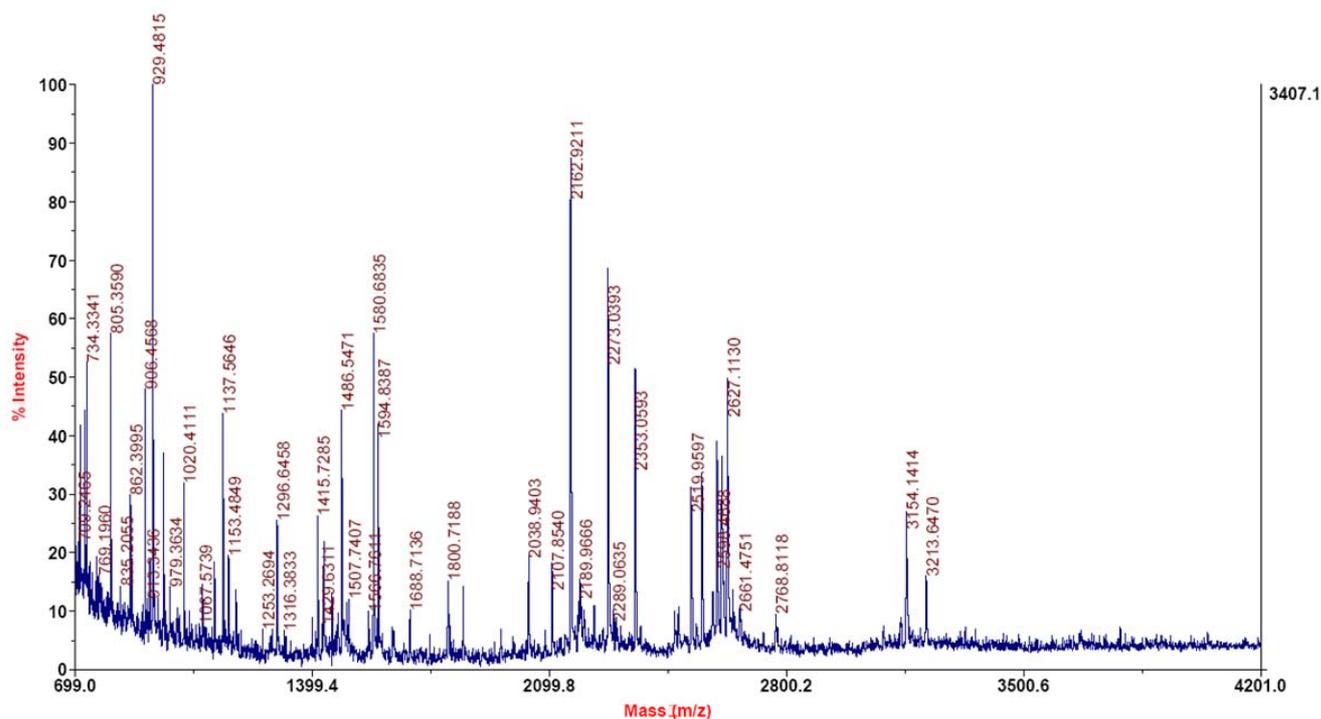
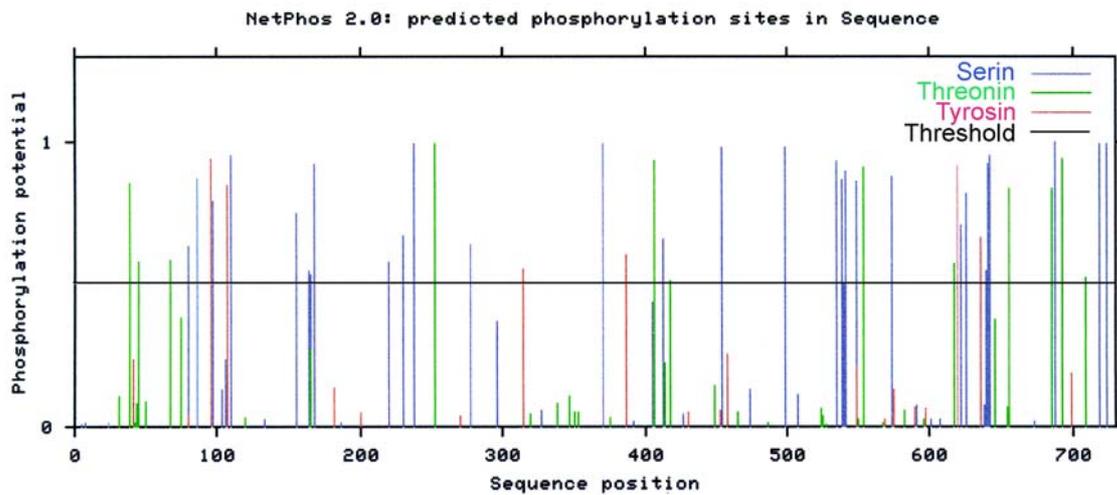


Abb. 15: PMF-MALDI-MS-Spektrum des Peptids MCC α nach tryptischem Verdau. Die Analyse wurde von der Firma TopLab, Martinsried durchgeführt. Der Datenbank-Vergleich mit dem tryptischen in silico Verdau führte zur Identifizierung von MCC α .

Die molekularen Massen der Proteine MCC α und MCC β (außer Spot y) im 2D-Gel (Abb. 13 und 14) entsprachen den molekularen Massen, die durch den in vitro Import-Assay ermittelt worden waren.

Betrachtet man die Spots von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β genauer, fällt auf, dass diese jeweils innerhalb von Ketten mehrerer hintereinander folgender Proteinspots im Gel vorliegen. Dieses Phänomen, welches bei 2D-Gelelektrophoresen von Proteinen häufig auftritt, spricht für das Vorliegen unterschiedlicher posttranslationaler Zustände der Proteine. Hierbei könnte es sich um unterschiedliche Phosphorylierungsgrade handeln. Die AS-Sequenzen von MCC α , MCC β (Abb. 16A/16B), PCC α und PCC β (nicht gezeigt) wurden mit Hilfe des NetPhos 2.0 Servers der Technischen Universität Dänemark (www.cbs.dtu.dk) einer in silico Analyse hinsichtlich des Phosphorylierungsgrades unterzogen. Das Programm NetPhos errechnet anhand bestimmter Algorithmen die Wahrscheinlichkeit jedes einzelnen Serin-, Threonin- und Tyrosinrestes für eine Phosphorylierung.

A



B

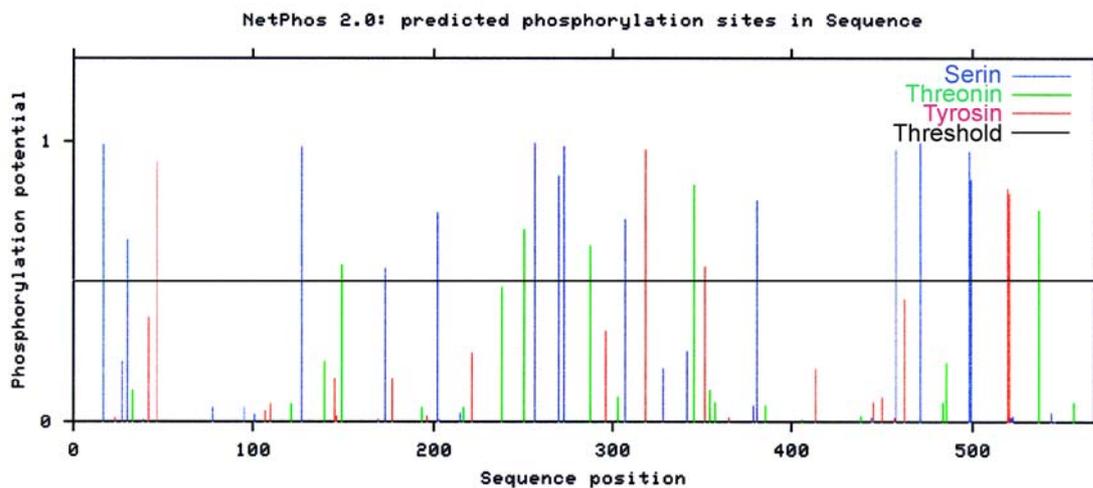


Abb. 16A/16B: In silico Analyse des Phosphorylierungsmusters von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten des MCC α - (A) und des MCC β -Peptids (B). Für die Vorhersage wurden die AS-Sequenzen in das Programm NetPhos des NetPhos 2.0 Servers der Technischen Universität Dänemark eingegeben. Das Phosphorylierungspotential muss einen Schwellenwert von 0,5 überschreiten. Erst dann besteht eine theoretische Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung des AS-Restes. Je höher dieser Wert ist (maximal 1,0), desto größer die Wahrscheinlichkeit.

Das Programm bestimmte eine hohe Phosphorylierungswahrscheinlichkeit für zahlreiche Serin-, Threonin- und Tyrosinreste der vier Untereinheiten. Die Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Serin-, Threonin- und Tyrosinreste von MCC α und MCC β mit Angaben der Sequenzpositionen sind im Anhang unter 9.3 und 9.4 zu finden.

Fremdproteine in *E. coli* unterstützen kann (di Guan et al., 1988, Kapust und Waugh, 1999).

Erhaltene Klone wurden durch Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft und für die Transformation superkompetenter *E. coli* BL21 RIL Zellen verwendet. Die Expression der MBP-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Eine Inkubationstemperatur von 37°C über einen Zeitraum von 5 Stunden brachte gute Expressionsergebnisse. Die im Anschluss hergestellten Zellextrakte wurden mit Hilfe eines Bradford-Assays hinsichtlich ihrer Proteinkonzentration untersucht und im Proteingel analysiert (Abb. 20). Es konnte gezeigt werden, dass MCC α und MCC β ohne Targetingsequenzen mit Hilfe des Vektors pMAL-c2X erfolgreich exprimiert werden können.

5.8.1 Bestimmung der Enzymaktivität rekombinant exprimierter MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteine

Mit der Durchführung eines 3-MCC-Radio-Enzymassays sollte überprüft werden, ob die rekombinant exprimierten Untereinheiten aktive Komplexe bilden können. Der Enzymassay wird genauer unter 4.4.3 (Methodenteil) und unter 5.11.6 beschrieben. Für den Assay wurden jeweils 0,5 mg Protein der *E. coli*-Rohextrakte von MBP-MCC α und MBP-MCC β eingesetzt. Als Kontrollen wurden Leerproben ohne das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA mitgeführt. Die Aliquots mit den Fusionsproteinen und dem Substrat erreichten keine höheren Aktivitätswerte-Werte als die Leerproben. Es wurde vermutet, dass die Untereinheiten vor der möglichen Assemblierung degradiert werden und eine Komplexbildung sofort nach Entstehung der Proteine gewährleistet werden muss.

5.8.2 In vitro Translation der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β mit den Chaperoninen groES und groEL

Die Fusionsproteine sollten nun simultan in einem kleinen Volumen exprimiert werden, um eine Interaktion zu erleichtern und einer vorschnellen Degradierung entgegenzuwirken. Zusätzlich sollten die *E. coli* Chaperonine groES (10 kDa) und groEL (55 kDa) co-exprimiert werden. Über diese Chaperonine ist bekannt, dass sie die Assemblierung von Proteinuntereinheiten unterstützen und positiv auf die Menge

der gebildeten Proteine einwirken (Goloubinoff et al., 1989, Kelson et al., 1996, Bross et al., 1995, Zheng et al., 1993, Saijo et al., 1994).

Die Chaperonine lagen co-kloniert in dem Konstrukt pGroESL (3.10) vor. Für die *in vitro* Translation wurde das *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA der Firma Promega benutzt. Ein Ansatz enthielt insgesamt maximal 4 µg zirkuläre DNA (Midipräparationen der Plasmide *MCCA*-pMAL-c2X, *MCCB*-pMAL-c2X und pGroESL). Die Reaktion fand unter Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin statt. Aliquots der Translationsprodukte wurden auf ein Proteingel geladen, welches nach erfolgtem Gellauf im Gelrockner dehydriert wurde. Die radioaktiv markierten Proteinbanden wurden durch Autoradiographie eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

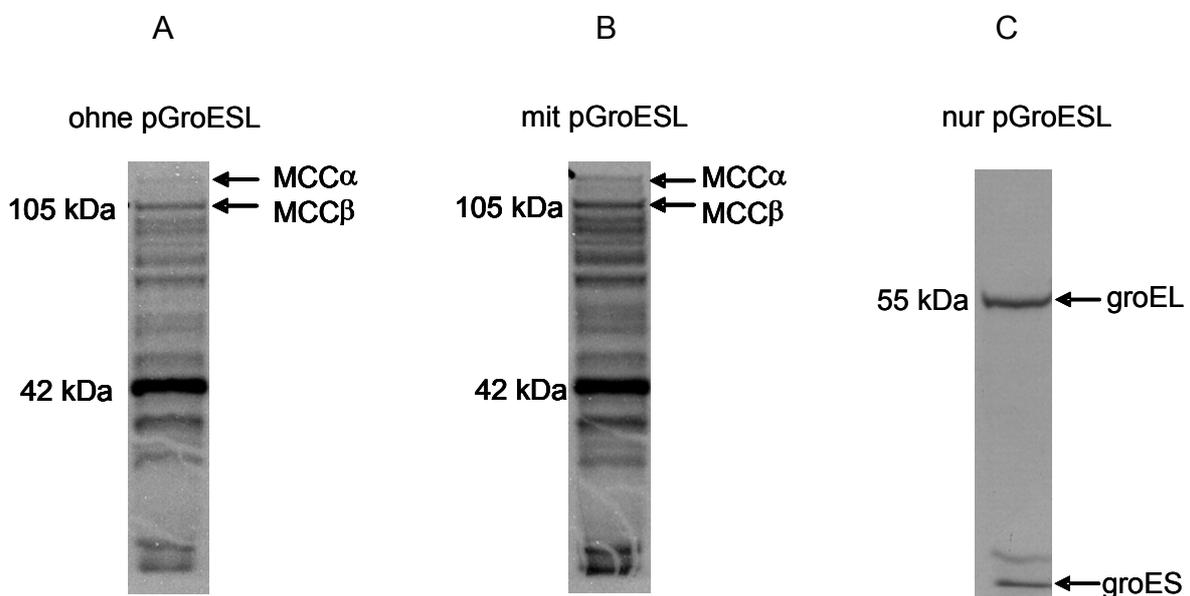


Abb. 18A-C: SDS-PAGE nach *in vitro* Translation von MCCα, MCCβ, groES und groEL. Die Translation wurde mit dem *E. coli* S30 Extract System for Circular DNA (Promega) unter Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin einmal ohne (A) und einmal mit (B) Co-Translation von pGroESL durchgeführt. (C) Kontrollversuch mit pGroESL alleine. Die Banden wurden durch Autoradiographie eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

In Abbildung 18A ist zu sehen, dass sowohl MBP-MCCα (ca. 120 kDa), als auch MBP-MCCβ (ca. 105 kDa) im *E. coli* S30 Extract System hergestellt wurden, wobei die Synthese des MCCα-Fusionsproteins weitaus geringer ausfiel als die von MBP-MCCβ. Die prominenteste Bande im Gel ist die des MBP-Proteins an sich (42 kDa). Abbildung 18B zeigt, dass nach Zugabe des Plasmids pGroESL größere Mengen an MBP-MCCα und MBP-MCCβ vorhanden waren, obwohl sich weniger Plasmid-DNA dieser beiden Konstrukte im Reaktionsansatz befand. Dieses Ergebnis spricht für die

stabilisierende Wirkung der Chaperonine groES und groEL. Auch hier enthält die MBP-Bande die größten Mengen an Protein. Abbildung 18C zeigt einen Kontroll-Reaktionsansatz, der nur pGroESL enthielt.

Ein Aliquot der Translationsansätze wurde erneut für die Messung der 3-MCC-Aktivität eingesetzt. Auch hier konnten, trotz erfolgter Co-Translation der MBP-Fusionsproteine, keine Enzymaktivitäten gemessen werden. Es wurde vermutet, dass die MBP-Tags die Assemblierung zu einem funktionell aktiven Dodecamer $(\alpha\beta)_6$ verhindern.

5.8.3 Affinitätsreinigung der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β

Im nächsten Schritt sollten also die MBP-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie angereichert und gereinigt werden, um anschließend die MBP-Tags durch die Protease Faktor Xa effektiv von MCC α und MCC β abtrennen zu können. Für die Reinigung wurde eine Säule mit Amyloseharz verwendet, da MBP spezifisch an die Amylose bindet und somit die Reinigung der Fusionsproteine ermöglicht.

Die MBP-Fusionsproteine wurden erneut in einer *E. coli*-Kultur (1 l) zur Expression gebracht. Für die Expression von MBP-MCC α wurden dem LB-Medium zusätzlich 5 μ M Biotin zugesetzt, um eine Biotinylierung zu gewährleisten. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation abgeerntet und das resultierende Zellpellet in 20 ml Säulenpuffer resuspendiert. Diesem Säulenpuffer wurden 2 Tabletten Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail zugesetzt, um die empfindlichen Untereinheiten möglichst vor Degradation zu schützen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend filtriert (Spritzenfilter mit der Porengröße 0,45 μ m) und auf die Amylosesäule aufgebracht. Die Chromatographie wurde bei 4°C und einer Flussrate von 0,4 ml/min durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt ein Chromatogramm der Affinitätschromatographie von MBP-MCC β .

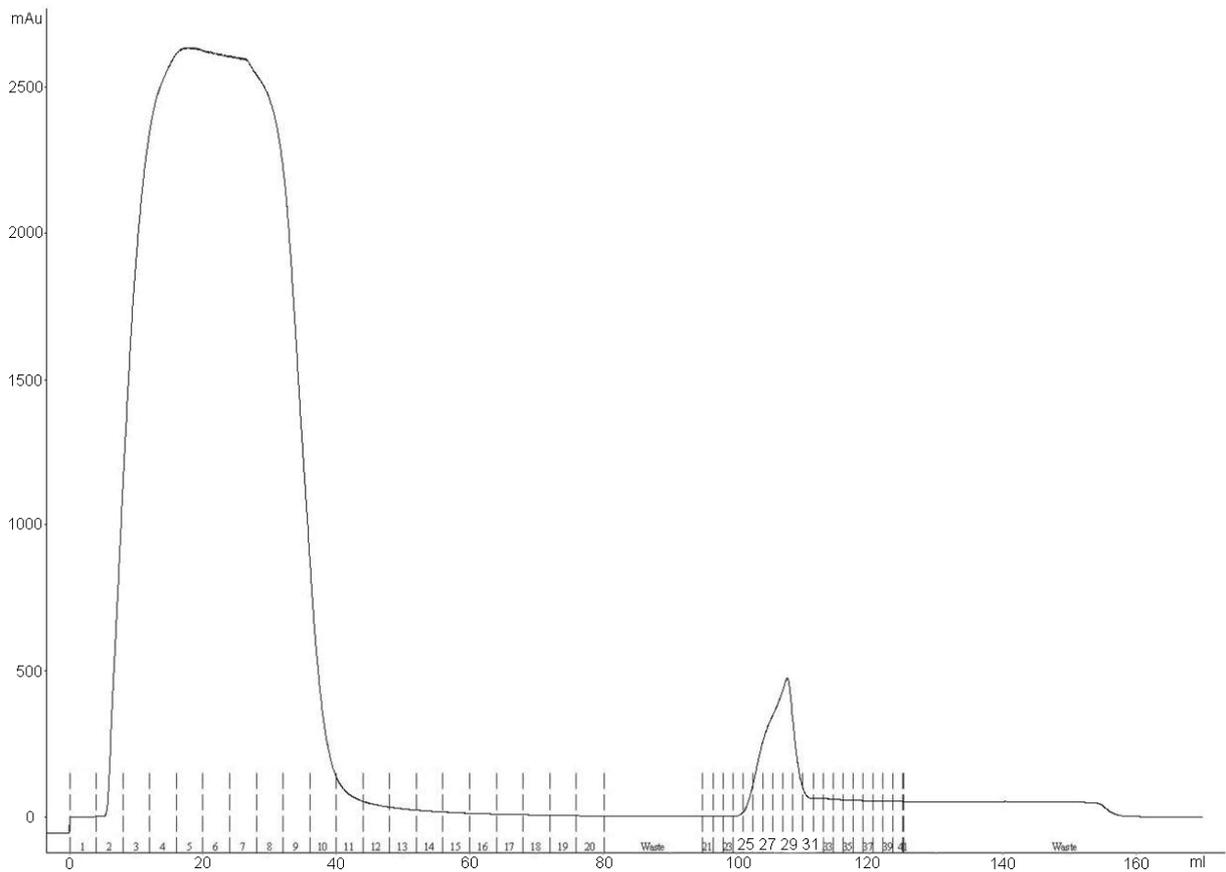


Abb. 19: Chromatographie und Elutionsbedingungen der Amylose-Affinitätsreinigung von MBP-MCC β aus *E. coli*-Rohextrakt. Der erste große Peak zeigt den Durchlauf nicht-gebundener Proteine der Amylose-Säule. Der zweite kleinere Peak (bei ca. 103 ml) repräsentiert die gereinigten Elutionsfraktionen von MBP-MCC β (Fraktionen 26-31).

Die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen (je 1,5 ml) von MBP-MCC β und MBP-MCC α wurden nach der Methode von Bradford bestimmt. Die Effizienz der Reinigung wurde durch eine SDS-PAGE überprüft (Abb. 20).

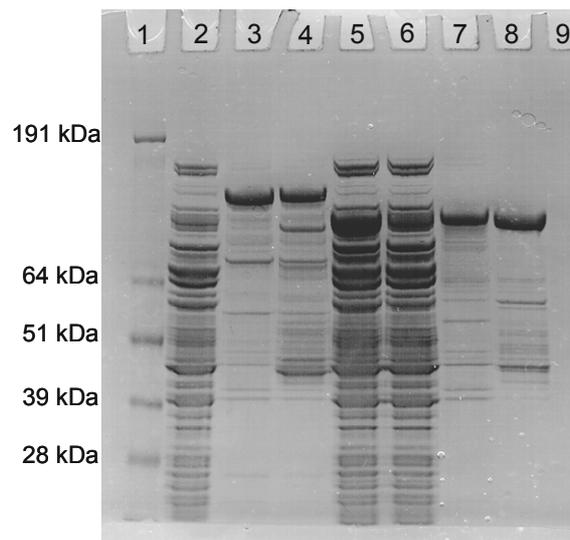


Abb. 20: SDS-PAGE der MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fraktionen nach Affinitätsreinigung über Amyloseharz. Spur 1: SeeBlue Molekulargewichtsstandard, Spur 2: Durchlauf der Amylosesäule nach Auftrag von MBP-MCC α -Rohextrakt, Spur 3: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC α (Fraktion 27; 1,1 mg/ml), Spur 4: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC α (Fraktion 30; 1,7 mg/ml), Spur 5: Rohextrakt von MBP-MCC β (4,16 mg/ml), Spur 6: Durchlauf der Amylosesäule nach Auftrag von MBP-MCC β , Spur 7: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC β (Fraktion 28; 1,3 mg/ml), Spur 8: Gereinigte Fraktion von MBP-MCC β (Fraktion 31; 3,8 mg/ml).

Wie in Abbildung 20 gezeigt, konnte durch die Affinitätschromatographie eine erste Reinigung von MBP-MCC α und MBP-MCC β erzielt werden. Die Gelspuren der gereinigten Fusionsproteine (3, 4, 7, 8) zeigen eine prominente Proteinbande in der erwarteten Größe und vergleichsweise weniger Nebenbanden mit deutlich geringerem Proteingehalt.

5.8.4 Abtrennen des MBP-Tags durch die Protease Faktor Xa

Nach der Reinigung der Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie sollten die MBP-Tags unter Einsatz der Protease Faktor Xa abgetrennt werden, um eine Assemblierung der Untereinheiten und somit eine Rekonstitution der 3-MCC-Aktivität zu ermöglichen. Dieses Vorhaben erwies sich als nicht durchführbar, da bei jedem Versuch die Tags vollständig abzuschneiden, die instabilen Untereinheiten degradiert wurden. Die MBP-Tags konnten nur durch hohe Konzentrationen von Faktor Xa (bis zu 7% des Schneide-Ansatzes) und unter Zugabe von Detergenzien, die eine Entfaltung des Proteins ermöglichen sollten, erreicht werden. Unter anderem wurde die Verwendung von SDS (in den Konzentrationen 0,005% und 0,05% der Ansätze), 1% Triton X-100 und 3% N-Lauroylsucrosyl überprüft. Auch eine Änderung der

Inkubationstemperatur und des Inkubationspuffers brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die empfindlichen 3-MCC-Untereinheiten überstehen die Prozedur des Verdauens mit Faktor Xa offensichtlich nicht. Zusammenfassend lieferte die Expression von MBP-MCC α und MBP-MCC β in *E. coli* grundlegende Erkenntnisse für die rekombinante Herstellung der Untereinheiten im prokaryontischen Systemen: Die MBP-Fusionsproteine lassen sich ohne Targetingsequenzen gut exprimieren und können über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Für die Bildung aktiver Enzymkomplexe muss allerdings ein Expressionssystem gefunden werden, welches eine simultane Synthese der Untereinheiten ohne Tag erlaubt. Von Kelson et al. wurde ein *E. coli*-Expressionssystem für die erfolgreiche Co-Expression der α - und β -Untereinheiten von PCC ohne Tag beschrieben (Kelson et al., 1996). Analog zu diesem System werden derzeit die cDNA-Sequenzen von *MCCA* und *MCCB* ohne Targetingsequenzen in diesen Vektor (PinPoint-Xa) co-kloniert. Die simultane Expression der Untereinheiten soll eine sofortige Assemblierung und damit geringere Degradation ermöglichen.

5.9 Generierung von Peptidantikörpern gegen MCC α und MCC β

Ein wichtiges Werkzeug für die Analyse von Proteinen ist der Besitz von spezifischen Antikörpern. Um eine Nachweismöglichkeit für MCC α und MCC β -Proteine im Western Blot zu erhalten, wurden polyklonale Peptidantikörper gegen die beiden Enzymuntereinheiten hergestellt. 3-MCC zeigt, wie bereits beschrieben, große Homologie zu den beiden weiteren mitochondrial lokalisierten, biotinabhängigen Carboxylasen PCC und PYC. Um Kreuzreaktionen der Antikörper möglichst zu vermeiden, musste bei der Auswahl der Peptidsequenzen, die als Antigen-Peptide für die Immunisierung von Wirtstieren synthetisiert werden sollten, darauf geachtet werden, dass diese möglichst geringe Homologie zu PCC und PYC aufweisen. Um die Spezifität zu erhöhen sollten die Peptide auch keine funktionell wichtigen, konservierten Domänen, wie die Biotin- oder ATP-Bindestelle enthalten. Es wurden folgende Aminosäuresequenzen für die Peptidsynthese ausgewählt:

Untereinheit	Sequenzabfolge	Sequenzposition
MCC α	VEGYHGEDQSDQC	178-190
MCC α	FYREGAQANRHTP+C	698-710
MCC β	FPDRDHFGRTFYNQ+C	185-198
MCC β	TITKDQRAREGKQF+C	484-497

Tabelle 2: Sequenzabfolgen von MCC α und MCC β , die für die Peptidsynthese ausgewählt wurden. Diese AS-Abfolgen zeigen möglichst geringe Homologie zu den mitochondrialen Paralogen PCC und PYC (siehe Alignment im Anhang).

Die Synthese wurde bei der Firma INBIOS, Martinsried in Auftrag gegeben. Die Peptide wurden carboxyterminal, wenn nicht bereits in der Sequenz vorhanden, mit einem zusätzlichen Cysteinrest synthetisiert, um eine spätere Affinitätsreinigung zu ermöglichen, und an den Carrier Ovalbumin gekoppelt. Jeweils 2 Kaninchen wurden 3-5 mg mit einer äquimolaren Mischung der MCC α - bzw. MCC β -Peptide immunisiert. Nach 70 Tagen standen jeweils 40 ml Serum jedes Kaninchens (A und B), jeweils 2 ml Präimmunserum und 5 mg des synthetisierten Antigen-Peptids (lyophilisiert) zur Verfügung.

Peptid/Serum	Bezeichnung durch INBIOS
MCC α AS 178-190	Peptid 3031
MCC α AS 698-710	Peptid 3032
MCC β AS 185-198	Peptid 3033
MCC β AS 484-497	Peptid 3034
Immuneserum Kaninchen A gegen 3031+3032	IN35 A
Immuneserum Kaninchen B gegen 3031+3032	IN35 B
Immuneserum Kaninchen A gegen 3033+3034	IN36 A
Immuneserum Kaninchen B gegen 3033+3034	IN35 B

Tabelle 3: Lieferumfang der Firma INBIOS nach 70 Tagen: Vier synthetisierte Antigen-Peptide 3031, 3032, 3033 und 3034 und vier Kaninchen-Antiseren gegen Mischungen der MCC α - bzw. MCC β -Peptide.

Alle gelieferten Kaninchenserum zeigten im ELISA-Bindungstest, der von der Firma INBIOS durchgeführt wurde, hohe Antikörper-Titer. Das Antiserum mit den Peptidantikörpern gegen die MCC α -Peptide, reagierte sehr gut auf MCC α 698-710 und auf das Gemisch der Peptide, nicht aber auf MCC α 178-190 alleine. Letzteres Peptid erwies sich als sehr schlechtes Immunogen. Das Antiserum, welches gegen die MCC β -Peptide gerichtet war, reagierte sehr gut mit beiden Peptiden, besonders allerdings mit MCC β 484-497. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die ELISA-Tests der Peptidantikörper der Kaninchen A und B gegen MCC α 698-710 (3032) und gegen MCC β 484-497 (3034). Es ist gut zu erkennen, dass die jeweiligen Präimmunseren noch keine AK gegen MCC α und MCC β enthielten.

5.9.1 Reinigung der Peptidantikörper gegen MCC α und MCC β mit dem SulfoLink[®]Kit

Die Versuche mit den Kaninchen-Antiseren, rekombinant exprimiertes MBP-MCC α und MBP-MCC β nachzuweisen, zeigten, dass die Antiseren bei der Entwicklung von Western Blots einen erheblichen „Hintergrund“ produzierten. Die spezifische Bindung der Peptidantikörper war somit schlecht abzuschätzen (Abb. 21 und 22). Aus diesem Grund wurden die Peptidantikörper mit dem SulfoLink[®]Kit affinitätschromatographisch aus den Kaninchen-Seren gereinigt.

Die Kopplung der synthetisierten Antigen-Peptide beruht auf der kovalenten Bindung von Sulfhydrylgruppen der Peptide und Proteine an Iodoacetylgruppen des Agarosegelmateriale. Jeweils 5 mg der synthetisierten Peptide wurden in Coupling Buffer gelöst und nach Angaben des Herstellers an das SulfoLink[®] Coupling Gel gebunden.

Die Reinigung der Peptid-Antikörper über die an das Trägermaterial gekoppelten Antigen-Peptide erfolgte im batch-Verfahren nach folgendem Schema:

Coupling Gel + gekoppeltes Peptid	Kaninchen-Serum
MCC α 3031	IN35 A und IN35 B (3031+3032)
MCC α 3032	IN35 A und IN35 B (3031+3032)
MCC β 3033	IN36 A und IN36 B (3033+3034)
MCC β 3034	IN36 A und IN36 B (3033+3034)

Tabelle 3: Reinigungsschema der Peptidantikörper über das SulfoLink[®] Coupling Gel. In der linken Spalte werden die Peptide, die an das SulfoLink[®] Coupling Gel gekoppelt wurden aufgeführt. In der rechten Spalte sind die Kaninchen-Seren aufgelistet, die auf das Coupling Gelmaterial geladen wurden.

Die gereinigten Peptidantikörper wurden durch Glyzin-Puffer (100 mM, pH 3,0) eluiert und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Diese wurden durch Zugabe von 1 M Tris (pH 7,5) neutralisiert und anschließend über Dialyse gegen PBS entsalzt.

Die erhaltenen Peptid-Antikörper-Fractionen wurden in Western Blot-Analysen auf rekombinant exprimierten MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen, die zuvor durch Affinitätschromatographie gereinigt worden waren, getestet. Die Peptidantikörper wurden jeweils 1:200 in 0,1% Milchpulverlösung verdünnt. Als Vergleich wurden die MBP-Fusionsproteine auch mit anti-MBP Serum (Verdünnung 1:10.000) der Firma New England BioLabs nachgewiesen (Abb. 21 und 22). Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Tests der Peptidantikörper gegen

MCC α 3032 und MCC β 3034. Die Tests der Peptidantikörper gegen MCC β 3033 waren vergleichbar mit jenen von MCC β 3034. Die Peptidantikörper gegen MCC α 3031 zeigten vergleichsweise lediglich schwache Nachweissignale.

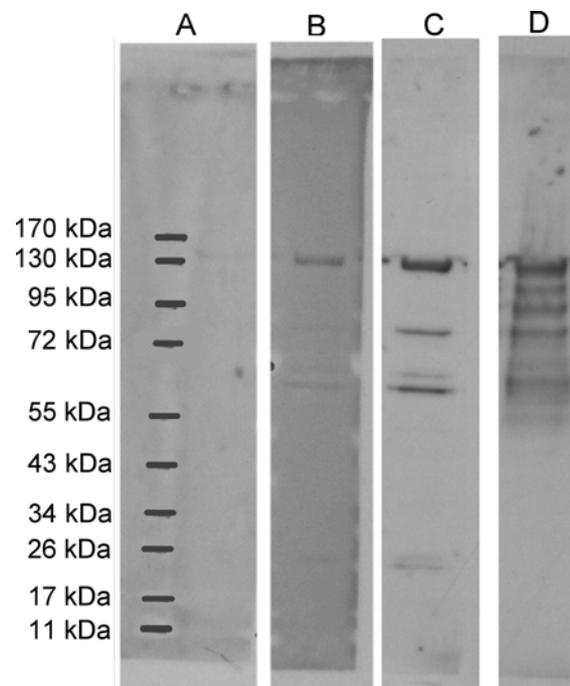


Abb. 21 A-D: Nachweistest von MBP-MCC α durch Präimmunserum und Peptidantikörper gegen MCC α 3032 im Western Blot. Die Spuren enthalten 8 μ g des Fusionsproteins MBP-MCC α nach Affinitätsreinigung. Bild A: links PageRuler™ Prestained Protein Ladder, rechts Nachweis mit Präimmunserum A; Bild B: Kaninchen-Antiserum A gegen MCC α 3031 und MCC α 3032 vor Reinigung (1:2000 in 0,1% Milchpulverlösung); Bild C: Nachweis mit Peptidantikörper gegen MCC α 3032 nach Reinigung (1:200 in 0,1% Milchpulverlösung); Bild D: MBP-MCC α nachgewiesen mit anti-MBP Serum (1:10.000 in 5% Milchpulverlösung), New England BioLabs.

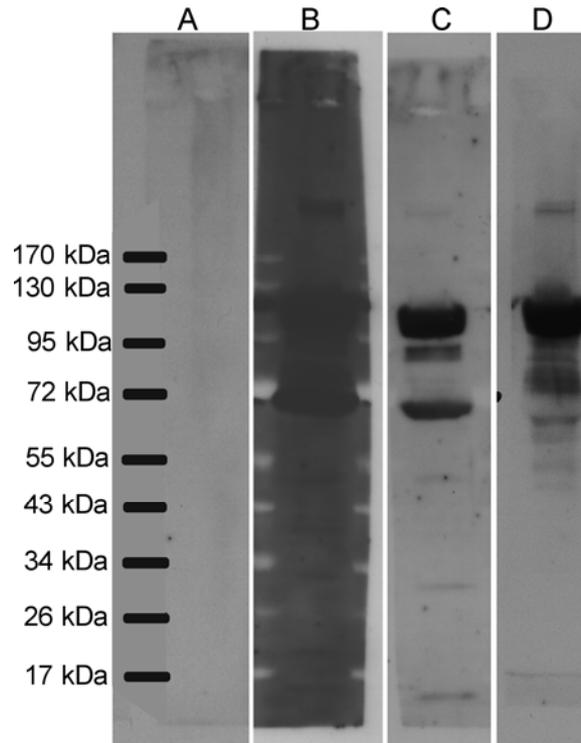


Abb. 22 A-D: Nachweistest von MBP-MCC β durch Peptidantikörper gegen MCC β 3034 im Western Blot. Die Spuren enthalten 7 μ g des Fusionsproteins MBP-MCC β nach Affinitätsreinigung. Bild A: links PageRulerTM Prestained Protein Ladder, rechts Nachweis mit Präimmenserum A gegen 3033 und 3034; Bild B: Peptidantikörper gegen MCC β 3034 vor Reinigung (1:2000 in 0,1% Milchpulverlösung); Bild C: Nachweis mit Peptidantikörper gegen MCC β 3034 nach Reinigung (1:200 in 0,1% Milchpulverlösung); Bild D: MBP-MCC β nachgewiesen mit anti-MBP-Serum (1:10.000 in 5% Milchpulverlösung), New England BioLabs.

Durch den Vergleich mit dem Nachweis der MBP-Fusionsproteine durch das gekaufte anti-MBP-Serum konnte gezeigt werden, dass die jeweiligen Peptidantikörper die MCC α - und MCC β -Peptide spezifisch nachweisen (Abb. 21 und 22). Auf den Abbildungen 21C und 22C sind unter den detektierten Hauptbanden noch kleinere Nebenbanden zu sehen, welche wahrscheinlich unvollständige Fusionsproteine von MCC α und MCC β sind. Besonders in Abbildung 22 ist zu erkennen, dass der unspezifische Hintergrund, der durch das ungereinigte Kaninchen-Antiserum im Western Blot entsteht, durch die Reinigung der Peptid-Antikörper mit dem SulfoLink[®] Kit deutlich verringert werden konnte. Die Austestung der Peptidantikörper auf Zelllysaten von WT-Fibroblasten erbrachte keinen Nachweis der Untereinheiten MCC α und MCC β . Eine Kreuzreaktion mit PCC oder PYC konnte in diesen Versuchen nicht festgestellt werden. Die entstandenen, gereinigten Peptidantikörper gegen MCC α und MCC β eignen sich zwar nicht für den Nachweis der 3-MCC-Untereinheiten in Zelllysaten, bieten jedoch nun die Möglichkeit,

rekombinant überexprimierte 3-MCC-Untereinheiten in Western Blot-Analysen nachzuweisen.

5.10 Klonierung, Expression und Reinigung von MCC α - und MCC β -Proteinanteilen für die Generierung von polyklonalen Antikörpern

Neben den Peptidantikörpern sollten auch polyklonale Antikörper gegen MCC α und MCC β generiert werden, die eine Immunpräzipitation der Untereinheiten erlauben. Ziel war es, mit diesen Antikörpern beispielsweise Immun-Affinitätsreinigungen oder Interaktionsstudien durchzuführen. Zusätzlich sollten diese polyklonalen Antikörper die Möglichkeit bieten, MCC α und MCC β auch in Patienten-Zelllysaten nachweisen zu können. Auch hier musste bei der Auswahl der zu klonierenden Protein-Fragmente darauf geachtet werden, dass diese möglichst wenig Homologie zu den Paralogen PCC und PYC aufweisen und keine funktionell konservierten Domänen enthalten.

Für MCC α wurde die AS-Sequenz 402-643 ausgewählt (ca. 20 kDa), für MCC β die Peptidabfolge 321-543 (ca. 20 kDa) (siehe Proteinalignments im Anhang 9.2).

Die Klonierung der Proteinanteile erfolgte in die Vektoren pMAL-c2X und pGEX-3X. Diese produzieren Fusionsproteine mit aminoterminalen Tags (Methoden 4.1.14). Die Tags stabilisieren die empfindlichen Peptide während der Reinigungsprozedur und ermöglichen die Reinigung über Affinitätschromatographie. Bei einer späteren Immunisierung von Kaninchen mit den hoch gereinigten Fusionsproteinen sind Antikörper gegen MBP und GST (Glutathion-S-Transferase) zu erwarten. Um diese zu entfernen, werden MBP und GST an eine AffiGel 10 Matrix gekoppelt. Das Vollserum soll an diese Affinitätssäule adsorbieren. Die eluierten IgG-Fractionen lassen sich im Anschluss über eine Protein A-Agarose Säule extrahieren und können dialysiert werden.

5.10.1 Klonierung, Expression und Reinigung von MCC β (AS 321-543)

Der entsprechende cDNA-Abschnitt von *MCCB* (bp 963-1629) wurde mit dem Primerpaar *MCCB_AKpMAL-c2XEcoRI/MCCB_AKpMAL-c2XHindIII* vom Template *MCCB_pGEM-T Easy* amplifiziert. Ziel der Subklonierung war der Expressionsvektor

pMAL-c2X. Durch die Fusion mit dem MBP-Tag entstehen so Proteine mit einer molekularen Masse von circa 62 kDa. Erhaltene Klone wurden auf Richtigkeit der Sequenz und des Leserahmens überprüft und in superkompetente *E. coli* BL21 RIL Zellen eingebracht. Die Expression der MBP-MCC β (AS 321-543)-Fusionsproteine konnte durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden (Abb. 25). Die *E. coli*-Zellen wurden nach 5 Stunden Wachstum bei 37°C durch Zentrifugation geerntet. Die Pellets wurden in 20 ml Säulenpuffer (siehe unten, plus Zugabe von 2 Tabletten Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (4 x 45 sec, Amplitude 40%) aufgeschlossen. Der erste Schritt der Reinigung der Fusionsproteine aus den Rohextrakten war eine Affinitätsreinigung (Abb. 23) über eine Amyloseharz-Säule (Methoden 4.4.20)

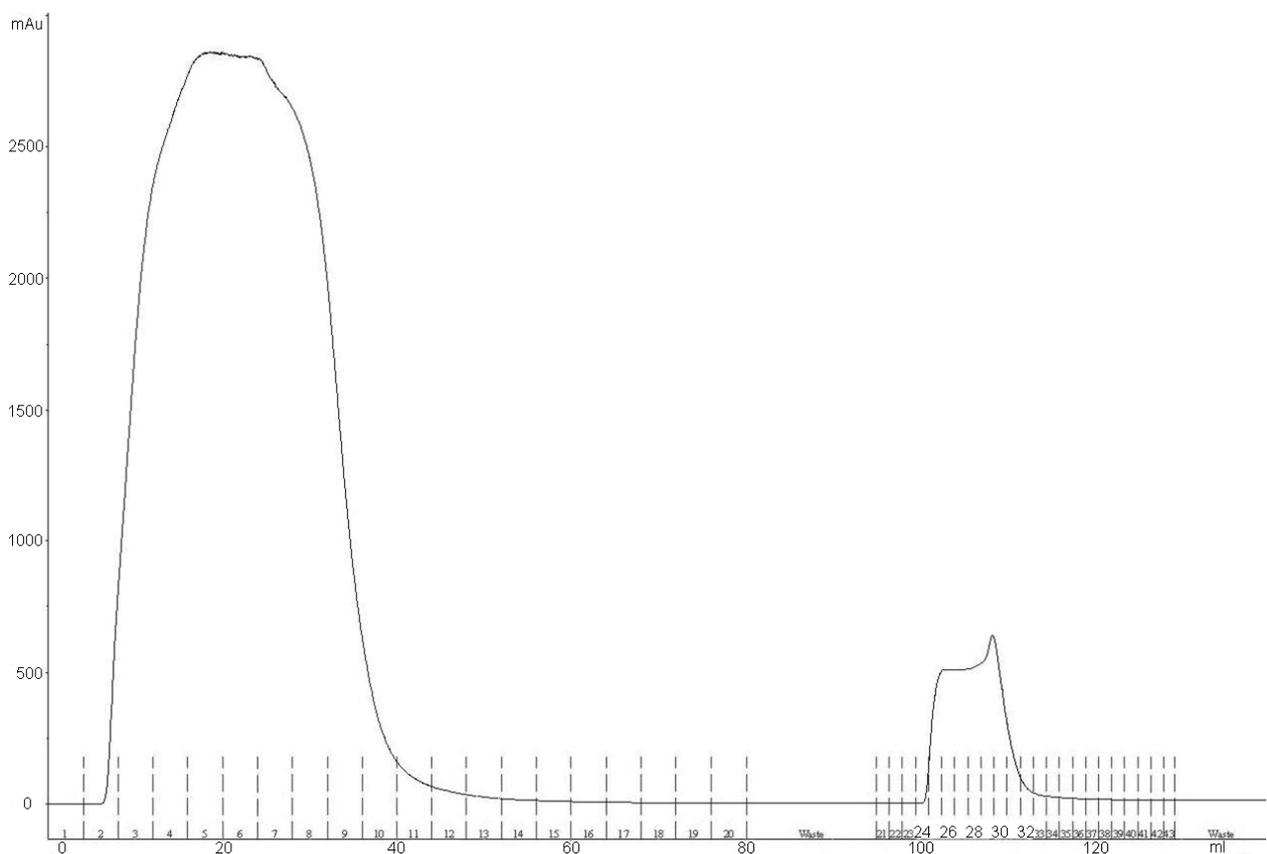


Abb. 23: Elutionsprofil der Affinitätschromatographie von MBP-MCC β (AS 321-543) nach Isolierung aus *E. coli*-Rohextrakt. Verwendet wurde eine selbstgestopfte Säule mit 15 ml Amylose-Harz. Der große Peak bildet die nichtgebundenen Proteine aus dem *E. coli*-Rohextrakt ab. Der kleine Peak (bei 100 ml) steht für die Elutionsfraktionen der präzipitierten MBP-Fusionsproteine (Fraktionen 25-31).

Die gereinigten Elutionsfraktionen 25-31 (jeweils 1,5 ml) wurden gepoolt und über Vivaspin 30 Zentrifugen-Konzentratoren aufkonzentriert. Das Zielvolumen betrug 2 ml.

Diese 2 ml wurden für eine weitere Aufreinigung auf eine Größenausschluss-Chromatographie-Säule (HiLoad 16/60 Superdex 75 Säule, Firma Amersham) aufgetragen (Abb 24., Methoden 4.4.20). Abbildung 25 zeigt verschiedene Aliquots von MBP-MCC β (AS 321-543) im Verlauf der Proteinreinigung.

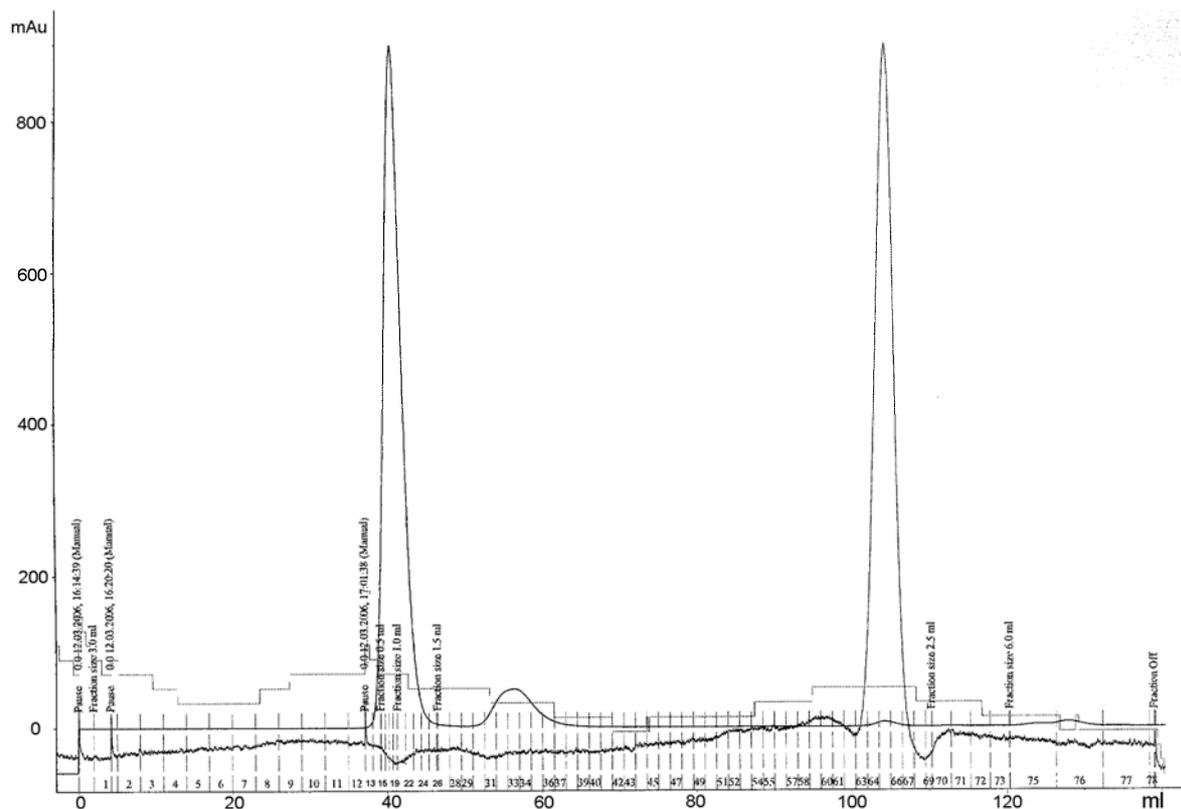


Abb. 24: Elutionsprofil der Größenausschluss-Chromatographie der gepoolten Fraktionen von MBP-MCC β (AS 321-543) nach Affinitätschromatographie. Der erste Peak repräsentiert die MBP-MCC β (AS 321-543)-Fusionsproteine mit einer Größe von circa 62 kDa, die als erstes die Superdex-Säule durchlaufen. Der nachfolgende kleine Peak und der spitze hohe Peak zeigen kleinere Proteine an, die entsprechend ihrer geringeren molekularen Masse die Säule langsamer passieren.

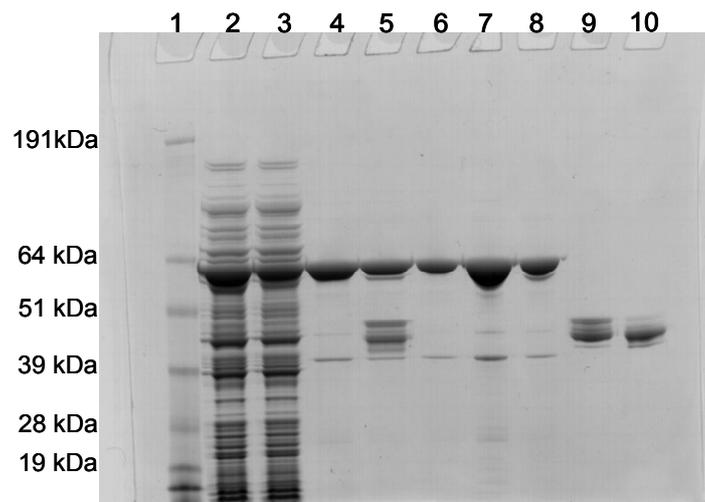


Abb. 25: SDS-PAGE der Proben während des Reinigungsverlaufs von MBP-MCC β (AS 321-543).
 Spur 1: Molekulargewichtsstandard SeeBlue, Spur 2: Rohextrakt MBP-MCC β (AS 321-543), Spur 3: Durchlauf Amylose-Säule, Spur 4: MBP-MCC β AS (321-543) nach Amylose-Säule Fr. 27; 2,1 mg/ml, Spur 5: MBP-MCC β (AS 321-543), Fr. 30; 2,6 mg/ml, Spur 6: MBP-MCC β (AS 321-543) nach Superdex-Säule. Fr. 16; 1,5 mg/ml, Spur 7: MBP-MCC β (AS 321-543) nach Superdex-Säule, Fr. 19; 2,8 mg/ml, Spur 8: MBP-MCC β (AS 321-543) nach Superdex-Säule, Fr. 22; 1,2 mg/ml, Spur 9: MBP-MCC β (AS 321-543), Fr. 33, Spur 10: MBP-MCC β (AS 321-543), Fr. 34.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass das Fusionsprotein MBP-MCC β (AS 321-543), welches als Antigen für die Immunisierung von Kaninchen verwendet werden soll, durch Affinitätschromatographie und Größenausschluss-Chromatographie aus dem *E. coli*-Rohextrakt gereinigt werden konnte. Im Vergleich zum Rohextrakt enthält beispielsweise die Elutionsfraktion 16 (Abb. 25, Spur 6) nach der Gelfiltration nur noch eine prominente Proteinbande. Die kleinere Nebenbande mit einer Größe von 42 kDa, die in den Spuren 4-8 zu sehen ist, ist der MBP-Tag alleine, der entweder von *E. coli* einzeln synthetisiert oder während des Reinigungsprozesses abgetrennt wurde. Die 1,0 ml-Elutionsfraktionen 16-18 (jeweils ca. 1,5 mg/ml Proteingehalt) wurden an die Firma INBIOS zur Immunisierung von zwei Kaninchen weitergegeben.

5.10.2 Klonierung, Expression und Reinigung von MCC α (AS 402-643)

Die cDNA für MCC α (AS 402-643) wurde in den *E. coli* Expressionsvektor pGEX-3X subkloniert, da eine Klonierung in pMAL-c2X scheiterte. pGEX-3X erzeugt Fusionsproteine mit einem aminoterminalen Gluthation-S-Transferase (GST)-Tag, wobei der Tag eine molekulare Masse von 26 kDa aufweist. Mit dem Primerpaar *MCCA_AKpGEX-3XBamHI/MCCA_AKpGEX-3XEcoRI* wurde der entsprechende *MCCA*-cDNA-Abschnitt amplifiziert und in pGEX-3X kloniert. Nach Transformation

von *E. coli* BL21 RIL Zellen mit dem Expressionsvektor, konnten die GST-Fusionsproteine nach Zugabe von 1 mM IPTG exprimiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass die GST-Fusionsproteine nach der Überexpression fast ausschließlich als *Inclusion Bodies* vorlagen (Abb. 26).

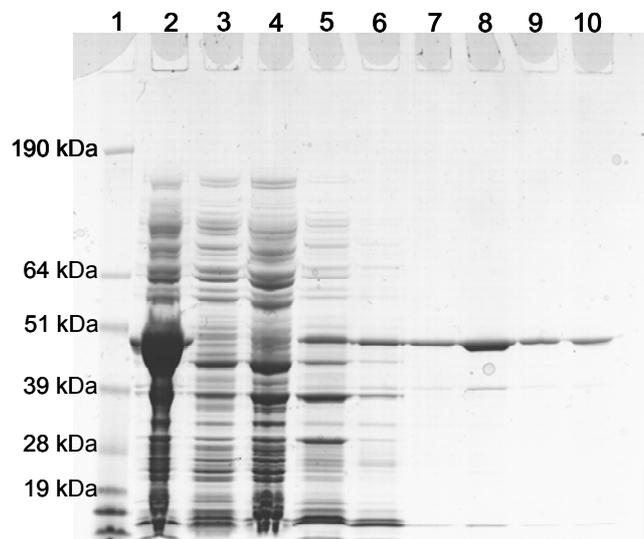


Abb. 26: Gelauftrag unterschiedlicher Aliquots von GST-MCC α (AS 402-643) während der Präparation von Inclusion Bodies. Spur 1: SeeBlue Molekulargewichtsstandard, Spur 2: Pellet des *E. coli* Rohextraktes 6 h nach Induktion, Spur 3: ÜS des Rohextraktes 6 h nach Induktion, Spur 4: ÜS des Rohextraktes nach Sonifizieren und Abzentrifugieren, Spur 5: Überstand nach 1. Waschen der Inclusion Bodies, Spur 6: Überstand nach dem 2. Waschen der Inclusion Bodies, Spur 7: GST- MCC α nach Refolding Buffer, Spur 8: Pellet nach Abzentrifugieren des Solubilisierungspuffers, Spur 9: GST-MCC α nach Dialyse gegen PBS, Spur 10: nach Aufkonzentrieren mit den Amicon YM 10 Rörchen.

Die *Inclusion Bodies* wurden nach einem Protokoll, das im Methodenteil unter 4.4.15 näher erläutert wird, aus *E. coli* isoliert und solubilisiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde über Nacht gegen PBS dialysiert. Abbildung 26 zeigt, dass das MCC α (AS 402-643) nach der Präparation aus den *Inclusion Bodies* hoch gereinigt vorliegt, da im Gelbild nur eine deutliche Proteinbande (Abb. 26, Spur 9/10) zu sehen ist. Allerdings weisen die bisher präparierten Proteinlösungen nach Aufkonzentrierung lediglich eine Konzentration von maximal 1 mg/ml auf. Da im Anschluss noch eine Gelfiltration zur weiteren Anreicherung durchgeführt werden soll, wird derzeit an der Optimierung der Präparation gearbeitet. Die Expression von GST-MCC α (AS 402-643) in *E. coli* und die Präparation aus *Inclusion Bodies* lieferten die Grundlagen für die Herstellung reiner MCC α -Antigenpeptide für die Synthese polyklonaler AK in Kaninchen.

5.11 Biochemische und genotypische Charakterisierung von Individuen mit 3-MCC-Mangel

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung von Individuen mit bestätigtem 3-MCC-Mangel. Durch die Analyse des Genotyps sowie des biochemischen und klinischen Phänotyps der Betroffenen sollten Erkenntnisse über die Bedeutung des Enzyms und des sich beim Menschen manifestierenden Enzymdefekts gewonnen werden. Die Zusammenschau der gewonnenen Daten sollte eine Aussage über eine mögliche Korrelation von Genotyp und Phänotyp, sowie über das Vorhandensein bestimmter „Krankheitsmarker“ ermöglichen.

5.11.1 Identifizierung des 3-MCC-Mangels durch das erweiterte Neugeborenen-Screening in Bayern

Zwischen Januar 1999 und Dezember 2004 wurden in Bayern 677 852 Neugeborene durch das NGS untersucht.

Die Diagnosestellung eines 3-MCC-Mangels erfolgte durch den Nachweis erhöhter 3-HIVA-Konzentrationen im Vollblut, gefolgt von mindestens einer Kontrollmessung in Vollblut bzw. Plasma. Zusätzlich wurde eine Analyse der organischen Säuren im Urin durchgeführt. Ein Biotinidase-Mangel wurde in allen Fällen ausgeschlossen. In dieser Population wurden 8 Neugeborene (5 Mädchen, 3 Jungen) mit eindeutigem 3-MCC-Mangel identifiziert. Diese Zahlen entsprechen einer Inzidenz von 1:84.700. Durch Familien-Screening konnten zusätzlich zwei ältere Geschwisterkinder (1 Mädchen, 1 Junge) und 4 Mütter gefunden werden.

Aus dieser Gruppe von Individuen, die direkt oder indirekt durch das bayerische NGS identifiziert worden waren, wurden 11 Probanden (6 Neugeborene, 2 Geschwisterkinder, 3 Mütter) weiter analysiert.

Zusätzlich wurde eine Gruppe von 17 Individuen (8 Neugeborene, 2 Geschwisterkinder, 6 Mütter und 1 Kind aus dem Hochrisiko-Screening) mit 3-MCC-Mangel untersucht, deren Proben aus anderen Teilen Deutschlands, Österreichs und Südaustraliens zugesandt worden waren. Mehr Informationen über das Probanden-Kollektiv können im Materialteil unter 3.14 nachgelesen werden.

5.11.2 Mutationsanalyse von 28 Individuen mit bestätigtem 3-MCC-Mangel

Für eine Mutationsanalyse wurde bei allen 28 Patienten der komplette kodierende Bereich der Gene *MCCA* und *MCCB* sequenziert. Für die Analysen auf cDNA-Ebene wurde RNA aus Hautfibroblasten oder aus Leukozyten isoliert und durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Für die Amplifikation der *MCCA*-cDNA wurden zwei Primer-Paare verwendet. Mit dem ersten Paar wurde der Bereich der 5'UTR bis Exon 11, mit dem zweiten Paar die Sequenz von Exon 11 bis zur 3'UTR amplifiziert. Die cDNA von *MCCB* konnte durch ein Primerpaar, lokalisiert in der 5'UTR und 3'UTR, vermehrt werden. Um Mutationen auf genomischer DNA-Ebene bestätigen zu können, wurde gDNA aus peripheren Leukozyten isoliert. Die PCR-Amplifikationen der kompletten codierenden Regionen wurden mit Intron-Primern durchgeführt. Diese Primer wurden derart gestaltet, dass sie die Exone, Exon-Intron-Übergänge und kurze angrenzende Intronbereiche amplifizieren. Für die Sequenzierung der cDNA und gDNA von *MCCA* und *MCCB* wurde Cycle Sequencing, beruhend auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (Sanger et al., 1977), unter der Anwendung des Big Dye v3.1 Cycle Sequencing Kits der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Sämtliche Primer und PCR-Bedingungen, die für die Amplifikation und Sequenzierung von cDNA und gDNA verwendet wurden, sind im Materialteil unter 3.9 aufgeführt.

5.11.3 Das Spektrum der *MCCA*- und *MCCB*-Mutationen

Im Zuge der Genotypisierung der 28 Probanden konnten 30 unterschiedliche Mutationen identifiziert werden (15 in *MCCA* und 15 in *MCCB*). Diese umfassten 7 Spleißstellen-Mutationen (3 in *MCCA*, 4 in *MCCB*), 5 Nonsense-Mutationen (3 in *MCCA*, 2 in *MCCB*), 2 kleine Deletionen in *MCCA*, 2 kleine Insertionen in *MCCB* und 14 Missense-Mutationen (7 in *MCCA*, 7 in *MCCB*). Bei 22 der 30 Mutationen handelte es sich um, zu diesem Zeitpunkt, unbekannte Sequenzveränderungen (10 in *MCCA*, 12 in *MCCB*; siehe Tabellen 4 und 5). Diese neuen und in der Literatur bereits beschriebene Mutationen sind in Abbildung 27 zusammenfassend dargestellt. Das Nomenklatorsystem der Mutationen richtet sich nach den Empfehlungen von S. Antonarakis (Antonarakis, 1998). Die Mutationen in *MCCA* und *MCCB* zeigen ein sehr heterogenes Bild und sind fast gleichmäßig über die Exone beider Gene verteilt.

Ein Genabschnitt, der besonders häufig von Mutationen betroffen ist, lässt sich nicht erkennen. Auch konnte keine einzelne Mutation herausgearbeitet werden, die in der Bevölkerung besonders häufig auftritt. Bei Betrachtung der Abbildung wird zusätzlich deutlich, dass bisher keine Mutationen in den Targetingsequenzen der beiden Untereinheiten gefunden wurden. Nur 8 der 30 Mutationen (5 in *MCCA*, 3 in *MCCB*) wurden bereits beschrieben. 6 dieser Sequenzvarianten (c.559C>T, c.1604C>T und c.2079delA in *MCCA*; c.512-1G>A, c.518dupT und c.803G>C in *MCCB*) wurden in Individuen mit 3-MCC-Mangel gefunden, die einen klinisch milden Phänotyp zeigen (Baumgartner et al., 2001, Holzinger et al., 2001). Die Mutation c.1527C>A in *MCCA* wurde sowohl in Individuen mit milden als auch in Personen mit schweren Symptomen gefunden. Die Variante c.1155A>C in *MCCA* wurde bisher in 2 Patienten identifiziert, wobei einer schwer betroffen war, während der zweite Patient nicht näher beschrieben wurde (Baumgartner et al., 2001, Gallardo et al., 2001, Dantas et al., 2005).

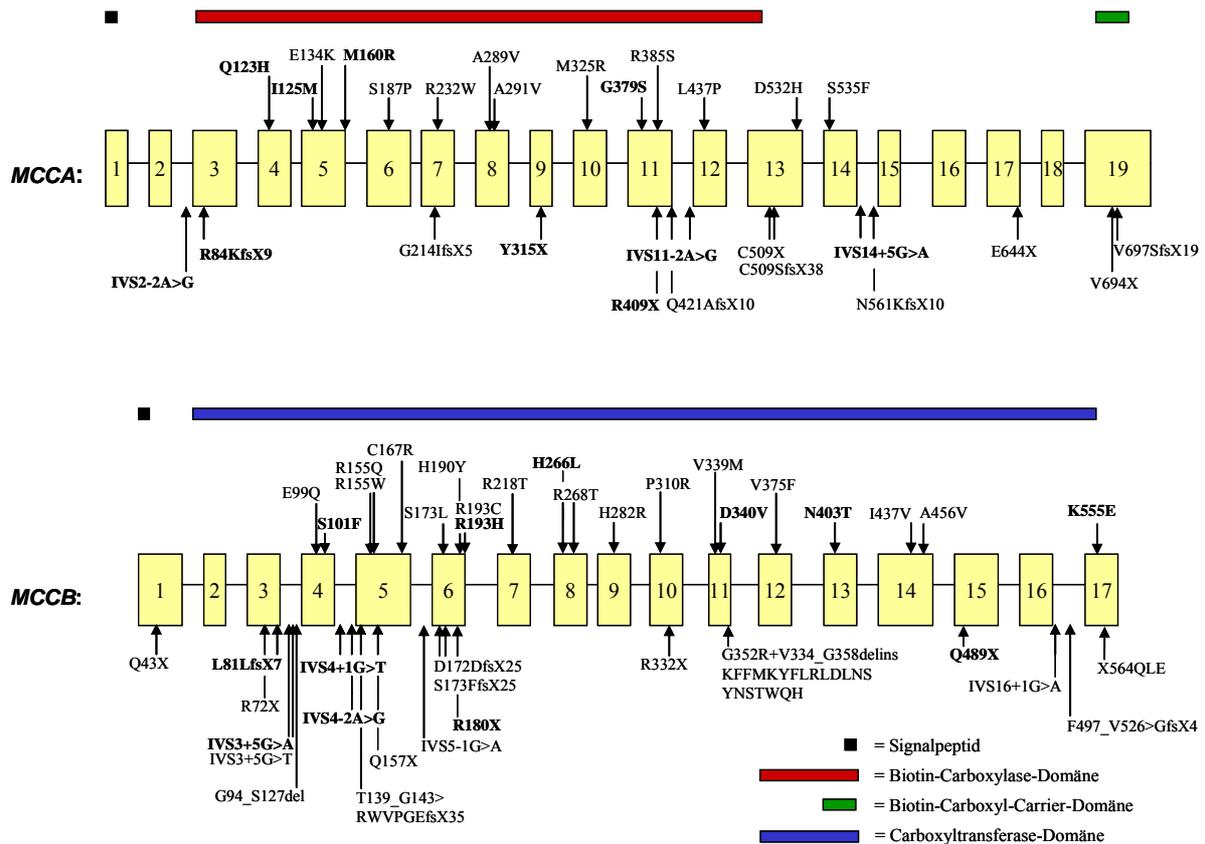


Abb. 27: Mutationsspektrum der Gene *MCCA* und *MCCB*. Die schematische Darstellung der genomischen Strukturen zeigt die ungefähre Größe und die Anzahl der Exone von *MCCA* und *MCCB*. Nach unten gerichtete Pfeile repräsentieren Missense-Mutationen. Nach oben gerichtete Pfeile repräsentieren Nonsense-Mutationen, Insertionen, Deletionen und Spleißstellen-Mutationen. Die fettgedruckten Mutationen sind Allel-Varianten, die in dieser Arbeit neu entdeckt wurden. Die Lage der Biotin-Carboxylierungs-Domäne, der Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne, der Carboxyltransferase-Domäne und der mitochondrialen Signalpeptide relativ zu den codierenden Bereichen von *MCCA* und *MCCB* wird ebenfalls gezeigt. Die Informationen zur Erstellung dieser Darstellung wurden der Human Gene Mutation Database (HGMD) in Cardiff (<http://www.hgmd.org>), Baumgartner et al., 2001, Holzinger et al., 2001, Gallardo et al., 2001, Dantas et al., 2005, Baykal et al., 2005 und dem ExPASy Proteomics Server (*MCCA* Q96RQ3; *MCCB* Q9HCC0, <http://www.expasy.org>) entnommen.

5.11.4 Mutationen im *MCCA*-Gen

Die gefundenen Mutationen im *MCCA*-Gen umfassen 3 Spleißstellen-Mutationen, 3 Nonsense-Mutationen, 2 kleine Deletionen und 7 Missense-Mutationen (Tabelle 4). Bei 10 davon handelt es sich um neu entdeckte Mutationen.

Proband	Mutation	Lokalisation	Konsequenz auf Proteinebene	Art der Mutation
20-A-m	c.137-2A>G	IVS2	Inkorrektes Spleißen	Spleißstelle
11-A-m	c.1268-2A>G	IVS11	Verlust der Exone 11/12	Spleißstelle
04-A-n 02-A-n	c.1681+5G>A	IVS14	Verlust des Exons 14	Spleißstelle
16-A-m	c.945T>A	Exon 9	p.Y315X	Nonsense
16-A-m	c.1225C>T	Exon 11	p.R409X	Nonsense
12-A-n	c.1527C>A	Exon 13	p.C509X	Nonsense
23-A-hr	c.2079delA	Exon 19	p.V694X	Nonsense
19-A-m	c.250_251delAG	Exon 3	p.R84KfsX9	kleine Deletion
21,A-n	c.369G>C	Exon 4	p.Q123H	Missense
17-A-n	c.375C>G	Exon 5	p.I125M	Missense
03-A-n1,n2	c.479T>G	Exon 5	p.M160R	Missense
09-A-n	c.559T>C	Exon 6	p.187P	Missense
17-A-n	c.1135G>A	Exon 11	p.G379S	Missense
02-A-n	c.1155A>C	Exon 11	p.R385 S	Missense
05-A-n	c.1604C>T	Exon 14	p.S535F	Missense

Tabelle 4: Identifizierte Mutationen im *MCCA*-Gen bei der Genotypierung von 28 Probanden (n=15). Es wurden 10 neue Mutationen entdeckt, welche fettgedruckt sind. Die Numerierung der Mutationen auf cDNA-Ebene basiert auf dem Genbank-Eintrag AF310972 (*MCCC1/MCCA*), wobei +1 für das A des ATG Startcodons steht.

c=cDNA-Ebene; p=Proteinebene; fs=frame-shift; X=vorgezogenes Stoppcodon;
IVS=angrenzende Intronbereiche mit Spleiß-Consensussequenzen

Die Spleißstellen-Mutationen c.137-2A>G, c.1268-2A>G und c.1681+5G>A führen zu Veränderungen in den hochkonservierten Spleiß-Consensussequenzen und beeinträchtigen somit das korrekte Prozessieren der mRNA. c.1268-2A>G führt zu einem Verlust der Exone 12 und 13. Die Mutation c.1681+5G>A zieht den Verlust des Exons 14 nach sich. Für c.137-2A>G konnte kein Verlust eines Exons nachgewiesen werden, da keine RNA für eine Transkript-Analyse zur Verfügung stand. Bei c.945T>A und c.1225C>T handelt es sich um neue Nonsense-Mutationen, die beide ein frühzeitiges Stoppcodon (premature termination codon, PTC) induzieren.

Die kleine Deletion c.250_251delAG verursacht eine Leserasterverschiebung innerhalb der kodierenden Sequenz und führt zu einem vorgezogenen Stoppcodon neun Aminosäuren nach der Deletion (R84KfsX9). mRNAs, die vorgezogene Stoppcodons enthalten, werden von einer mRNA-Qualitätskontrolle erfasst und in einem so genannten nonsense mediated decay (NMD) pathway abgebaut (Culbertson, 1999, Frischmeyer und Dietz, 1999). Somit kann angenommen werden, dass Nonsense-Mutationen schwerwiegende Auswirkungen auf die Proteinbio-

synthese haben. Die 4 Missense-Mutationen führen zum Austausch einzelner Aminosäure-Reste. Die Sequenz-Varianten c.369G>C, c.375C>G, c.479T>G und c.1135G>A betreffen Aminosäuren, die innerhalb der Biotin-Carboxylierungs-Domäne lokalisiert sind. Alignments mit den AS-Sequenzen anderer Spezies zeigen, dass alle diese Mutationen Aminosäuren verändern, die beispielsweise in *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana* und *Aspergillus nidulans* hochkonserviert sind (siehe Proteinalignment im Anhang 9.2.1).

5.11.5 Mutationen im *MCCB*-Gen

Durch die Sequenzanalysen der *MCCB*-Gene konnten insgesamt 15 Mutationen aufgedeckt werden (4 Spleißstellen-Mutationen, 3 Nonsense-Mutationen, 1 kleine Insertion und 7 Missense-Mutationen). 12 dieser Sequenz-Varianten waren bis dahin unbekannt. Sie umfassen 3 Spleißstellen-Mutationen, 2 Nonsense-Mutationen, 1 kleine Insertion und 6 Missense-Mutationen (Tabelle 5).

Proband	Mutation	Lokalisation	Konsequenz auf Proteinebene	Art der Mutation
06-B-m	c.281+5G>A	IVS3	Inkorrektes Spleißen	Spleißstelle
07-B-m	c.383+1G>T	IVS4	Inkorrektes Spleißen	Spleißstelle
22-B-n	c.384-2A>G	IVS4	Inkorrektes Spleißen	Spleißstelle
08-B-m	c.512-1G>A	IVS5	Inkorrektes Spleißen	Spleißstelle
14-B-m	c.518dupT	Exon 6	p.S173FfsX4	Nonsense
13-B-n	c.538C>T	Exon 6	p.R180X	Nonsense
01-B-n,s	c.1465C>T	Exon 15	p.Q489X	Nonsense
18-B-n 08-B-m	c.243dupT	Exon 3	p.L81LfsX7	kleine Insertion
18-B-n	c.302C>T	Exon 4	p.S101F	Missense
22-B-n	c.578G>A	Exon 6	p.R193H	Missense
13-B-n	c.979A>T	Exon 8	p.H266L	Missense
01-B-n,s	c.1019A>T	Exon 11	p.D340V	Missense
06-B-m	c.1208A>C	Exon 13	p.N403T	Missense
14-B-m	c.1663A>G	Exon 17	p.K555E	Missense
10-B-n	c.803G>C	Exon 8	p.R268T	Missense

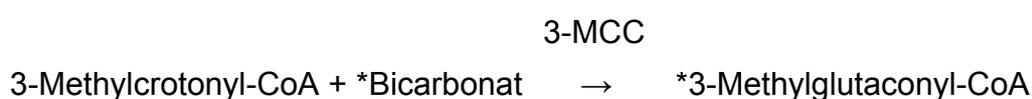
Tabelle 5: Aufgedeckte Mutationen in *MCCB* (n=15). Bei 12 dieser Mutationen handelt es sich um neue Mutationen. Diese sind fettgedruckt. Die Numerierung der Mutationen auf cDNA-Ebene basiert auf dem Genbank-Eintrag AF310971 (*MCCC2/MCCB*), wobei +1 für das A des ATG Startcodons steht. c=cDNA-Ebene; p=Proteinebene; fs=frame-shift; X=vorgezogenes Stoppcodon; IVS=angrenzende Intronbereiche mit Spleiß-Consensussequenzen; dup=Duplikation

Bei den Spleißstellen-Varianten c.281+5G>A, c.383+1G>T, c.384-2A>G ist zu erwarten, dass diese die hochkonservierten Spleiß-Consensussequenzen und somit das korrekte Spleißen der mRNA beeinträchtigen. Leider stand keine RNA für eine Transkript-Analyse zur Verfügung, so dass eine experimentelle Bestätigung des veränderten mRNA-Spleißens ausbleiben musste. Die beiden neuen Nonsense-Mutationen c.538C>T und c.1465C>T generieren vorzeitige Stoppcodons (R180X und Q489X) und führen so zu verkürzten, fehlerhaften mRNA-Sequenzen. Die Insertion c.243dupT im Exon 3 verursacht eine Verschiebung des Leserahmens, so dass es sieben Aminosäurereste nach der Insertion zu einem vorgezogenen Stoppcodon kommt (L81LfsX7). Für die Untereinheit MCC β ist bekannt, dass diese zum größten Teil von der Carboxyltransferase-Domäne eingenommen wird. Nach Angaben des ExPASy Proteomic Servers (www.expasy.org) umfasst diese Domäne die Aminosäuren 69-561. Vorzeitige Stoppcodons in diesem Bereich führen zu einem Funktionsverlust dieser Untereinheit. Bei c.302C>T, c.578G>A, c.979A>T, c.1019A>T, c.1208A>C und c.1663A>G handelt es sich um 6 neue Missense-Mutationen im *MCCB*-Gen, die die Substitution einzelner Aminosäurereste nach sich ziehen. Die ersten fünf Mutationen betreffen Aminosäurereste, die in *Mus musculus* und *Arabidopsis thaliana* hoch konserviert sind (siehe Proteinalignment im Anhang 9.2.2).

5.11.6 Messung der in vitro 3-MCC-Aktivität in Patienten-Fibroblasten

Um die funktionellen Auswirkungen der identifizierten Mutationen in *MCCA* und *MCCB* auf das Enzym erfassen zu können, wurde ein 3-MCC-Aktivitäts-Assay durchgeführt. Die Erfassung der Enzym-Restaktivität in Patienten-Fibroblasten sollte mögliche Rückschlüsse auf den Schweregrad einer Mutation erlauben.

Der 3-MCC-Assay beruht auf der Inkorporation von $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$ in das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA durch eine biotinabhängige, ATP-verbrauchende Carboxylierung. Dabei wird [^{14}C]-markiertes, nichtflüchtiges 3-Methylgutaconyl-CoA erzeugt.



Kultivierte Patienten-Fibroblasten wurden geerntet, in Lysepuffer aufgenommen und sonifiziert, um die Mitochondrien aufzuschließen. Dem nun freigesetzten Enzym

wurde ein Substrat-Reaktionsgemisch bestehend aus ATP, Glutathion, $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$ und dem Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA angeboten. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde überschüssiges, nicht im Reaktionsprodukt Methylglutaconyl-CoA fixiertes $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$ durch Ansäuerung mit 15%iger Ameisensäure ausgetrieben. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit konnte die in den Proben verbliebene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen werden. Zusätzlich wurden Kontrollansätze, welchen kein 3-Methylcrotonyl-CoA zugegeben worden war (Leerwerte), mitgeführt. Die genaue Durchführung des Enzym-Tests wird im Methodenteil unter 4.4.3 beschrieben.

Um eine Linearität des Enzym-Tests gewährleisten zu können, wurden die optimale Inkubationszeit und die optimale Proteinkonzentration der Fibroblasten-Lysate experimentell ermittelt.

Für die Inkubation der Zellextrakte mit dem Reaktionsansatz wurde eine Zeit von 90 Minuten als optimal betrachtet. Abbildung 28A zeigt, dass bis zu diesem Zeitpunkt die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung proportional zur Inkubationszeit zunimmt.

Bei Variation der eingesetzten Proteinmenge (1,0 bis 3,5 mg/ml) zeigte sich (Abb. 28B), dass die gemessene Radioaktivität bis zu einer Konzentration von 3,0 mg/ml stetig zunahm, danach jedoch eine Hemmung der $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung auftrat. Für die Messung der Enzymaktivitäten in Patienten-Fibroblasten wurden Proteinkonzentrationen zwischen 1,0 und 2,0 mg/ml eingesetzt. Diese Konzentrationen liegen im linearen Bereich des Enzymtests. Das Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA wurde in einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Höhere Konzentrationen erbrachten in durchgeführten Tests keinen vermehrten Einbau an $\text{H}[^{14}\text{C}]\text{O}_3^-$.

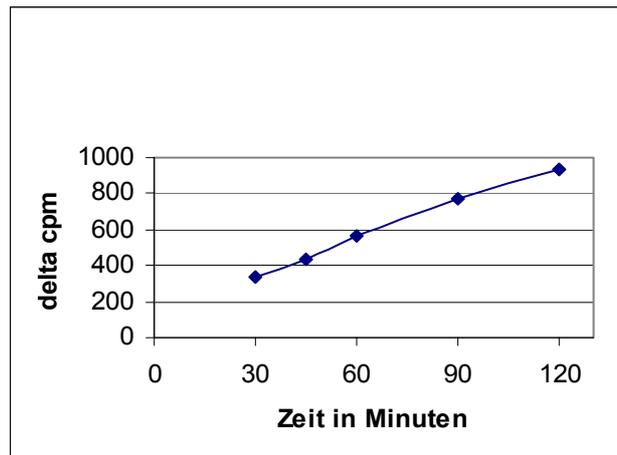


Abb. 28A: Abhängigkeit des $\text{H}^{14}\text{C}\text{O}_3^-$ -Einbaus in 3-Methylcrotonyl-CoA von der Inkubationszeit: Auf der x-Achse ist die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen. Die verbliebene Radioaktivität nach Abzug der cpm-Werte der mitgeführten Leerwert-Kontrollen ist auf der y-Achse aufgetragen (delta cpm).

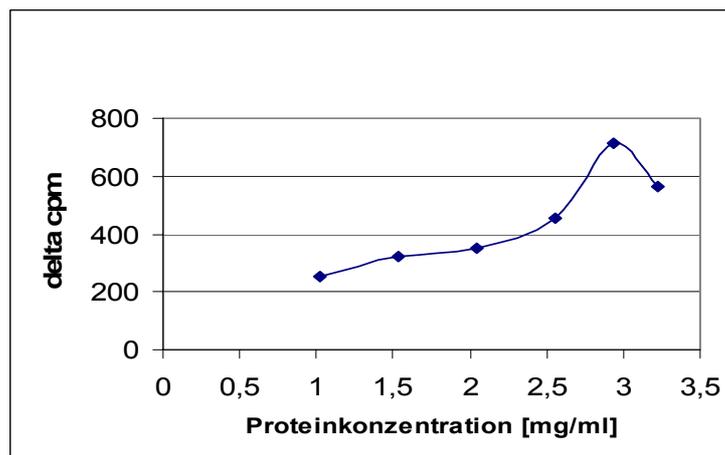


Abb. 28B: Abhängigkeit des $\text{H}^{14}\text{C}\text{O}_3^-$ -Einbaus in 3-Methylcrotonyl-CoA von der Proteinkonzentration: Die eingesetzte Proteinkonzentration ist auf der x-Achse in mg/ml aufgetragen. Die Inkubationszeit dieses Experiments betrug jeweils 90 min. Die verbliebene Radioaktivität nach Abzug der cpm-Werte der mitgeführten Leerwert-Kontrollen ist auf der y-Achse aufgetragen (delta cpm).

Der in vitro 3-MCC-Assay konnte für Patienten nur durchgeführt werden, wenn Fibroblasten zur Verfügung standen. Alle Reaktionen wurden in Duplikaten, einmal mit und einmal ohne Zugabe von Biotin (5 μM), durchgeführt, um eine mögliche Biotinabhängigkeit auszuschließen. Die spezifische Aktivität der 3-MCC in Patienten wurde in Picomol des fixierten $\text{H}^{14}\text{C}\text{O}_3^-/\text{mg Protein} \times \text{min}$ ausgedrückt und im Prozentanteil zur mitgeführten WT-Kontrolle angegeben.

Proband	Spez. 3-MCC-Aktivität in % zur WT-Kontrolle
02-A-n	2,5
10-B-n	5,8
01-B-n	3,0
04-A-n	2,3
09-A-n	12,0
01-B-s	2,4
15-A-m	9,2

Tabelle 6: Spezifische 3-MCC-Aktivitäten in Patienten-Fibroblasten. Die Aktivität wird ausgedrückt im Prozentanteil zur Wildtyp-Kontrolle.

Die Messung nach Zugabe von Biotin zeigte in keinem Fall eine signifikante Änderung der 3-MCC-Aktivität. Die Enzymaktivitäten der Individuen 05-A-n, 03-A-n1, 11-A-m, 07-B-m wurden in anderen Stoffwechselzentren gemessen.

Das Spektrum aller gemessenen spezifischen 3-MCC-Aktivitäten reichte von 71 bis 178 Picomol fixiertes $H[^{14}C]O_3^-/mg$ Protein \times min (Mittel $119,1 \pm 25,8$; $n=22$, CV 21,7%). Die Schwankung innerhalb einer Messreihe lag bei $118,8 \pm 18,7$ ($n=6$, CV 15,7%). Die spezifischen Enzymaktivitäten der Probanden lagen zwischen 0-13% der Kontrollwerte.

5.11.7 Gegenüberstellung der Genotypen und biochemischen bzw. klinischen Phänotypen der untersuchten Individuen

Für eine möglichst umfassende biochemische Charakterisierung der untersuchten Individuen wurden die Acylcarnitin-Profile im Blut, der Grad der Erhöhung (moderat, massiv) der organischen Säuren im Urin und, sofern gemessen, die spezifische 3-MCC-Aktivität in Fibroblasten herangezogen (Tabelle 7).

Diesen Werten wurde der Genotyp der Probanden gegenübergestellt, um eine mögliche Korrelation zwischen Genotyp und biochemischen Phänotyp aufdecken zu können (Tabelle 7). Die 28 Probanden wurden in drei Gruppen eingeteilt und nach absteigenden Konzentrationen an 3-HIVA-C im Blut (gemessen bei Diagnosestellung) sortiert. Die erste Gruppe bestand aus 14 Neugeborenen (9 Mädchen, 5 Jungen), die durch das NGS identifiziert worden waren (Altersspanne:

1,75-6,5 Jahre). In Gruppe 2 wurden 4 ältere Geschwisterkinder (1 Mädchen, 3 Jungen), die durch das Familien-Screening entdeckt worden waren zusammengefasst (Alter: 5,5-12,25 Jahre). Die dritte Gruppe bestand aus 9 Müttern (Altersspanne: 22-38 Jahre), die gefunden wurden, da ihre gesunden Neugeborenen durch zunächst pathologische NGS-Proben aufgefallen waren. Zusätzlich wurde ein siebenjähriger Junge analysiert, der durch das Hochrisiko-Screening identifiziert worden war. Mehr als zwei Drittel der Probanden waren deutscher oder türkischer Abstammung (10 Probanden in jeder Gruppe).

Alle Individuen dieser Kohorte zeigten einen charakteristischen biochemischen Phänotyp in Bezug auf 1) die Akkumulation der typischen Metabolite im Blut (3-HIVA-C und das Verhältnis von 3-HIVA-C/Propionylcarnitin), 2) im Urin (3-HIVA und 3-MCG) und 3) deutlich verminderter 3-MCC-Aktivität (gemessen, sofern Fibroblasten zur Verfügung standen). Die 3-HIVA-C Konzentrationen der Erwachsenen (Mittel: 22,2 $\mu\text{mol/l}$; Range 1,4-40,5 $\mu\text{mol/l}$) waren signifikant höher als die der Neugeborenen (Mittel: 13,1 $\mu\text{mol/l}$; Range 1,8- 37,1 $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0,1$ Mann-Whitney-U-Test). Abgesehen von drei Ausnahmen konnte bei allen Probanden eine massive Erhöhung der organischen Säuren 3-HIVA und 3-MCG im Urin beobachtet werden. Ein Neugeborenes (09-A-n) und eine Mutter (14-B-m) zeigten lediglich moderate Erhöhungen, während bei einer Mutter (08-B-m) nur eine milde Exkretion von 3-MCG alleine nachweisbar war. Eine Mutter (20-A-m) wurde nicht analysiert.

Obwohl alle Individuen den typischen biochemischen Phänotyp aufwiesen und für zwei veränderte Allele identifiziert werden konnten, waren alle 28 Probanden klinisch asymptomatisch, bis auf drei Ausnahmen: Der siebenjährige Junge (23-A-hr), der wegen einer milden Sprachentwicklungsverzögerung untersucht worden war, und zwei Mütter (06-B-m, 11-A-m) mit milder Muskelschwäche. Die Mutter 11-A-m berichtete zusätzlich von Essstörungen in ihrer Kindheit.

Die Hälfte aller Probanden in unserer Kohorte wies homozygote Mutationen auf (6 Neugeborene, 2 Geschwisterkinder, 5 Mütter, 1 Kind aus dem Hochrisiko-Screening). Untersuchungen zur Familiengeschichte zeigten, dass alle homozygoten Neugeborenen, alle Geschwister und 2 von 5 Müttern von konsanguinen Eltern abstammen. In 6 Familien konnte die Vererbung der untersuchten Allel-Varianten durch Sequenzanalyse der betroffenen Exone oder Introne in beiden Elternteilen bestätigt werden (01-B, 02-A, 03-A, 05-A, 08-B und 10-B). Bei Familie 12-A konnte nur eine

Mutation in der Mutter verifiziert werden, da keine Proben des Vaters zur Verfügung standen.

Die Evaluation der Allel-Varianten in Bezug auf die biochemischen und anamnestischen Daten der Probanden erbrachte keine offensichtliche Korrelation mit dem biochemischen oder klinischen Phänotyp. Eine Einteilung der betroffenen Individuen in Subgruppen bezüglich (1) der Art der Mutationen, (2) des Grades der biochemischen Veränderungen oder (3) des klinischen Phänotyps war nicht möglich.

PROBAND ^a	3- HIVA- C ^b	3- HIVA- C/C ^{3c}	MCC % ^d	MUTATION ALLEL 1	LOKALI- SATION	KONSEQUENZ AUF PROTEIN- EBENE	MUTATION ALLEL 2	LOKALI- SATION ^e	KONSEQUENZ AUF PROTEIN- EBENE	ETHNISCHE ZUORDNUNG
22-B-n	37.1	3.0	n.b.	c.384-2A>G	IVS 04 (B)	Def. Spleißen	c.578G>A	Ex 06 (B)	p.R193H	Deutsch
02-A-n	35.0	16.0	2.5	c.1155A>C	Ex 11 (A)	p.R385S	c.1683+5G>A	IVS 14 (A)	Verlust Exon 14	Deutsch
21-A-n ^f	21.9	29.2	n.b.	c.369G>C	Ex 04 (A)	p.Q123H	c.369G>C	Ex 04 (A)	p.Q123H	Syrnisch
12-A-n ^f	20.0	5.7	n.b.	c.1527C>A	Ex 13 (A)	p.C509X	c.1527C>A	Ex 13 (A)	p.C509X	Kurdisch
17-A-n	11.6	24.2	n.b.	c.1135G>A	Ex 11 (A)	p.G379S	c.375C>G	Ex 05 (A)	p.I125M	Deutsch/Burkin.
18-B-n	11.6	19.7	n.b.	c.302C>T	Ex 04 (B)	p.S101F	c.243dupT	Ex 03 (B)	p.L81LfsX7	Deutsch
10-B-n ^f	11.0	11.2	5.8	c.803G>C	Ex 08 (B)	p.R268T	c.803G>C	Ex 08 (B)	p.R268T	Türkisch
05-A-n	10.1	15.7	0.0	c.1604C>T	Ex 14 (A)	p.S535F	c.2079delA	Ex 19 (A)	p.V694X	Türkisch
03-A-n2 ^f	7.4	2.3	n.b.	c.479T>G	Ex 05 (A)	p.M160R	c.479T>G	Ex 05 (A)	p.M160R	Türkisch
01-B-n	5.8	2.2	3.0	c.1019A>T	Ex 11 (B)	p.D340V	c.1465C>T	Ex 15 (B)	p.Q489X	Deutsch/Italien.
13-B-n	3.2	0.5	n.b.	c.538C>T	Ex 06 (B)	p.R180X	c.979A>T	Ex 08 (B)	p.H266L	Deutsch
04-A-n ^f	3.2	3.0	2.3	c.1681+5G>A	IVS 14 (A)	Verlust Exon 14	c.1681+5G>A	IVS 14 (A)	Verlust Exon 14	Deutsch
09-A-n	2.6	5.1	12.0	c.559T>C	Ex 06 (A)	p.S187P	c.1155>C	Ex 11 (A)	p.R385S	Deutsch
03-A-n1 ^f	1.8	17.6	0.0	c.479T>G	Ex 05 (A)	p.M160R	c.479T>G	Ex 05 (A)	p.M160R	Türkisch
01-B-s	18.4	16.0	2.4	c.1019A>T	Ex 11 (B)	p.D340V	c.1465C>T	Ex 15 (B)	p.Q489X	Deutsch/Italien.
10-B-s2 ^f	17.0	34	n.b.	c.803G>C	Ex 08 (B)	p.R268T	c.803G>C	Ex 08 (B)	p.R268T	Türkisch
10-B-s1 ^f	14.0	23.3	n.b.	c.803G>C	Ex 08 (B)	p.R268T	c.803G>C	Ex 08 (B)	p.R268T	Türkisch
05-A-s	9.4	28.0	n.b.	c.1604C>T	Ex 14 (A)	p.S535F	c.2079delA	Ex 19 (A)	p.V694X	Türkisch
11-A-m	40.5	44.1	13.0	c.1268-2A>G	IVS 11 (A)	Verlust Ex. 12/13	c.1268-2A>G	IVS 11 (A)	Verlust Ex. 12/13	Italienisch
15-A-m ^f	37.5	93.8	9.2	c.1527C>A	Ex 13 (A)	p.C509X	c.1527C>A	Ex 13 (A)	p.C509X	Kurdisch
07-B-m ^f	34.2	67.6	0.0	c.383+1G>T	IVS 04 (B)	Def. Spleißen	c.383+1G>T	IVS 04 (B)	Def. Spleißen	Türkisch
19-A-m	25.4	65.1	n.b.		Ex 03 (A)	p.R84KfsX9		Ex 03 (A)	p.R84KfsX9	Türkisch
16-A-m	21.5	n.m.	n.b.	c.945T>A	Ex 09 (A)	p.Y315X	c.1225C>T	Ex 11 (A)	p.R409X	Deutsch
08-B-m	14.5	17.2	n.b.	c.243dupT	Ex 03 (B)	p.L81LfsX7	c.512-1G>A	IVS 05 (B)	Def. Spleißen	Deutsch
20-A-m	14.4	50.1	n.b.	c.137-2A>G	IVS 02 (A)	Def. Spleißen	c.137-2A>G	IVS 02 (A)	Def. Spleißen	Russisch
06-B-m	10.5	7.5	n.b.	c.281+5G>A	IVS 03 (B)	Def. Spleißen	c.1208A>C	Ex 13 (B)	p.N403T	Deutsch
14-B-m	1.4	1.5	n.b.	c.518dupT	Ex 06 (B)	p.S173FfsX4	c.1663A>G	Ex 17 (B)	p.K555E	Deutsch
23-A-hr ^f	61.0	17.3	n.b.	c.2079delA	Ex 19 (A)	p.V694X	c.2079delA	Ex 19 (A)	p.V694X	Türkisch

Tabelle 7: Zusammenstellung der genotypischen und biochemischen Daten von 28 analysierten Probanden mit 3-MCC-Mangel.

^aAlle Probanden sind asymptomatisch, mit Ausnahme von 11-A-m und 06-B-m mit milder Muskelschwäche und 23-A-hr mit milder Sprachentwicklungsverzögerung. Alle zeigten eine massive Erhöhung der organischen Säuren 3-HIVA und 3-MCG bis auf 09-A-n und 14-B-m mit je moderater Erhöhung und 08-B-m mit einer milden Exkretion von 3-MCG alleine. 20-A-m wurde nicht analysiert. ^b3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin-Konzentration im Blut, ausgedrückt in $\mu\text{mol/l}$; 99,5te Perzentile = 0,51 $\mu\text{mol/l}$. ^cVerhältnis von 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin- zu Propionyl-Carnitin-Konzentrationen im Blut, jeweils ausgedrückt in $\mu\text{mol/l}$; 99,5te Perzentile = 0,33. ^dSpezifische Aktivität von 3-MCC in Hautfibroblasten [$\text{Picomol } [^{14}\text{C}] \text{ fixiertes Bicarbonat/mg Protein} \times \text{min}$], ausgedrückt in Prozent zur Kontrolle. ^e(A) repräsentiert *MCCA*, (B) repräsentiert *MCCB*. ^fKinder konsanguiner Eltern.

5.11.8 Klinische Phänotypen bisher beschriebener Individuen mit 3-MCC-Mangel (Literaturanalyse) und Vergleich mit der hier analysierten Kohorte

Der 3-MCC-Mangel wurde 1982, wie bereits erwähnt, durch Beemer et al. erstmals beschrieben. Von 1982 bis heute wurde von 31 Individuen mit enzymatisch bestätigtem 3-MCC-Mangel berichtet, die nicht durch das NGS, sondern durch klinische Symptome diagnostiziert worden waren. Sechs Individuen wurden durch Familienuntersuchungen identifiziert (Tabelle 8). Zusätzlich wurden in der Literatur innerhalb der letzten 24 Jahre 21 weitere Personen mit diesem Enzymdefekt beschrieben, die allerdings nicht näher klinisch charakterisiert wurden (Baumgartner et al., 2004, Gallardo et al., 2001, Dantas et al., 2005, Holzinger et al., 2001).

Ziel der Literaturanalyse war es, unsere Kohorte der 28 Probanden mit dieser Gruppe klinisch auffälliger Patienten zu vergleichen, um mögliche Korrelationen zu erkennen bzw. Krankheitsmarker zu identifizieren, die bei der bisher schwierigen Beratung betroffener Familien hinsichtlich der pathologischen Relevanz und der voraussichtlichen Prognose nützlich sein könnten.

Vier der 37 (17 Mädchen, 20 Jungen) publizierten Individuen, welche inzwischen fast vollständig molekulargenetisch aufgeklärt worden sind, verstarben in einem Alter von 33 Tagen (Hirnödem, respiratorische Insuffizienz) (Baykal et al., 2005), 11 Monaten (Herz-Kreislaufversagen nach prolongiertem Krampfanfall) (Bannwart et al., 1992), 26 Monaten (Hirnödem) (Kobori et al., 1989, Jurecki and Packman, 1992) und 40 Monaten (Todesursache nicht berichtet) (Dodelson de Kremer et al., 2002). Dies entspricht einer Letalität von circa 10%. Der Tod eines Patienten im Alter von 6,5 Monaten scheint nicht in direktem Zusammenhang mit dem 3-MCC-Mangel zu stehen (Herzstillstand nach versehentlicher Obstruktion des Endotracheal-Tubus) (Wiesmann et al., 1998). Neun Kinder (Beemer et al., 1982, Kobori et al., 1989, Tsai et al., 1989, Jurecki and Packman, 1992, Mourmans et al., 1995, Pearson et al., 1995, Ihara et al., 1997) und ein Erwachsener (Visser et al., 2000) zeigten keinerlei

klinische Auffälligkeiten (27%). Eine große Subgruppe entwickelte milde, zumeist neurologische Symptome.

Die Zeitpunkte der Erstmanifestation klinischer Symptome liegen relativ gleichmäßig verteilt zwischen dem ersten Lebenstag (Bannwart et al., 1992, Murayama et al., 1997, Wiesmann et al., 1998) und dem Alter von 4,7 Jahren (Beemer et al., 1982). Laborchemisch finden sich im Rahmen kataboler Krisen (fiebrhafte Infekte, Gastroenteritiden oder Fastenperioden) Hypoglykämien, milde, teils ketotische metabolische Azidosen und vereinzelt Hyperammonämien (Layward et al., 1989, Tsai et al., 1989). Häufig zu beobachten sind Bewusstseinsstörungen, die sich bis zu einem Koma entwickeln können (Beemer et al., 1982, Bartlett et al., 1984, Gitzelmann et al., 1987, Rolland et al., 1991, Pearson et al., 1995, Lehnert et al., 1996, Visser et al., 2000, Baykal et al., 2005). Generell stehen neurologische Symptome wie muskuläre Hypotonie, psychomotorische Retardierung und Krampfanfälle im Vordergrund. Zwei der berichteten Patienten mussten nach einem Atemstillstand intubiert werden (Bartlett et al., 1984, Layward et al., 1989).

	OHNE SYMPTOME	VERSTORBEN	HYPO-GLYKÄMIE	MILDE VERÄNDERUNG DER BLUTGASE	HYPER-AMMONÄMIE	GEDEH-STÖRUNG	MUSKULÄRE HYPOTONIE	PSYCHO-MOTOR-RETARDIERUNG	CEREBR. KRAMPF-ANFÄLLE	ANDERE NEUROLOGISCHE SYMPTOME
n ^a	10	4	7	5	2	5	11	12	6	18
% ^b	27.0	10.8	18.9	13.5	5.4	13.5	29.7	32.4	16.2	48.6
Ref ^c	Beemer et al., 1982, Gibson et al., 1998, Ihara et al., 1997, Kobori et al., 1989, Jurecki et al., 1992, Mourmans et al., 1995, Peerson et al., 1995, Tsai et al., 1989, Visser et al., 2000	Banmyant et al., 1992, Kobori et al., 1989, Jurecki et al., 1992, Dodelson de Kemmer et al., 2002, Baykal et al., 2005	Bartlett et al., 1984, Gitzelmann et al., 1987, Kobori et al., 1989, Lajward et al., 1989, Lajward et al., 1989, Tsai et al., 1989	Bartlett et al., 1984, Beemer et al., 1982, Gitzelmann et al., 1987, Kobori et al., 1989, Lajward et al., 1989, Baykal et al., 2005	Tsai et al., 1989, Lajward et al., 1989	Elpeleg et al., 1992, Mervais et al., 1997, Wisserman et al., 1998, Visser et al., 2000, Dodelson de Kemmer et al., 2002	Banmyant et al., 1992, Bartlett et al., 1984, Elpeleg et al., 1992, Gitzelmann et al., 1987, Wisserman et al., 1998, Dodelson de Kemmer et al., 2002, Baykal et al., 2005	Banmyant et al., 1992, Lehnert et al., 1996, Mourmans et al., 1995, Murayama et al., 1997, Steen et al., 1999, Visser et al., 2000, Yan et al., 1998, Dodelson de Kemmer et al., 2002, Baykal et al., 2005	Banmyant et al., 1992, Lehnert et al., 1996, Murayama et al., 1997, Steen et al., 1999, Tsai et al., 1989	Kobori et al., 1989, Peerson et al., 1995, Banmyant et al., 1992, Bartlett et al., 1984, Beemer et al., 1982, Gitzelmann et al., 1987, Lehnert et al., 1996, Mouryama et al., 1997, Rolland et al., 1991, Steen et al., 1999, Tschman et al., 1993, Visser et al., 2000, Wisserman et al., 1998, Dodelson de Kemmer et al., 2002, Baykal et al., 2005

Tabelle 8: Klinische Variabilität von 37 Individuen mit klinisch und nicht durch das NGS diagnostiziertem 3-MCC-Mangel. Die Beschreibung der Betroffenen findet sich in der Literatur der letzten 20 Jahre. ^aZahl der Patienten, ^bProzentanteil der Patienten bezogen auf n = 37, ^cReferenzen

Bei einem Mädchen wurde eine Kardiomyopathie festgestellt (Visser et al., 2000), vier Patienten zeigten eine Gehirnatrophie (Murayama et al., 1997, Steen et al., 1999, Baumgartner et al., 2004, Baykal et al., 2005) und zwei Kinder entwickelten Zeichen einer Leukodystrophie (Dodelson de Kremer et al., 2002, Baykal et al., 2005). Einzelne Individuen zeigten Fettablagerungen in der Leber (Kobori et al., 1989, Layward et al., 1989) oder in der Muskulatur (Elpeleg et al., 1992).

An dieser Stelle muss einschränkend betont werden, dass aufgrund der jetzt bekannten hohen Inzidenz von milden Phänotypen kein Symptom mit Sicherheit kausal dem Enzymdefekt zugeordnet werden kann. Der Vergleich der publizierten, klinisch diagnostizierten Patienten (n=37) mit unserer Kohorte (n=28) erbrachte keine erkennbaren Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich des Mutationstyps, der Höhe der akkumulierenden Metabolite, der Enzym-Restaktivität und der Schwere der klinischen Symptomatik. Aufgrund der überraschend hohen Inzidenz scheint der 3-MCC-Mangel eine sehr milde Störung mit überwiegend asymptomatischem Verlauf zu sein.

6. Diskussion

Die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase wurde innerhalb der vergangenen 47 Jahre aus verschiedenen tierischen Geweben isoliert und untersucht (Del Campillo-Campbell et al., 1959, Lau, 1979, Lau et al., 1980, Bixel und Hamprecht, 2000, Baumgartner et al., 2001). Anhand dieser Studien konnte gezeigt werden, dass 3-MCC am L-Leucin-Stoffwechsel beteiligt ist, aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten besteht ($MCC\alpha$ und $MCC\beta$) und im Mitochondrium lokalisiert ist. 2001 gelang die Klonierung der humanen cDNA-Sequenzen der Gene *MCCA* und *MCCB* (Holzinger et al., 2001, Baumgartner et al., 2001, Gallardo et al., 2001). Dies war der Startschuss für detaillierte Studien an rekombinant exprimierten Untereinheiten der humanen 3-MCC.

Dennoch waren bis heute mitochondriale Signalpeptide, die die Untereinheiten zu ihrem Bestimmungsort dirigieren, sowie deren Position und Länge nicht detailliert untersucht worden. Auch über den Importmechanismus und die genaue Lokalisation der Untereinheiten in den Mitochondrien gab es bisher keine experimentell bestätigten Erkenntnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untereinheiten der humanen 3-MCC hinsichtlich dieser Fragestellungen untersucht und erste grundlegende Erkenntnisse zu mitochondrialen Targetingsequenzen, zum Importmechanismus und zur exakten Lokalisation gewonnen. Unter Einbeziehung der Charakterisierung des Genotyps und des biochemischen bzw. klinischen Phänotyps von Individuen mit isoliertem 3-MCC-Mangel konnten Hinweise zur Bedeutung des Enzyms und der assoziierten Erkrankung beim Menschen gewonnen werden.

6.1 Alignments aminoterminaler Abschnitte von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ verschiedener Spezies

Das klassische mitochondriale Targetingsignal ist eine aminoterminal spaltbare Präsequenz, die als Matrix-Signalpeptid fungiert (Pfanner und Geissler, 2001). Für eine subkompartimentäre Lokalisation der 3-MCC in der mitochondrialen Matrix gab es mehrere Indizien wie beispielsweise die Beteiligung des Enzyms am Abbau der

verzweigt-kettigen AS L-Leucin, der nach der Entstehung von 2-Oxoisocaproinsäure in der mitochondrialen Matrix stattfindet (Hutson und Rannels, 1985).

Das Alignment aminoterminaler Abschnitte von MCC α und MCC β verschiedener Spezies konnte durch Sequenzvergleiche Hinweise auf mögliche aminoterminalen Präsequenzen der humanen Untereinheiten liefern (Abb. 10A/10B). Für die Sequenzvergleiche wurden neben *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana* und *Agrobacterium tumefaciens* ausgewählt. Die aminoterminalen MCC α -Abschnitte von *H. sapiens* und *M. musculus* zeigten sehr hohe Homologie, während der Vergleich mit *A. thaliana*, einem Organismus der phylogenetisch weiter entfernt ist, zeigte, dass der Grad der Konservierung deutlich geringer ist. Dies ist für mitochondriale Targetingsignale nicht untypisch, da diese häufig wenig konserviert sind. Sie besitzen kein streng konserviertes Aminosäuremotiv, sondern zeichnen sich durch das Zusammenwirken von hydrophoben und positiv geladenen Aminosäuren aus, die eine amphipathische α -Helix bilden können (Abe et al., 2000, Roise et al., 1986). Bei *A. tumefaciens* war kein aminoterminaler Abschnitt zu finden, der Homologie zu MCC α von *H. sapiens* zeigte. Dies ist durch die fehlende Subkompartimentierung der Prokaryonten zu erklären, die auf das Sortieren von Proteinen durch Signalpeptide verzichten können. Zusätzlich deutet das Fehlen dieses Abschnitts darauf hin, dass dieser Bereich für die Funktionalität des Enzyms nicht von Bedeutung ist. Der Bereich hoher Homologie in den AS-Sequenzen aller erwähnten Spezies beginnt ab AS 49. Hier wird auch der Start der Biotin-Carboxylierungsdomäne postuliert, die in allen Spezies hoch konserviert ist (Jitrapakdee und Wallace, 2003). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse deutlich auf ein aminoterminales Signalpeptid in der humanen MCC α -Untereinheit hin. Die Homologiestudien der MCC β -Untereinheiten ergaben ein ähnliches Bild, wobei hier nicht eindeutig ein Anfangspunkt hoher Homologie festgelegt werden konnte, was plausibel ist, da die Carboxyltransferase-Domäne der β -Untereinheit generell weniger stark konserviert ist (Jitrapakdee und Wallace, 2003). Doch auch hier zeigten die aminoterminalen Abschnitte von *H. sapiens* und *M. musculus*, im Vergleich zu *A. thaliana*, noch relativ ausgeprägte Homologie, während dieser Bereich bei *A. tumefaciens* nicht zu entdecken war. Dies stellt einen weiteren Hinweis für eine aminoterminalen Positionierung der Präsequenzen dar.

6.2 MCC α -Myc-His- und MCC β -Myc-His-Fusionsproteine werden in die Mitochondrien humaner Hautfibroblasten importiert

Weitere Charakterisierungen der beiden Enzym-Untereinheiten sollten zunächst durch die Expression in eukaryontischen Systemen erreicht werden. Für die geplante Durchführung eines in vitro Import-Assays mit isolierten Hefemitochondrien wurden eukaryontische Expressionskonstrukte erstellt. Die Wahl fiel auf den Vektor pcDNA3.1/Myc-His, mit dessen Hilfe Fusionsproteine mit carboxyterminalem Myc-His-Tag generiert wurden. Dieser Expressionsvektor besitzt außerdem einen T7-Promotor, der für die geplante in vitro Translation im Retikulozytenlysat genutzt werden sollte.

Die Funktionalität der erstellten MCC α - und MCC β -pcDNA3.1/Myc-His-Konstrukte wurde mittels Kolokalisationsstudien in humanen Hautfibroblasten überprüft (Abb.11). Der Vektor pcDNA3.1/Myc-His erwies sich als geeignetes Werkzeug für die Expression von MCC α - und MCC β -Fusionsproteinen in HF1/D3 Hautfibroblasten. Die transiente Transfektion der Zellen mit der Technik der Magnetofektion erzielte aussagekräftige Ergebnisse. Im Vergleich zu Vorversuchen mit Lipofektamin als Transfektionsreagenz, welches eine höhere Toxizität gegenüber Fibroblasten zeigte, konnten die Zellen sehr viel schneller und schonender transfiziert werden, was für die Vitalität der Zellen von großem Vorteil war.

Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Antikörper für den Nachweis von MCC α und MCC β zur Verfügung standen, wurden Maus-Antikörper gegen den Myc-His-Tag verwendet. Durch die Anwendung sekundärer FITC-konjugierter anti-Maus-Antikörper konnten die überexprimierten Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Mitochondrien der Hautfibroblasten wurden durch MitoTracker[®]Red angefärbt. Dieser Farbstoff geht eine Bindung mit den Thiolgruppen mitochondrialer Proteine ein und emittiert bei Anregung rotes Licht. Anhand der Immunfluoreszenz-Versuche konnte gezeigt werden, dass die MCC α - und MCC β -Fusionsproteine überexprimiert und in die Mitochondrien eingeschleust werden. Es gab keine transfizierten Zellen, die diffuse cytoplasmatische Signale fehlgeleiteter Fusionsproteine oder fehlerhafter MitoTracker[®]Red-Anfärbung zeigten. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die exprimierten 3-MCC-Untereinheiten intakte mitochondriale Signalpeptide besitzen, die von der

Importmaschinerie erkannt werden und für die Translokation in das Organell sorgen. Die Funktionalität der *MCCA*- bzw. *MCCB*-cDNA-Konstrukte war somit bestätigt.

6.3 Mitochondrialer in vitro Import-Assay der Untereinheiten $MCC\alpha$ und $MCC\beta$

Mit der Durchführung eines in vitro Import-Assays mit isolierten Hefemitochondrien konnte gezeigt werden, dass $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ in die mitochondriale Matrix importiert werden (Abb. 12A/12B). In diesem Versuch wurden Aliquots der im Retikulozyten-Lysat hergestellten Untereinheiten nach der Inkubation mit Hefemitochondrien einer Proteinase K-Behandlung, mit oder ohne Zerstörung der äußeren Membran durch hypotone Schwellung, ausgesetzt. Die Tatsache, dass $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ auch noch nach Abbau der äußeren Mitochondrienmembran und nach Degradierung der Proteine des Intermembranraums aus den Hefemitochondrien isoliert werden konnten, spricht für den Transfer der Untereinheiten in die mitochondriale Matrix. Die Lokalisation in der Matrix schützte die Untereinheiten vor der Proteinase K-Behandlung. Als Versuchskontrolle wurden Immunoblot-Analysen der Markerproteine CCPO (Intermembranraum), Aco1 und Hsp70 (Matrix) aus denselben Hefemitochondrien mitgeführt. Der Import von $MCC\alpha$ und $MCC\beta$ fand nur in Anwesenheit des Membranpotentials $\Delta\psi$ der inneren Mitochondrienmembran statt, was den membranpotentialabhängigen Importmechanismus belegt, der für mitochondriale Matrixproteine charakteristisch ist (Martin et al. 1991). Die importierten Moleküle zeigten im Proteingel im Vergleich zu den Präproteinen deutlich geringere molekulare Massen, was das Vorhandensein von prozessierbaren Signalpeptiden aufzeigte. Die meisten Matrixproteine besitzen aminoterminal Präsequenzen (Pfanner und Geissler, 2001), die nach dem Einschleusen in die Matrix durch das Enzym MPP (mitochondrial processing peptidase) abgespalten werden (Hawlitshchek et al., 1988). Mit diesem Experiment konnte allerdings nicht bewiesen werden, dass die Signalpeptide aminoterminal lokalisiert sind.

6.4 Native Reinigung von MCC α und MCC β aus humanem Nierengewebe

Die Ergebnisse des in vitro Import-Assays hatten bewiesen, dass die 3-MCC-Untereinheiten mitochondriale Signalpeptide besitzen.

Nach dem Einschleusen mitochondrialer Proteine in die Matrix werden diese durch die MPP (mitochondrial processing peptidase) prozessiert (Hawlitsek et al., 1988). Erst nach Abspaltung des aminoterminalen Signalpeptids falten sich die Peptide in ihren aktiven Zustand. Vermutlich findet die Assemblierung der Untereinheiten MCC α und MCC β auch erst nach Prozessierung und vollendeter Faltung statt. Zusätzlich war aus Expressionsstudien der PCC in *E. coli* bekannt, dass sich die Untereinheiten effizient exprimieren lassen, wenn diese ohne mitochondriale Präsequenzen kloniert werden (Kelson et al, 1996). Eine Hypothese ist, dass die Signalpeptide, die in *E. coli* keine Funktion erfüllen, zur Fehlfaltung des überexprimierten Proteins führen könnten. Für die geplante Expression von MCC α und MCC β in *E. coli* sollten also die exakten Aminotermini der Untereinheiten durch aminoterminaler Edman-Degradierung bestimmt werden, um eine möglichst effiziente Proteinsynthese erzielen zu können. Für diesen Zweck wurden MCC α und MCC β aus humanem Gewebe isoliert und gereinigt. Die Anreicherung von Mitochondrien mittels differentieller Zentrifugation des homogenisierten Nierengewebes in Sucrose-Puffer sollte sicherstellen, dass hauptsächlich prozessierte 3-MCC-Peptide isoliert werden. Für die Reinigung von MCC α und MCC β wurde humanes Nierengewebe verwendet, da die Untereinheiten in diesem Gewebe stark exprimiert werden (Sweetman und Williams, 1995). Unter Anwendung von Streptavidin, welches an magnetische Beads gekoppelt vorlag, konnten nicht nur die biotinhaltigen α -Untereinheiten von 3-MCC und PCC, sondern ganze Enzymkomplexe gereinigt werden. Dies spricht für eine direkte Interaktion zwischen den jeweiligen α - und β -Untereinheiten von 3-MCC und PCC. Um diese Interaktion auszunutzen, musste die Proteinreinigung unter nativen Bedingungen stattfinden. Ein Verlust der Interaktion durch Denaturierung sollte daher verhindert werden. Aufgrund der hohen Homologie der AS-Sequenzen der mitochondrialen Paraloge ist es theoretisch möglich, dass die α -Untereinheit von 3-MCC mit der β -Untereinheit von PCC interagiert, und umgekehrt. Bisher wurde allerdings in der Literatur noch nie von einer Assemblierung dieser Art berichtet. Eine so geartete Interaktion würde vermutlich zu einem Enzymkomplex mit einer stark

vermindertern Substratspezifität führen. Um ausreichende Mengen an möglichst reinen biotinhaltigen Enzymen zu erhalten, war es notwendig, mehrere Reinigungsansätze gleichzeitig durchzuführen.

6.5 Identifizierung von MCC α und MCC β durch die Kombination von 2D-Gelelektrophorese und PMF-MALDI-Massenspektrometrie

Die gereinigten biotinhaltigen Proteine der Mitochondrienfraktion und des Gesamtzellextraktes aus humanem Nierengewebe wurden mittels 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese durch ihre unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (Dimension 1) und ihre unterschiedlichen molekularen Massen (Dimension 2) voneinander getrennt. Die zweidimensionale Gelelektrophorese erreicht nach dem derzeitigen Stand der Technik das höchste Auflösungsvermögen für komplexe Proteingemische. Neben der Mitochondrienfraktion wurde der Gesamtzellextrakt analysiert, da die Effizienz der Mitochondrien-Anreicherung und der daraus gereinigten Proteine nicht abschätzbar war. Die silbergefärbten Proteingele zeigten (Abb. 13/14), dass die Fraktionen nach der Isolierung über das Streptavidin-System rein genug waren, um einzelne prominente Proteinspots zu erkennen. Auf den Gelbildern war außerdem zu sehen, dass die Fraktionen der Gesamtzellextrakte stärkere Anreicherungen einzelner Spots zeigten. Dies lässt darauf schließen, dass die Mitochondrien zu einem großen Teil bereits im Laufe der differentiellen Zentrifugation aufgeschlossen wurden und somit ihren Inhalt an den Gesamtzellextrakt abgegeben hatten. Für eine effektive Anreicherung von Mitochondrien aus Nierengewebe müsste die Methode demnach so verbessert werden, dass die Organellen nicht schon während der Zentrifugationsschritte eröffnet werden. Dies könnte durch Anwendung eines Isolierungspuffers, der neben Sucrose auch Mannitol, HEPES und BSA enthält, und schonendere Zentrifugationsschritte erreicht werden, wie sie von Schnaitman und Greenawalt beschrieben wurden (Schnaitman und Greenawalt, 1968).

Die Betrachtung der Proteinspots von MCC α und MCC β ließ erkennen, dass diese innerhalb Ketten mehrerer hintereinander liegender Spots vorlagen. Dieses Beispiel macht deutlich, wie informativ die Analyse von Proteinen durch 2D-PAGE sein kann. Die Kettenbildung der Proteinspots kann beispielsweise durch das Vorliegen von Isoformen aufgrund von Trunkierungen bzw. Spleißvarianten entstehen (Missler und

Sudhof, 1998). Allerdings ist über Spleißvarianten von MCC α und MCC β , außer bedingt durch Mutationen, bisher nichts bekannt. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass posttranslationale Modifikationen der Grund für das häufige Phänomen der Spot-Kettenbildung sind. Im Falle von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β könnte es sich hierbei um unterschiedliche Phosphorylierungszustände handeln. Die Phosphorylierung stellt die häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen in eukaryontischen Systemen dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Enzymen in verschiedenen Stoffwechsel- oder Signaltransduktionsprozessen. Eine *in silico* Analyse des möglichen Phosphorylierungsgrades dieser Peptide mit dem Programm NetPhos des NetPhos 2.0 Servers der Technischen Universität Dänemark (www.cbs.dtu.dk) errechnete eine hohe Phosphorylierungswahrscheinlichkeit für zahlreiche Serin-, Threonin- und Tyrosinreste der vier Untereinheiten. Interessanterweise sind die Untereinheiten, bis auf einen Serinrest in MCC β , innerhalb der Targetingsequenzen nicht phosphoryliert. Vermutlich spielt die Phosphorylierung der Targetingsignale von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β keine Rolle für den Importmechanismus und für die Funktionalität der Enzyme, weshalb diese Proteinabschnitte nicht (oder nur kaum, wie im Falle von MCC β) phosphoryliert vorliegen.

Mit der Technik der PMF-MALDI-Massenspektrometrie konnte eine hervorragende Methode zur Aufklärung von Proteinen genutzt werden. Alle analysierten Spots konnten identifiziert ohne Behinderungen durch unvollständige Trypsinspaltung der Peptide oder unzureichende Ionisierung aufgrund von Suppressionseffekten.

Da die molekularen Massen der 3-MCC-Untereinheiten bekannt waren, wurden Proteinspots (sowohl aus der Mitochondrienfraktion als auch aus dem Gesamtzellextrakt) im Bereich zwischen 60 kDa und 85 kDa für einen Peptidmassenfingerprint ausgewählt. Im ersten Anlauf (Gelauftrag 230 μ g Gesamtproteinmenge) konnten die Proteinspots von PCC α , PCC β und MCC β in der Mitochondrienfraktion und im Gesamtzellextrakt identifiziert werden. Interessanterweise gab es in beiden Fraktionen keinen sichtbaren Proteinspot, der als MCC α hätte identifiziert werden können. Eigentlich sollte MCC β nur durch die Interaktion mit MCC α isoliert werden können, da nur die α -Untereinheit das kovalent gebundene Biotin trägt, womit im Streptavidin-System gereinigt wurde. Theoretisch müsste das bedeuten, dass MCC α zumindest in ähnlichen Mengen wie MCC β vorliegen sollte. Für den zweiten Versuch wurden 500 μ g, also mehr als die doppelte

Gesamtproteinmenge auf die 2D-Gele geladen, was zu einer erfolgreichen Identifizierung des Proteinspots von MCC α führte. Allerdings waren auch hier die Spots von MCC α weitaus weniger angereichert als die von MCC β . Vermutlich wurden die Komplexe aus MCC α und MCC β während der Reinigungsprozedur gelöst, und MCC α wurde stärker degradiert als MCC β . Dafür würde auch die Tatsache sprechen, dass MCC α ebenfalls in geringeren Mengen vorlag als MCC β . Nur die Fraktion des Gesamtzellextraktes enthielt ausreichend angereicherte Proteinspots für die PMF-MALDI-Analyse. Wie bereits erwähnt, wurde 3-MCC bereits aus mehreren tierischen Geweben isoliert und gereinigt. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass sich das Enzym auch unter Durchführung mehrerer Homogenisationsschritte nur schwer in den löslichen Zentrifugationsüberstand bringen ließ. Es wurde vermutet, dass 3-MCC mit der inneren Mitochondrienmembran verknüpft sei und deshalb nur partiell gelöst werden könnte, was jedoch nie experimentell belegt wurde (Lau et al., 1980, Hector et al., 1980, Bixel, 1998). Auch über die Art der postulierten Membranverknüpfung gibt es in der Literatur keine Aussagen. Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Das Enzym ließ sich ohne wiederholte Homogenisationsschritte und ohne Einsatz von Detergenzien, wie beispielsweise Triton X-100, in den löslichen Überstand überführen. Gegen eine Verknüpfung der humanen 3-MCC mit der inneren Mitochondrienmembran spricht ebenso, dass sich das Enzym nach der differentiellen Zentrifugation hauptsächlich im löslichen Gesamtzellextrakt befand. Wäre die humane 3-MCC tatsächlich in der inneren Mitochondrienmembran verankert, so hätte sie überwiegend in den partikulären Fraktionen der abzentrifugierten Mitochondrien oder Mitochondrienmembranen vorliegen müssen.

6.6 Aminoterninale Sequenzierung von MCC α und MCC β

Durch aminoterninale Sequenzierung konnte geklärt werden, dass das prozessierte MCC α -Peptid mit AS 42 und das gereifte MCC β -Peptid mit AS 23 beginnen. Auf diese Weise wurde erstmals gezeigt, dass die beiden Untereinheiten tatsächlich aminoterninale Signalpeptide besitzen, die nach dem Einschleusen in das Mitochondrium durch die MPP (mitochondrial processing peptidase) abgespalten werden. Diese Resultate sind kongruent mit den Ergebnissen von Dr. Roman Polanetz, welcher im Rahmen seiner Dissertationsarbeit zeigen konnte, dass das

Signalpeptid von MCC α innerhalb der ersten 39 AS und das von MCC β innerhalb der ersten 20 AS lokalisiert sein muss (Polanetz, 2006, Stadler et al., 2005). Um die Position und Länge der Signalpeptide eingrenzen zu können, wurden in seinen Studien Fusionsproteine aus aminoterminalen Abschnitten der Untereinheiten und dem Reporterprotein YFP (yellow fluorescent protein) generiert. Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch in vivo Kolokalisationsstudien auf ihre subzelluläre Lokalisierung hin untersucht. Die aminoterminalen Abschnitte der Fusionsproteine wurden so lange sukzessive verkürzt, bis sich keine Kolokalisation mit gegengefärbten Mitochondrien mehr zeigte. Aus dieser Arbeit ging auch hervor, dass weder MCC α noch MCC β weitere interne Signalpeptide enthalten. Die Aminotermini von PCC α und PCC β wurden ebenfalls bestimmt, um einen Vergleich der Signalpeptide ermöglichen zu können. Hier ergab sich, dass das gereifte PCC α mit der AS 28 beginnt und somit die Präsequenz deutlich kürzer ist als die von MCC α . PCC β beginnt nach dem Abspalten des Signalpeptids mit AS 29. Bisher wurde die Spaltstelle der humanen PCC α -Untereinheit nach AS 25 vermutet. Für PCC β wurden die AS 30 und 31 als Schnittstelle postuliert (Kelson et al., 1996). Die Signalpeptide von MCC α und PCC α besitzen abgesehen von wenigen übereinstimmenden AS keine Ähnlichkeit. Die Präsequenzen von MCC β und PCC β zeigen lediglich innerhalb der ersten acht aminoterminalen AS große Übereinstimmung (siehe Proteinalignments im Anhang 9.2.3/9.2.4).

Für die Kupplungsreaktion des Edman-Abbaus muss eine freie Aminogruppe am N-Terminus des Proteins vorhanden sein. Etwa 50% aller natürlich vorkommenden Proteine weisen allerdings eine aminoterminalen Modifikation auf (Acetylierung, Formylierung etc.). Eine Blockierung kann auch unbeabsichtigt durch die Art der Proteinreinigung oder Probenvorbereitung entstehen. Die problemlose aminoterminalen Sequenzierung von MCC α , MCC β , PCC α und PCC β spricht gegen eine Blockierung durch natürlich vorkommende oder artifiziell erzeugte Modifikationen.

Für die Edman-Degradierung wurden die aufgetrennten Proteine aus der Gesamtzellextrakt-Fraktion verwendet, da diese, wie oben bereits erwähnt, konzentriertere Proteinspots enthielten. Wie kann man sich erklären, dass sich in dieser Fraktion nur prozessierte Untereinheiten befanden, die man eigentlich ausschließlich in der Mitochondrien-Fraktion erwarten würde? Zum einen ist dies durch die mangelhafte Mitochondrienanreicherung zu erklären, die dazu geführt hat, dass ein großer Teil der Mitochondrien bereits während der Prozedur aufgeschlossen

wurde. Zum anderen ist bekannt, dass die nicht-komplexierten Untereinheiten der mitochondrialen Carboxylasen sehr empfindlich und instabil sind, wenn sie sich nicht im intakten Zellsystem befinden (Lau et al., 1980, Kelson et al., 2002, Bixel und Hamprecht, 2000). Es ist anzunehmen, dass die Präproteine, die noch nicht in das Mitochondrium transportiert, prozessiert und dort komplexiert wurden, der Degradation während des Trennungs- und Reinigungsprozesses zum Opfer fallen. Außerdem spricht die Tatsache, dass nur prozessierte Peptide sequenziert wurden, dafür, dass die Biotinylierung erst im Mitochondrium stattfindet und somit nur gereifte Untereinheiten über Streptavidin isoliert werden konnten.

6.7 Rekombinante Expression und Reinigung von MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen

Die erfolgreiche Identifizierung der Aminotermini wurde für die Herstellung prokaryontischer Expressionskonstrukte genutzt. MCC α und MCC β wurden ohne die mitochondrialen Signalpeptide in den Vektor pMAL-c2X kloniert. Dieser Vektor erzeugt Fusionsproteine mit einem aminoterminalen MBP-Tag (MBP=maltose binding protein, 42 kDa). Für den MBP-Tag wurde gezeigt, dass dieser die Löslichkeit, Stabilität und auch die korrekte Faltung der überexprimierten Fremdproteine in *E. coli* unterstützen kann (di Guan et al., 1988, Kapust und Waugh, 1999). Da in der Literatur bei Reinigungen der 3-MCC-Untereinheiten aus tierischen Geweben und der PCC-Untereinheiten aus *E.coli* berichtet wurde, dass die Untereinheiten sehr leicht degradiert werden können, sollte hier der stabilisierende Effekt des MBP-Tags ausgenutzt werden. Zusätzlich sollte der Tag die Reinigung von MCC β erleichtern, da dieses nicht über Biotin angereichert werden kann und Antikörper für eine Immunaффinitätsreinigung nicht zur Verfügung standen. Die MBP-Tags sollten nach den Reinigungsschritten durch Faktor Xa von den Untereinheiten getrennt werden.

Die Untereinheiten konnten mit den MBP-Tags erfolgreich in *E. coli* BL21 RIL-Zellen exprimiert werden. Die Zugabe von 5 μ M Biotin zum LB-Medium sollte die Biotinylierung der MCC α -Untereinheit gewährleisten, wie es bereits in *E. coli*-Expressionsstudien mit PCC erfolgreich durchgeführt worden war (Kelson et al., 1996). Die Analyse hergestellter Rohextrakte im Proteingel zeigte die überexprimierten MBP-Fusionsproteine in den erwarteten Größen. Ein

durchgeführter 3-MCC-Radio-Enzymassay, bei welchem jeweils 0,5 mg Protein der MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Rohextrakte eingesetzt wurden, zeigte keine Enzymaktivität an. Vermutlich findet in den *E. coli*-Rohextrakten keine Assemblierung der Untereinheiten statt, so dass diese noch vor der Komplexbildung degradiert werden.

6.8 In vitro Translation der Fusionsproteine MBP-MCC α und MBP-MCC β mit den Chaperoninen groES und groEL

Mit dem Versuch der in vitro Translation mit dem *E. coli* S30 Extract System für zirkuläre DNA sollte getestet werden, ob eine Assemblierung der Untereinheiten zu einem aktiven Enzymkomplex möglich ist, wenn diese simultan in einem kleinen Volumen translatiert werden, um eine Interaktion zu erleichtern und einer vorschnellen Degradierung entgegenzuwirken. Zusätzlich wurden die *E. coli* Chaperonine groES und groEL co-exprimiert. Analog zum mitochondrialen Hsp70-System unterstützen diese Chaperonine die Proteinfaltung und Assemblierung und wirken positiv auf die Menge der gebildeten Proteine ein (Goloubinoff et al., 1989, Bross et al., 1995, Kelson et al., 1996, Zheng et al., 1993, Saijo et al., 1994). Die in vitro Translation wurde zum Vergleich einmal mit und einmal ohne Zusatz des Plasmids pGroESL durchgeführt, welches die Chaperonine exprimiert. Die Analyse von Aliquots der Translationsprodukte durch SDS-PAGE zeigte, dass MBP-Fusionsproteine hergestellt wurden, wobei die Produktion von MBP-MCC α im Vergleich zu MBP-MCC β deutlich geringer ausfiel. Der Ansatz mit pGroESL erbrachte eine Produktionssteigerung der MBP-Fusionsproteine, obwohl hier weniger Plasmid-DNA der MBP-Konstrukte eingesetzt worden war. Somit konnte der positive Effekt von groES und groEL auf die Proteinmenge bestätigt werden. In den Gelbildern beider Ansätze war die Proteinbande des MBP-Tags diejenige, die am meisten Protein enthielt, was dafür spricht, dass in diesem System bevorzugt das kurze MBP hergestellt wird. Dies ist ein Phänomen, welches im Zusammenhang mit dem pMALc2-Expressionssystem häufig beobachtet wird. Denkbar ist auch, dass die Xa-Schnittstelle zwischen MBP-Tag und Proteinfragment ein häufiger Angriffspunkt für unbeabsichtigte hydrolytische Spaltung darstellt und somit vermehrt Spaltprodukte entstehen. Die restlichen Mengen der Translationsansätze wurden für die Durchführung eines 3-MCC-Aktivitätsassays (siehe Methoden 4.4.3) eingesetzt.

Es konnten keine Enzymaktivitäten gemessen werden. Eventuell stören die fusionierten MBP-Tags die Assemblierung der Untereinheiten zu einem aktiven Enzymkomplex. Für 3-MCC wird eine $(\alpha\beta)_6$ -Konformation vermutet (Lau et al., 1980). Bei einer molekularen Masse von MBP von 42 kDa ist vorstellbar, dass insgesamt 12 dieser Tags (sechs an MCC α und sechs an MCC β) zu einer Behinderung in der Komplexbildung führen können. Andererseits muss erwähnt werden, dass der 3-MCC-Enzymassay für die Messung in reinen Zellextrakten humaner Fibroblasten entwickelt wurde, und somit möglicherweise nicht für die Aktivitätsmessung rekombinant exprimierter Proteine geeignet ist. Da die Proteine im *E. coli* S30 System in weitaus höheren Konzentrationen vorliegen als in den Fibroblasten-Zellextrakten, ist von einem stöchiometrischen Ungleichgewicht von Substrat, ATP und Bicarbonat auszugehen. Dennoch wäre es vorstellbar, dass bei vorhandenen aktiven Enzymkomplexen zumindest eine minimale Enzymaktivität im Vergleich zu den Leer-Kontrollen messbar ist.

6.9 Affinitätsreinigung der MBP-Fusionsproteine und Abtrennen des MBP-Tags durch Faktor Xa

Die MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteine konnten durch eine Affinitätschromatographie erfolgreich aus den *E. coli* Rohextrakten gereinigt und angereichert werden (siehe 5.8.3; Abb. 19).

Nach der Reinigung sollten die MBP-Tags unter Einsatz der Protease Faktor Xa abgetrennt werden, um eine Assemblierung der Untereinheiten und somit eine Rekonstitution der 3-MCC-Aktivität zu ermöglichen. Dieses Vorhaben erwies sich als erfolglos, da bei jedem Versuch, die Tags vollständig abzuschneiden, die instabilen Untereinheiten degradiert wurden. Die Abtrennung der MBP-Tags konnte nur durch hohe Konzentrationen von Faktor Xa (bis zu 7% des Schneide-Ansatzes) und unter Zugabe von Detergenzien, die eine Entfaltung des Proteins ermöglichen sollten, erreicht werden. Unter anderem wurde die Verwendung von SDS (in den Konzentrationen 0,005% und 0,05% des Ansatzes), 1% Triton X-100 (v/v) und 3% N-Lauroylsucrosyl überprüft (v/v). Auch eine Änderung der Inkubationstemperatur und des Schneidepuffers brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die empfindlichen 3-MCC-Untereinheiten überstehen die Prozedur der proteolytischen Spaltung mit Faktor Xa offensichtlich nicht. Rückblickend muss man feststellen, dass sich das

MBP-System zwar positiv auf die Stabilität und Löslichkeit der exprimierten 3-MCC-Proteine auswirkt, sich aber nicht eignet, wenn dieser Tag, wie im Falle von MCC α und MCC β , von sehr empfindlichen Peptiden abgetrennt werden muss. Für Expressionsstudien in *E. coli* musste ein System gefunden werden, welches beide Untereinheiten ohne Importsequenzen und ohne Tag co-exprimiert. Diese simultane Expression ohne Tag wurde von Kelson et al. mit Hilfe des Expressionsvektors PinPoint-Xa in *E. coli* erfolgreich mit den Untereinheiten PCC α und PCC β durchgeführt (Kelson et al., 1996). Die Klonierung von MCC α und MCC β in diesen Vektor wird derzeit durchgeführt.

6.10 Generierung von Peptidantikörpern gegen MCC α und MCC β

Mit der Herstellung von polyklonalen Peptidantikörpern wurde eine Nachweismöglichkeit für rekombinant exprimierte MCC α - und MCC β -Proteine geschaffen. Wegen der monovalenten Bindung an Antigene bieten Peptidantikörper zwar nicht die Möglichkeit einer Immunpräzipitation, sind aber hinsichtlich der Antigenerkennung sehr spezifisch. Wie bereits beschrieben zeigen die biotinabhängigen mitochondrialen Carboxylasen eine hohe Homologie und besitzen hoch konservierte funktionelle Domänen. Speziell zwischen den Untereinheiten MCC α und PCC α ist diese Sequenzähnlichkeit stark ausgeprägt (siehe Proteinalignments im Anhang). Für die Synthese von Antigenpeptiden wurden deshalb Sequenzabschnitte von MCC α und MCC β ausgewählt, die möglichst geringe Homologie zu den AS-Sequenzen der mitochondrialen Paraloge PCC und PYC zeigen und keine hoch konservierten Abschnitte beinhalten. So sollten Kreuzreaktionen mit diesen Carboxylasen möglichst gering gehalten werden. Für MCC α wurden die AS-Abfolgen 178-190 und 698-710 ausgewählt. Bei MCC β fiel die Wahl auf die Sequenzen 185-198 und 484-497. Wenn in der AS-Sequenz carboxyterminal kein Cystein vorhanden war, so wurde dieses bei der Peptidsynthese durch die Firma INBIOS angefügt. Der Cystein-Rest wurde später für die Bindung an ein Gelmaterial für die Affinitätsreinigung der Peptidantikörper genutzt. Die Peptide wurden an den Carrier Ovalbumin gekoppelt. Jeweils zwei Kaninchen wurden mit einer äquimolaren Mischung der MCC α - bzw. MCC β -Peptide immunisiert. Alle erhaltenen Kaninchen-Antiseren zeigten im ELISA-Test hohe Antikörper-Titer (siehe ELISA-Tests im Anhang 9.5). Das Antiserum, das gegen die

MCC α -Peptide gerichtet war, reagierte sehr gut auf das Peptid MCC α AS 698-710 und auf das Gemisch beider Peptide, nicht aber auf MCC α AS 178-190 alleine. Dieses Peptid erwies sich als ungeeignetes Immunogen. Das Antiserum gegen die MCC β -Peptide reagierte im Bindungstest sehr gut mit beiden Peptiden, besonders allerdings mit MCC β 484-497. Die mitgelieferten Präimmunseren und die Antiseren wurden im Immunoblot gegen rekombinant exprimierte MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteine getestet. Als Kontrolle wurden die Fusionsproteine parallel mit anti-MBP-Serum der Firma NewEngland BioLabs nachgewiesen. Der Western Blot zeigte (Abb. 21), dass die Präimmunseren der Kaninchen keine Antikörper gegen MCC α und MCC β enthielten. Die Kaninchen-Antiseren und das anti-MBP-Serum hingegen detektierten spezifisch Proteine mit den molekularen Massen 125 und 105 kDa, entsprechend den MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen. Allerdings erzeugten die Antiseren im Western Blot einen starken, dunkel gefärbten Hintergrund. Da die Reinheit der Peptidantikörper nicht zufrieden stellend war, wurden sie durch Affinitätschromatographie aus den Kaninchen-Antiseren gereinigt. Die synthetisierten Antigenpeptide wurden über Cysteinreste kovalent an ein SulfoLink[®] Coupling Gelmaterial gekoppelt, so dass die Peptidantikörper in den Vollseren an diese binden und gereinigt werden konnten. Ein erneuter Nachweis von MBP-MCC α - und MBP-MCC β -Fusionsproteinen mit den gereinigten Peptidantikörpern zeigte, dass diese spezifisch die 3-MCC-Peptide nachwiesen, ohne einen störenden Hintergrund zu produzieren. Auf den Western Blots waren hier neben den Hauptbanden auch kleinere Nebenbanden der Größen 81 kDa und 62 kDa zu sehen, welche höchstwahrscheinlich die Peptide MCC α und MCC β ohne MBP-Tag abbilden, die entweder von *E. coli* ohne Tag generiert (beide cDNA-Sequenzen besitzen im 5'-Bereich ATG-Sequenzen) oder während der Reinigung vom Tag abgetrennt wurden. Ein Test der Peptidantikörper auf Fibroblastenlysaten erbrachte keinen Nachweis der 3-MCC-Untereinheiten. Die AK eignen sich nicht für die Detektion geringer Proteinmengen von MCC α und MCC β . Eine Kreuzreaktion mit PCC und PYC konnte in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Rekombinant exprimierte PCC oder PYC standen für die Testung der Kreuzreaktionen bei größeren Proteinmengen leider nicht zur Verfügung. Dennoch wurde mit den Peptidantikörpern eine Möglichkeit geschaffen, MCC α und MCC β , die in *E. coli* überexprimiert wurden, in Western Blot-Analysen nachzuweisen.

6.11 Klonierung, Expression und Reinigung von MCC α - und MCC β -Proteinanteilen für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Die hergestellten polyklonalen Peptidantikörper gegen MCC α und MCC β (siehe 6.10) weisen zwar rekombinant exprimierte Untereinheiten nach, erlauben jedoch wegen der monovalenten Bindung an Antigen-Proteine keine Immunpräzipitation. Da im Fortlauf dieses Projektes auch Immun-Affinitätsreinigungen und Immunpräzipitationen geplant sind, wurde mit der Vorbereitung für die Generierung polyklonaler Antikörper begonnen. Die erzeugten Antigen-Proteine sollten eine gewisse molekulare Masse aufweisen (20 kDa), um möglichst viele antigene Determinanten aufbieten zu können, die letztendlich eine Immunpräzipitation erlauben. Zusätzlich sollten diese Antikörper die Möglichkeit bieten auch kleine Mengen an MCC α und MCC β in humanen Zelllysaten nachweisen zu können. Bei der Auswahl der zu klonierenden Proteinfragmente von MCC α und MCC β musste erneut darauf geachtet werden, dass diese möglichst wenig Homologie zu den Paralogen PCC und PYC aufweisen und keine funktionell konservierten Domänen enthalten. Für MCC α wurde die AS-Sequenz 402-643 ausgewählt (circa 20 kDa), für MCC β die AS-Abfolge 321-543 (ebenfalls circa 20 kDa). Dieser Abschnitt von MCC β wurde auch in den Expressionsvektor pMAL-c2X kloniert, der bereits mehrmals beschrieben wurde. Das ausgewählte MCC α -Peptid wurde in den Vektor pGEX-3X eingebracht, welcher Fusionsproteine mit aminoterminalen GST (Glutathion-S-Transferase)-Tag (26 kDa) hervorbringt. Diese MBP- und GST-Tags sollten die empfindlichen Peptide während der Reinigungsprozedur stabilisieren und die Reinigung über Affinitätschromatographie ermöglichen. Bei einer späteren Immunisierung von Kaninchen mit den hoch gereinigten Fusionsproteinen sind auch Antikörper gegen MBP und GST zu erwarten. Um diese zu entfernen, sollen MBP und GST an eine AffiGel 10 Matrix gekoppelt werden. Das Vollserum kann an diese Affinitätssäule adsorbieren, und die eluierten IgG-Fractionen können im Anschluss über eine Protein A-Agarose-Säule extrahiert und dialysiert werden. Dieses Vorgehen hat auf der einen Seite den Nachteil, dass vermehrt Antikörper gegen die Tags gebildet werden könnten und die Antikörperproduktion gegen die 3-MCC-Peptide eingeschränkt wird. Auf der anderen Seite ist es so möglich, auch kleine instabile 3-MCC-Proteinanteile für die AK-Produktion zu generieren. Die ausgewählten Proteinanteile sollen die Spezifität der AK stark erhöhen, da die hoch

konservierten Abschnitte, die zu Kreuzreaktionen führen können, außen vor gelassen werden. Rekombinant exprimierte Abschnitte von MCC α und MCC β , die ohne Tag hergestellt werden, hätten vermutlich geringe Chancen, mehrere Reinigungsschritte, wie sie für die Antigenproduktion notwendig sind, zu überstehen, ohne zumindest teilweise degradiert zu werden. Das in *E. coli* synthetisierte MBP-MCC β -Fusionsprotein konnte durch Affinitätsreinigung über eine Amylose-Säule (siehe 5.10.2) und durch eine anschließende Größenausschluss-Chromatographie so aufgereinigt werden, dass diese Proteinanteile nun für die Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Das GST-MCC α -Protein lag nach Überexpression in *E. coli* in so genannten *Inclusion Bodies* vor. Die Methode zur Isolierung, Reinigung und Solubilisierung der *Inclusion Bodies* konnte zwar so verbessert werden, dass sich MCC α -Fusionsproteine mit hohem Reinheitsgrad gewinnen ließen, allerdings wird diese Art der Reinigung noch von großen Proteinverlusten begleitet. Nach Optimierung der Methode hinsichtlich der resultierenden Konzentration gereinigter Fusionsproteine können diese ohne den Zwischenschritt einer Glutathion-Affinitätschromatographie durch eine Gelfiltration weiter aufgereinigt werden. Somit wurden die Voraussetzungen für die Herstellung von Antigenen für die Produktion polyklonaler AK gegen MCC α geschaffen.

6.12 Genotypische, biochemische und klinische Charakterisierung von Individuen mit 3-MCC-Mangel

Für eine möglichst umfassende Untersuchung der humanen 3-MCC war es wichtig, neben der proteinbiochemischen Charakterisierung des Enzyms an sich auch den assoziierten Enzymdefekt zu betrachten. Durch die Charakterisierung von betroffenen Individuen auf genotypischer, biochemischer und klinischer Ebene sollten Erkenntnisse zur Bedeutung dieses Enzyms beim Menschen gewonnen werden. Es sollte geklärt werden, welchen Einfluss Mutationen in den Genen *MCCA* und *MCCB* auf die Funktionsfähigkeit des Enzyms haben, und ob eine Korrelation zwischen Genotyp und biochemischen Phänotyp der Individuen festgestellt werden kann. Diese Informationen sollten Rückschlüsse auf den Einfluss der 3-MCC für die Erhaltung des metabolischen Gleichgewichts der Zelle und für die Gesunderhaltung des menschlichen Organismus erlauben.

Innerhalb des bayerischen Pilotprojekts wurden im NGS während der letzten 6 Jahre 677 852 Neugeborene untersucht, was einer Erfassung von 98% entspricht. In dieser Studie wurde der 3-MCC-Mangel weitaus häufiger diagnostiziert als man bis dahin aufgrund von lediglich sporadischen klinischen Berichten erwarten konnte. Es wurden 8 Individuen mit 3-MCC-Mangel identifiziert, was einer Frequenz von 1:84.700 (1:12.500–1:196.000; 95 % Konfidenzintervall) entspricht. Ähnliche Frequenzen wurden auch von NGS-Programmen anderer Länder berichtet (Zytkovicz et al., 2001, Chace et al., 2002, Koeberl et al., 2003, Schulze et al., 2003, Wilcken et al., 2003). Diese überraschend hohe Inzidenz weist darauf hin, dass es sehr viele asymptomatische Mutationsträger gibt, die vor Einführung des NGS nicht identifiziert wurden und klinisch unauffällig geblieben sind. Das lässt vermuten, dass der Enzymdefekt eine milde Störung darstellt mit geringer funktioneller Expression und klinischer Penetranz. Die Nachfolgeuntersuchungen der Neugeborenen mit 3-MCC-Mangel, die bisher im NGS identifiziert wurden, zeigen, dass alle Betroffenen gesund sind und sich normal entwickeln. An dieser Stelle muss gesagt werden, dass diese Kinder nicht den natürlichen Verlauf der Krankheit präsentieren, da bereits frühzeitig durch Proteinrestriktion, Carnitingabe und Beratung der Eltern eingegriffen wurde. Somit bleibt die natürliche Prognose des Enzymmangels schwer einschätzbar. Allerdings konnte durch Nachfolgeuntersuchungen im Rahmen des NGS eine hohe Inzidenz milder Phänotypen unter den Familienmitgliedern beobachtet werden. Diese asymptomatischen Familienmitglieder können für die Analyse des natürlichen Krankheitsverlaufs sehr hilfreich sein. Durch das NGS wurden indirekt 9 Mütter und 4 ältere Geschwisterkinder entdeckt, die alle asymptomatisch waren oder unspezifische milde Symptome zeigten (2 Mütter).

In der Literatur wurden bisher 37 Individuen mit enzymatisch konfirmiertem 3-MCC-Mangel detailliert beschrieben. Eine Auswertung dieser Berichte (Tabelle 8) deutet an, dass sich lediglich 27% der betroffenen Kinder normal entwickeln und völlig asymptomatisch bleiben. Bei 30% der Kinder wird von muskulärer Hypotonie und psychomotorischer Retardierung berichtet. Fast die Hälfte leidet unter anderen neurologischen Symptomen. Nach diesen Fallstudien ergibt sich sogar eine Letalität von 11%. An dieser Stelle muss einschränkend betont werden, dass kein Symptom mit Sicherheit kausal dem 3-MCC-Mangel zugeordnet werden kann. Betrachtet man die Inzidenz von 1:84.700, muss man annehmen, dass nur eine sehr kleine Gruppe Betroffener klinisch auffällig wird.

Innerhalb der letzten 20 Jahre, seit der Entdeckung des 3-MCC-Mangels 1982, wurden in den USA und Europa 170 Millionen Kinder geboren. In der Literatur wurde im selben Zeitraum von 4 Individuen berichtet, die, allerdings nicht erwiesenermaßen, an diesem Enzymdefekt verstarben. In einer vorausgegangenen Studie wurde beobachtet, dass die Entdeckungsrate vererbter Erkrankungen durch das erweiterte NGS etwa dreimal höher ist als die durch klinische Diagnosestellung (Hoffmann et al., 2004). Auch wenn man nun eine fünffach höhere Sterberate (20 Verstorbene) annimmt, läge das Mortalitätsrisiko maximal bei lediglich 1:8.500.000. Eine Anzahl von 27 der berichteten Individuen wurden durch, wenn auch milde, klinische Symptome auffällig. Würde man auch hier eine fünffach höhere Erkrankungsrate (135) annehmen, so läge das Risiko klinische Symptome zu entwickeln gerade mal bei 1:1.200.000. Vergleicht man diese Daten mit der Inzidenz, die im bayerischen NGS beobachtet wurde (1:84.700), kann man hypothetisch annehmen, dass der Anteil an Individuen, die eventuell milde Symptome entwickeln könnten, deutlich unter 10% liegt. Weniger als 1-2% hätten ein Risiko einer ernsthaften Erkrankung. Wäre das NGS bereits vor 20 Jahren eingeführt worden, hätte man, ausgehend von diesem Rechenbeispiel, mehr als 2000 Betroffene mit einem möglicherweise klinisch unauffälligen Krankheitsverlauf identifiziert. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Rate an falsch positiven Fällen (0,03%), so hätte man in diesem Zeitraum 50.000 Familien mit einem fehlerhaften Befund belastet.

Es stellt sich die Frage, ob genaue Informationen über den genetischen Hintergrund des 3-MCC-Mangels zu einer besseren Einschätzung des Risikos für das betroffene Individuum beitragen können. Die Mutationsanalyse der 28 Probanden in dieser Studie zeigte eine große genetische Heterogenität. Die gefundenen Mutationen waren gleichmäßig über die Gene *MCCA* und *MCCB* verteilt. Häufig kann eine große Mutations-Heterogenität dafür verwendet werden, Patienten in Subgruppen einzuteilen, die eine unterschiedliche Prädisposition für eine klinische Expression haben (Liu et al., 2004). Für den 3-MCC-Mangel konnte so eine Korrelation nicht gezeigt werden. Es gab keine eindeutige Beziehung zwischen der beeinträchtigten Enzymaktivität und den akkumulierenden Metaboliten im Blut und Urin. Dennoch zeigten die untersuchten Individuen die typischen erhöhten Konzentrationen an organischen Säuren und Acylcarnitinen, was belegte, dass die gefundenen Mutationen tatsächlich den entsprechenden biochemischen Phänotyp hervorrufen.

Dennoch muss die biochemische Manifestation einer Krankheit nicht zwangsläufig die Ausbildung klinischer Symptome bedeuten.

Die Mutationsanalysen dieser Arbeit und die verfügbaren 3-MCC-Mutationsdaten anderer Arbeitsgruppen erlauben keine Korrelation zwischen bestimmten Allel-Varianten und Subgruppen milder oder schwerer klinischer Phänotypen (Baumgartner et al., 2001, Gallardo et al., 2001, Holzinger et al., 2001, Baykal et al., 2005, Dantas et al., 2005). Betrachtet man die beschriebenen Mutationen der verstorbenen Patienten und vergleicht diese mit den beschriebenen Sequenz-Varianten der völlig asymptomatischen Individuen, wird klar, dass es nicht möglich ist, „milde“ oder „schwere“ Allel-Varianten zu definieren. Beispielsweise wurde die Variation E99Q in *MCCB* sowohl in einem kurdischen Jungen aufgedeckt, der im Alter von 11 Monaten verstarb (Bannwart et al., 1992) als auch in einer erwachsenen Frau (Amish), die lediglich milde Symptome zeigte und durch abnormale NGS-Werte ihres gesunden Neugeborenen aufgefallen war (Gibson et al., 1998). Die Mutation C509X (*MCCA*) wurde auf der einen Seite bei einem türkischen Kind mit schwerem klinischen Erscheinungsbild gefunden (Dantas et al., 2005) und auf der anderen Seite bei einem völlig asymptomatischen kurdischen Neugeborenen (diese Arbeit). Die bisher häufigste Mutation R385S (*MCCA*) trat bei einem Patienten mit schwerem klinischen Phänotyp (Steen et al., 1999), bei zwei biotinsensitiven Betroffenen (einer schwer betroffen, einer mild) (Baumgartner et al., 2004) und bei einem asymptomatischen Neugeborenen auf (diese Arbeit). Zusammenfassend scheint die Genotypisierung keine Hilfestellung bei der Vorhersage des möglichen Krankheitsverlaufes bei Betroffenen mit 3-MCC-Mangel zu bieten.

Warum ist es so schwierig, Marker für diese Erkrankung zu finden? Der L-Leucin-Abbaupfad (Abb. 5) scheint eine „funktionelle Reserve“ zu besitzen. Betrachtet man die Defekte, die die Enzyme vor (Isovaleryl-CoA-Dehydrogenase) und nach (3-Methylglutaconyl-CoA-Hydratase) dem 3-MCC-Schritt betreffen, stellt man fest, dass diese interessanterweise ebenfalls klinisch völlig unauffällig verlaufen können (Ly et al., 2003, Ensenauer et al., 2004). Nur Defekte, die das erste Enzym dieses Abbaupfad betreffen, führen in den meisten Fällen zu schweren klinischen Symptomen (Ahornsirup-Erkrankung, MSUD) (Chuang und Shih, 2001). Möglicherweise wird der 3-MCC-Mangel unter normalen Bedingungen funktionell durch alternative katabole Schritte kompensiert, was dem Modell der metabolischen Homöostase entsprechen würde, das bereits vor längerer Zeit entwickelt wurde

(Kacser und Burns, 1981). Außerdem scheint die Zelle über ausreichende Mechanismen zu verfügen, um potentiell toxische Metabolite zu eliminieren. Unter diesen Umständen erscheint es weniger erstaunlich, dass es keine offensichtliche Korrelation zwischen Genotyp und biochemischem oder klinischem Phänotyp gibt. Der 3-MCC-Mangel scheint eher ein (mono-) genetischer Risikofaktor oder ein Anfälligkeitsloкус als eine Erkrankung mit obligater Expression klinischer Symptome zu sein. Verglichen mit anderen organischen Azidämien scheint er auch eine ungleich höhere Toleranz gegenüber metabolischem Stress zu haben. Sogar der vollständige Ausfall des Enzyms führt lediglich bei einer kleinen Untergruppe von Betroffenen zu einer klinischen Manifestation im Zusammenhang mit Stressfaktoren wie längere fieberhafte Infekte, Fastenperioden oder Narkosen. Das gilt sowohl für behandelte als auch für unbehandelte Individuen.

Die Resultate der Literaturanalyse und dieser Studie zeigen, dass es nicht möglich ist, anhand von Daten, die durch das NGS gewonnen werden, Vorhersagen über die potentielle Ausprägung klinischer Symptome zu machen. Wie bereits erwähnt, wurden durch das NGS indirekt 9 Mütter und 4 ältere Geschwister mit 3-MCC-Mangel identifiziert. Diese späte Diagnosestellung sich gesund fühlender Individuen kann Belastungen für die Betroffenen und ihre Familien hervorrufen, die man bedenken sollte. Neben der möglichen Stigmatisierung muss auch der Aspekt der Kostenbelastung für das Gesundheitssystem beachtet werden. Die Erfahrungen, die während des sechsjährigen NGS-Pilotprojekt hinsichtlich des 3-MCC-Mangels gesammelt werden konnten, haben dazu geführt, dass der Enzymdefekt im August 2005 aus dem Screening-Programm ausgeschlossen wurde. Für die Screening-Kommission stand der Nutzen des NGS in keinem vertretbaren Verhältnis zu den Belastungen betroffener Familien und den Folgekosten, die Konfirmationsdiagnostik, schwierige ärztliche Beratung, diätetische und medikamentöse Therapieeinleitung sowie über Jahre hin regelmäßige klinische Betreuung nach sich ziehen.

6.13 Ausblick

Die Gruppe der asymptomatischen Mütter, die indirekt durch das NGS identifiziert wurden, bilden ein Probandenkollektiv, welches weiter untersucht werden sollte, da diese Betroffenen den natürlichen Verlauf des Enzymmangels abbilden. Hier wären die genaue Erhebung anamnestischer Daten und die Erstellung eines detaillierten neurologischen und kognitiven Status aufschlussreich.

Um die Bedeutung der humanen 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase möglichst umfassend begreifen zu können, muss die Charakterisierung des Enzyms weiter vorangetrieben werden.

Durch die Co-Expression von MCC α und MCC β in *E. coli* und anschließende Größenausschlusschromatographie könnten Erkenntnisse zum oligomeren Status des Holoenzym gewonnen werden. Die vermutete ($\alpha\beta$)₆ Konformation wurde bisher nicht experimentell bestätigt. Zusätzlich wäre interessant zu erfahren, welchen Einfluss bestimmte Mutationen auf die Assemblierung der Untereinheiten haben.

Durch so genannte pulse-chase-Experimente in kultivierten Fibroblasten könnten Informationen zur Stabilität der Untereinheiten, speziell wenn diese durch Mutationen verändert sind, eingeholt werden.

Mit den neu hergestellten polyklonalen Antikörpern gegen MCC α und MCC β könnten unter anderem die Untereinheiten in Patienten-Zelllysaten nachgewiesen und somit ebenfalls der Einfluss von Mutationen auf die Expression und Stabilität dieser Proteine untersucht werden.

Um mehr über die Bedeutung des Enzyms für den Leucin-Abbaupfad zu erfahren, wären beispielsweise ¹³Leucin-Flux-Messungen über den Stoffwechselweg in intakten Fibroblasten interessant.

Auch das Auffinden möglicher Interaktionspartner der 3-MCC würde zur Charakterisierung des Enzyms beitragen. Hier könnte man die Techniken Yeast Two-Hybrid oder auch SELDI (surface enhanced laser desorption ionisation) nutzen. Anhand der SELDI-Technologie könnten auch so genannte Screens von Patienten-Fibroblasten gemacht werden, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt waren wie Hitzeexposition, hohe Leucingaben oder kataboler Stress.

7. Zusammenfassung

Die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (3-MCC) gehört zur Familie der biotinabhängigen Carboxylasen und ist am Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäure L-Leucin beteiligt. Das mitochondriale Enzym besteht aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, MCC α und MCC β , wobei die größere α -Untereinheit die prosthetische Gruppe Biotin trägt. Die beiden Untereinheiten werden durch die Gene *MCCA* und *MCCB* codiert. Der humane 3-MCC-Mangel, welcher autosomal rezessiv vererbt wird, galt als eine äußerst seltene Störung, bis durch die Erweiterung des Neugeborenen-Screeningprogramms eine unerwartet hohe Inzidenz von etwa 1:85.000 beobachtet werden konnte. Das klinische Bild stellt sich sehr heterogen dar: Neben überwiegend asymptomatischen Mutationsträgern wurde in der Literatur auch über schwere Krankheitsverläufe und vier verstorbene Individuen berichtet.

In dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse zur humanen 3-MCC gewonnen werden. Alignments mit den MCC α - und MCC β -Proteinsequenzen anderer Spezies lieferten Hinweise auf eine aminoterminal Lokalisation von mitochondrialen Präsequenzen. Mit der Durchführung eines in vitro Import-Assays mit isolierten Hefemitochondrien wurde erstmals bewiesen, dass die beiden Untereinheiten der 3-MCC mitochondriale Signalpeptide besitzen, die nach dem Import abgespalten werden. Dieser Versuch zeigte auch den membranpotentialabhängigen Mechanismus des Proteinimports und die subkompartimentäre Lokalisation von MCC α und MCC β in der mitochondrialen Matrix. Durch die aminoterminal Ansequenzierung von MCC α und MCC β , welche über Streptavidin-Beads nativ aus humanem Nierengewebe gewonnen wurden, ließen sich die exakten Aminotermini der prozessierten Untereinheiten bestimmen. So konnten nicht nur die Länge der Signalpeptide erschlossen (MCC α AS 1-41, MCC β 1-22), sondern auch die aminoterminal Lokalisation belegt werden.

Die Abspaltung der Signalpeptide ist für die korrekte Faltung der Proteine in ihre aktive Form entscheidend. Die Identifizierung der prozessierten Peptide war somit eine wichtige Voraussetzung für die Expression der Untereinheiten in *E. coli*. MCC α und MCC β konnten als MBP-Fusionsproteine erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Die Erkenntnisse dieser Expressions-Studien bilden die Grundlage für weiterführende funktionelle und strukturelle Untersuchungen.

Mit der Herstellung und Reinigung von Peptidantikörpern gegen MCC α und MCC β wurde ein wichtiges Werkzeug für die Analyse rekombinant exprimierter Untereinheiten geschaffen.

Zusätzlich wurden 28 Individuen mit 3-MCC-Mangel biochemisch und genotypisch charakterisiert. Die Betroffenen wurden direkt oder indirekt durch das Neugeborenen-Screening identifiziert und sind größtenteils asymptomatisch. Es konnten 31 verschiedene Mutationen in *MCCA* und *MCCB* aufgedeckt werden, welche sehr heterogen sind und sich gleichmäßig über beide Gene verteilen. Bei 22 dieser Mutationen handelte es sich um bisher unbeschriebene Allel-Varianten. Die Etablierung eines Radio-Enzymassays erlaubte die Messung der 3-MCC-Restaktivität in kultivierten Patienten-Fibroblasten, welche maximal 13% der Wildtyp-Enzymaktivität betrug. Sowohl die Analyse der genotypischen, biochemischen und klinischen Daten dieser 28 Probanden als auch der Vergleich dieser Gruppe mit einer im Laufe der letzten 20 Jahre publizierten Kohorte von 37 zumeist klinisch auffälligen Individuen ließen keine Marker erkennen, die es bei der schwierigen Beratung betroffener Familien erlauben, Aussagen bezüglich der pathologischen Relevanz der Störung und der voraussichtlichen Prognose zu machen. Nach der derzeitigen Datenlage scheint der 3-MCC-Mangel beim Menschen lediglich eine milde Störung mit überwiegend harmlosen Verlauf zu sein.

8. Literaturverzeichnis

- ABE, Y., SHODAI, T., MUTO, T., MIHARA, K., TORII, H., NISHIKAWA, S., ENDO, T. & KOHDA, D. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell*, 100, 551-60.
- ANTONARAKIS, S. E. (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat*, 11, 1-3.
- BANNWART, C., WERMUTH, B., BAUMGARTNER, R., SUORMALA, T. & WEISMANN, U. N. (1992) Isolated biotin-resistant deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase presenting as a clinically severe form in a newborn with fatal outcome. *J Inherit Metab Dis*, 15, 863-8.
- BARTLETT, K., BENNETT, M. J., HILL, R. P., LASHFORD, L. S., POLLITT, R. J. & WORTH, H. G. (1984) Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency presenting with life-threatening hypoglycaemia. *J Inherit Metab Dis*, 7, 182.
- BAUER, M. F., SIRRENBERG, C., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, 87, 33-41.
- BAUMGARTNER, M. R., ALMASHANU, S., SUORMALA, T., OBIE, C., COLE, R. N., PACKMAN, S., BAUMGARTNER, E. R. & VALLE, D. (2001) The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest*, 107, 495-504.
- BAUMGARTNER, M. R., DANTAS, M. F., SUORMALA, T., ALMASHANU, S., GIUNTA, C., FRIEBEL, D., GEBHARDT, B., FOWLER, B., HOFFMANN, G. F., BAUMGARTNER, E. R. & VALLE, D. (2004) Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: evidence for an allele-specific dominant negative effect and responsiveness to biotin therapy. *Am J Hum Genet*, 75, 790-800.
- BAYKAL, T., GOKCAY, G. H., INCE, Z., DANTAS, M. F., FOWLER, B., BAUMGARTNER, M. R., DEMIR, F., CAN, G. & DEMIRKOL, M. (2005) Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Early-onset necrotizing encephalopathy with lethal outcome. *J Inherit Metab Dis*, 28, 229-333.
- BEEEMER, F. A., BARTLETT, K., DURAN, M., GHNEIM, H. K., WADMAN, S. K., BRUINVIS, L. & KETTING, D. (1982) Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in two sibs. *Eur J Pediatr*, 138, 351-4.
- BIXEL, M. G. (1998) Untersuchungen zur Bedeutung des Leucins im Energiestoffwechsel des Gehirns. *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- BIXEL, M. G. & HAMPRECHT, B. (2000) Immunocytochemical localization of beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase in astroglial cells and neurons in culture. *J Neurochem*, 74, 1059-67.
- BOLLIGER, L., JUNNE, T., SCHATZ, G. & LITHGOW, T. (1995) Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria. *Embo J*, 14, 6318-26.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

- BRIX, J., DIETMEIER, K. & PFANNER, N. (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem*, 272, 20730-5.
- BROSS, P., JESPERSEN, C., JENSEN, T. G., ANDRESEN, B. S., KRISTENSEN, M. J., WINTER, V., NANDY, A., KRAUTLE, F., GHISLA, S., BOLUNDI, L. & ET AL. (1995) Effects of two mutations detected in medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)-deficient patients on folding, oligomer assembly, and stability of MCAD enzyme. *J Biol Chem*, 270, 10284-90.
- CHACE, D. H., KALAS, T. A. & NAYLOR, E. W. (2002) The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3.
- CHLOUPKOVA, M., RAVN, K., SCHWARTZ, M. & KRAUS, J. P. (2000) Changes in the carboxyl terminus of the beta subunit of human propionyl-CoA carboxylase affect the oligomer assembly and catalysis: expression and characterization of seven patient-derived mutant forms of PCC in *Escherichia coli*. *Mol Genet Metab*, 71, 623-32.
- CHUANG, D. & SHIH, V. (2001) *Maple Syrup Urione Disease (Branched-Chain Ketoaciduria)*. New York, McGraw-Hill.
- CULBERTSON, M. R. (1999) RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet*, 15, 74-80.
- DANTAS, M. F., SUORMALA, T., RANDOLPH, A., COELHO, D., FOWLER, B., VALLE, D. & BAUMGARTNER, M. R. (2005) 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Hum Mutat*, 26, 164.
- DEKKER, P. J., MARTIN, F., MAARSE, A. C., BOMER, U., MULLER, H., GUIARD, B., MEIJER, M., RASSOW, J. & PFANNER, N. (1997) The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *Embo J*, 16, 5408-19.
- DEKKER, P. J., RYAN, M. T., BRIX, J., MULLER, H., HONLINGER, A. & PFANNER, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol Cell Biol*, 18, 6515-24.
- DEL CAMPILLO-CAMPBELL, A., DEKKER, E. E. & COON, M. J. (1959) Carboxylation of beta-methylcrotonyl coenzyme A by a purified enzyme from chicken liver. *Biochim Biophys Acta*, 31, 290-2.
- DI GUAN, C., LI, P., RIGGS, P. D. & INOUE, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 67, 21-30.
- DIETMEIER, K., HONLINGER, A., BOMER, U., DEKKER, P. J., ECKERSKORN, C., LOTTSPREICH, F., KUBRICH, M. & PFANNER, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature*, 388, 195-200.
- DODELSON DE KREMER, R., LATINI, A., SUORMALA, T., BAUMGARTNER, E. R., LAROVERE, L., CIVALLERO, G., GUELBERT, N., PASCHINI-CAPRA, A., DEPETRIS-BOLDINI, C. & MAYOR, C. Q. (2002) Leukodystrophy and CSF purine abnormalities associated with isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Metab Brain Dis*, 17, 13-8.
- ELPELEG, O. N., HAVKIN, S., BARASH, V., JAKOBS, C., GLICK, B. & SHALEV, R. S. (1992) Familial hypotonia of childhood caused by isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency. *J Pediatr*, 121, 407-10.

- ENSENAUER, R., VOCKLEY, J., WILLARD, J. M., HUEY, J. C., SASS, J. O., EDLAND, S. D., BURTON, B. K., BERRY, S. A., SANTER, R., GRUNERT, S., KOCH, H. G., MARQUARDT, I., RINALDO, P., HAHN, S. & MATERN, D. (2004) A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet*, 75, 1136-42.
- FRISCHMEYER, P. A. & DIETZ, H. C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*, 8, 1893-900.
- GALLARDO, M. E., DESVIAT, L. R., RODRÍGUEZ, J. M., ESPARZA-GORDILLO, J., PÉREZ-CERDÁ, C., PÉREZ, B., RODRÍGUEZ-POMBO, P., CRIADO, O., SANZ, R., MORTON, D. H., GIBSON, K. M., THUY, P. L., RIBES, A., RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, S., UGARTE, M. & PENALVA, M. Á. (2001) The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism. *Am J Hum Genet*, 68, 334-346.
- GAVEL, Y. & VON HEIJNE, G. (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng*, 4, 33-7.
- GIBSON, K. M., BENNETT, M. J., NAYLOR, E. W. & MORTON, D. H. (1998) 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children. *J Pediatr*, 132, 519-23.
- GITZELMANN, R., STEINMANN, B., NIEDERWIESER, A., FANCONI, S., SOURMALA, T. & BAUMGARTNER, R. (1987) Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting at age 20 months with sopor, hypoglycaemia and ketoacidosis. *J Inherit Metab Dis*, 10, 290-292.
- GOLOUBINOFF, P., GATENBY, A. A. & LORIMER, G. H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*, 337, 44-7.
- HAWLITSCHKEK, G., SCHNEIDER, H., SCHMIDT, B., TROPSCHUG, M., HARTL, F. U. & NEUPERT, W. (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell*, 53, 795-806.
- HECTOR, M. L., COCHRAN, B. C., LOGUE, E. A. & FALL, R. R. (1980) Subcellular localization of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase in bovine kidney. *Arch Biochem Biophys*, 199, 28-36.
- HENDRICK, J. P., HODGES, P. E. & ROSENBERG, L. E. (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4056-60.
- HOFFMANN, G.F., VON KRIES R., KLOSE D., LINDNER M., SCHULZE A.; MUNTAU A.C., RÖSCHINGER W., LIEBL B., MAYATEPEK E., ROSCHER A.A. (2004) Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fatty acid transport and oxidation in Germany. *Eur J Pediatr*, 163(2), 76-80.
- HOLZINGER, A., RÖSCHINGER, W., LAGLER, F., MAYERHOFER, P. U., LICHTNER, P., KATTENFELD, T., THUY, P. L., NYHAN, W. L., KOCH, H. G., MUNTAU, A. C. & ROSCHER, A. A. (2001) Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet*, 10, 1299-1306.
- HORST, M., AZEM, A., SCHATZ, G. & GLICK, B. S. (1997) What is the driving force for protein import into mitochondria? *Biochim Biophys Acta*, 1318, 71-8.

- HORWICH, A. L., KALOUSEK, F., MELLMAN, I. & ROSENBERG, L. E. (1985) A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein. *Embo J*, 4, 1129-35.
- HURT, E. C., PESOLD-HURT, B. & SCHATZ, G. (1984) The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *Embo J*, 3, 3149-56.
- HUTSON, S. M. & RANNELS, S. L. (1985) Characterization of a mitochondrial transport system for branched chain alpha-keto acids. *J Biol Chem*, 260, 14189-93.
- IHARA, K., KUROMARU, R., INOUE, Y., KUHARA, T., MATSUMOTO, I., YOSHINO, M. & FUKUSHIGE, J. (1997) An asymptomatic infant with isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme: a carboxylase deficiency detected by newborn screening for maple syrup urine disease. *Eur J Pediatr*, 156, 713-5.
- JITRAPAKDEE, S. & WALLACE, J. C. (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*, 340, 1-16.
- JITRAPAKDEE, S. & WALLACE, J. C. (2003) The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Pept Sci*, 4, 217-29.
- JURECKI, E. R. & PACKMAN, S. (1992) Nutrition therapy for b-methylcrotonylglycinuria. IN ACOSTA, P. B. (Ed.) *Metabolic Currents*. Columbus, Ohio, Ross Laboratories.
- KACSER, H. & BURNS, J. A. (1981) The molecular basis of dominance. *Genetics*, 97, 639-66.
- KANG, P. J., OSTERMANN, J., SHILLING, J., NEUPERT, W., CRAIG, E. A. & PFANNER, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, 348, 137-43.
- KAPUST, R. B. & WAUGH, D. S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 8, 1668-74.
- KELSON, T. L., OHURA, T. & KRAUS, J. P. (1996) Chaperonin-mediated assembly of wild-type and mutant subunits of human propionyl-CoA carboxylase expressed in Escherichia coli. *Hum Mol Genet*, 5, 331-7.
- KELSON, V. A., HUNT, R. J. & HAITJEMA, H. M. (2002) Improving a regional model using reduced complexity and parameter estimation. *Ground Water*, 40, 132-43.
- KERSCHER, O., HOLDER, J., SRINIVASAN, M., LEUNG, R. S. & JENSEN, R. E. (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 139, 1663-75.
- KNOWLES, J. R. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*, 58, 195-221.
- KOBORI, J. A., JOHNSTON, K., SWEETMAN, L., SCHMIDT, K., JURECKI, E., WOLF, B., GOODMAN, S. & PACKMAN, S. (1989) Isolated 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency presenting as a Reyes-like syndrome. *Pediatr Res*, 25, 142A (Abstract).
- KOEBERL, D. D., MILLINGTON, D. S., SMITH, W. E., WEAVID, S. D., MUENZER, J., MCCANDLESS, S. E., KISHNANI, P. S., MCDONALD, M. T., CHAING, S., BONEY, A., MOORE, E. & FRAZIER, D. M. (2003) Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *J Inherit Metab Dis*, 26, 25-35.

- KOEHLER, C. M., JAROSCH, E., TOKATLIDIS, K., SCHMID, K., SCHWEYEN, R. J. & SCHATZ, G. (1998) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science*, 279, 369-73.
- KONDO, H., SHIRATSUCHI, K., YOSHIMOTO, T., MASUDA, T., KITAZONO, A., TSURU, D., ANAI, M., SEKIGUCHI, M. & TANABE, T. (1991) Acetyl-CoA carboxylase from *Escherichia coli*: gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9730-3.
- KUNKELE, K. P., JUIN, P., POMPA, C., NARGANG, F. E., HENRY, J. P., NEUPERT, W., LILL, R. & THIEFFRY, M. (1998) The isolated complex of the translocase of the outer membrane of mitochondria. Characterization of the cation-selective and voltage-gated preprotein-conducting pore. *J Biol Chem*, 273, 31032-9.
- LANE, M. D., MOSS, J. & POLAKIS, S. E. (1974) Acetyl coenzyme A carboxylase. *Curr Top Cell Regul*, 8, 139-95.
- LANE, M. D., ROMINGER, K. L., YOUNG, D. L. & LYNEN, F. (1964) The Enzymatic Synthesis Of Holotranscarboxylase From Apotranscarboxylase And (+)-Biotin. II. Investigation Of The Reaction Mechanism. *J Biol Chem*, 239, 2865-71.
- LAU, D. P., COCHRAN, B. C., MUNSON, L. & FALL, R. R. (1979) Bovine kidney 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylases: Each enzyme contains nonidentical subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 214-218.
- LAU, E. P., COCHRAN, B. C. & FALL, R. R. (1980) Isolation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from bovine kidney. *Arch Biochem Biophys*, 205, 352-9.
- MUNSON, L. (1979) Bovine kidney 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylases: Each enzyme contains nonidentical subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 214-218.
- LAYWARD, E. M., TANNER, M. S., POLLITT, R. J. & BARTLETT, K. (1989) Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as a Reye syndrome-like illness. *J Inherit Metab Dis*, 12, 339-40.
- LEHNERT, W., NIEDERHOFF, H., SUORMALA, T. & BAUMGARTNER, E. R. (1996) Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: long-term outcome in a case with neonatal onset. *Eur J Pediatr*, 155, 568-72.
- LITHGOW, T. (2000) Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett*, 476, 22-6.
- LIU, W., ICITOVIC, N., SHAFFER, M. L. & CHASE, G. A. (2004) The impact of population heterogeneity on risk estimation in genetic counseling. *BMC Med Genet*, 5, 18.
- LOHRET, T. A., JENSEN, R. E. & KINNALLY, K. W. (1997) Tim23, a protein import component of the mitochondrial inner membrane, is required for normal activity of the multiple conductance channel, MCC. *J Cell Biol*, 137, 377-86.
- LY, T. B., PETERS, V., GIBSON, K. M., LIESERT, M., BUCKEL, W., WILCKEN, B., CARPENTER, K., ENSENAUER, R., HOFFMANN, G. F., MACK, M. & ZSCHOCKE, J. (2003) Mutations in the AUH gene cause 3-methylglutaconic aciduria type I. *Hum Mutat*, 21, 401-407.
- LYNEN, F., KNAPPE, J., LORCH, E., JUTTING, G., RINGELMANN, E. & LACHANCE, J. P. (1961) Zur biochemischen Funktion des Biotins. II. Reinigung und Wirkungsweise der b-Methyl-crotonyl-Carboxylase. *Biochem Z*, 335, 123.
- MARTIN, J., MAHLKE, K. & PFANNER, N. (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *J Biol Chem*, 266, 18051-7.

- MCALLISTER, H. C. & COON, M. J. (1966) Further studies on the properties of liver propionyl coenzyme A holocarboxylase synthetase and the specificity of holocarboxylase formation. *J Biol Chem*, 241, 2855-61.
- MCCLARIN, J. A., FREDERICK, C. A., WANG, B. C., GREENE, P., BOYER, H. W., GRABLE, J. & ROSENBERG, J. M. (1986) Structure of the DNA-Eco RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science*, 234, 1526-41.
- MEISINGER, C., RYAN, M. T., HILL, K., MODEL, K., LIM, J. H., SICKMANN, A., MULLER, H., MEYER, H. E., WAGNER, R. & PFANNER, N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol*, 21, 2337-48.
- MISSLER, M. & SUDHOF, T. C. (1998) Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*, 14, 20-6.
- MOURMANS, J., BAKKEREN, J., DE JONG, J., WEVERS, R., VAN DIGGELEN, O. P., SUORMALA, T., BAUMGARTNER, R. & WENDEL, U. (1995) Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: four sibs devoid of pathology. *J Inherit Metab Dis*, 18, 643-645.
- MURAYAMA, K., KIMURA, M., YAMAGUCHI, S., SHINKA, T. & KODAMA, K. (1997) Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 15-year-old girl. *Brain Dev*, 19, 303-305.
- OSTERMANN, J., HORWICH, A. L., NEUPERT, W. & HARTL, F. U. (1989) Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, 341, 125-30.
- PEARSON, M. A., ALECK, K. A. & HEIDENREICH, R. A. (1995) Benign clinical presentation of 3-methylcrotonylglycinuria. *J Inherit Metab Dis*, 18, 640-641.
- PFANNER, N. & GEISLER, A. (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 339-49.
- POLANETZ, R. H. (2006) Identifizierung und molekulare Charakterisierung mitochondrialer Signalpeptide der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase. *Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital*. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- PRENTKI, M. & RENOLD, A. E. (1983) Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem*, 258, 14239-44.
- RASSOW, J. & PFANNER, N. (1995) Molecular chaperones and intracellular protein translocation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 126, 199-264.
- RECHE, P., LI, Y. L., FULLER, C., EICHHORN, K. & PERHAM, R. N. (1998) Selectivity of post-translational modification in biotinylated proteins: the carboxy carrier protein of the acetyl-CoA carboxylase of *Escherichia coli*. *Biochem J*, 329 (Pt 3), 589-96.
- ROISE, D., HORVATH, S. J., TOMICH, J. M., RICHARDS, J. H. & SCHATZ, G. (1986) A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. *Embo J*, 5, 1327-34.
- ROLLAND, M. O., DIVRY, P., ZABOT, M. T., GUIBAUD, P., GOMEZ, S., LACHAUX, A. & LORAS, I. (1991) Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 16-month-old child. *J Inherit Metab Dis*, 14, 838-9.
- RÖSCHINGER, W., MILLINGTON, D. S., GAGE, D. A., HUANG, Z. H., IWAMOTO, T., YANO, S., PACKMAN, S., JOHNSTON, K., BERRY, S. A. & SWEETMAN, L. (1995) 3-Hydroxyisovalerylcarnitine in patients with deficiency of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase. *Clin Chim Acta*, 240, 35-51.

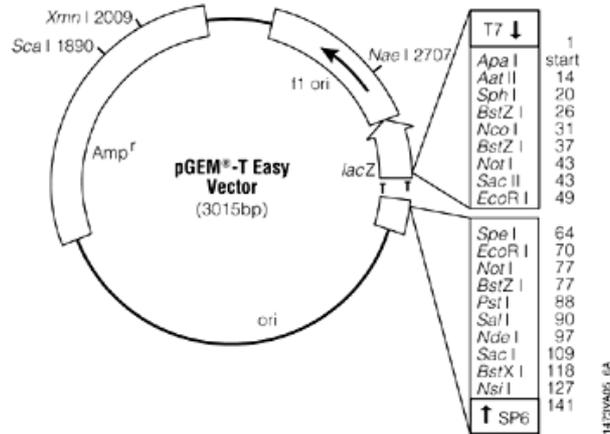
- ROSPERT, S., LOOSER, R., DUBAQUIE, Y., MATOUSCHEK, A., GLICK, B. S. & SCHATZ, G. (1996) Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria. *Embo J*, 15, 764-74.
- SAIJO, T., WELCH, W. J. & TANAKA, K. (1994) Intramitochondrial folding and assembly of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD). Demonstration of impaired transfer of K304E-variant MCAD from its complex with hsp60 to the native tetramer. *J Biol Chem*, 269, 4401-8.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHERER, F., ANTON, M., SCHILLINGER, U., HENKE, J., BERGEMANN, C., KRUGER, A., GANSBACHER, B. & PLANK, C. (2002) Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 9, 102-9.
- SCHNAITMAN, C. & GREENAWALT, J. W. (1968) Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J Cell Biol*, 38, 158-75.
- SCHNEIDER, G., SJOLING, S., WALLIN, E., WREDE, P., GLASER, E. & VON HEIJNE, G. (1998) Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins*, 30, 49-60.
- SCHNEIDER, H. C., WESTERMANN, B., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. (1996) The nucleotide exchange factor MGE exerts a key function in the ATP-dependent cycle of mt-Hsp70-Tim44 interaction driving mitochondrial protein import. *Embo J*, 15, 5796-803.
- SCHULZE, A., LINDNER, M., KOHLMULLER, D., OLGEMOLLER, K., MAYATEPEK, E. & HOFFMANN, G. F. (2003) Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics*, 111, 1399-406.
- SIRRENBURG, C., BAUER, M. F., GUIARD, B., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature*, 384, 582-5.
- SIRRENBURG, C., ENDRES, M., FOLSCH, H., STUART, R. A., NEUPERT, W. & BRUNNER, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature*, 391, 912-5.
- SOLLNER, T., RASSOW, J., WIEDMANN, M., SCHLOSSMANN, J., KEIL, P., NEUPERT, W. & PFANNER, N. (1992) Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates. *Nature*, 355, 84-7.
- SONG, J., WURTELE, E. S. & NIKOLAU, B. J. (1994) Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of 3-methylcrotonoyl-CoA carboxylase: identification of the biotin carboxylase and biotin-carrier domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5779-83.
- STADLER, S. C., POLANETZ, R., MEIER, S., MAYERHOFER, P. U., HERRMANN, J. M., ANSLINGER, K., ROSCHER, A. A., ROSCHINGER, W. & HOLZINGER, A. (2005) Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 334, 939-946.
- STEEN, C., BAUMGARTNER, E. R., DURAN, M., LEHNERT, W., SUORMALA, T., FINGERHUT, S. R., STEHN, M. & KOHLSCHUTTER, A. (1999) Metabolic stroke in isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Eur J Pediatr*, 158, 730-3.
- SWEETMAN, L. & WILLIAMS, J. C. (1995) *Branched chain organic acidurias*, New York, McGraw-Hill.

- TSAI, M. Y., JOHNSON, D. D., SWEETMAN, L. & BERRY, S. A. (1989) Two siblings with biotin-resistant 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency. *J Pediatr*, 115, 110-3.
- VISSER, G., SUORMALA, T., SMIT, G. P., REIJNGOUD, D. J., BINK-BOELKENS, M. T., NIEZEN-KONING, K. E. & BAUMGARTNER, E. R. (2000) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father. *Eur J Pediatr*, 159, 901-904.
- VON HEIJNE, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J*, 5, 1335-42.
- VOOS, W., VON AHSEN, O., MULLER, H., GUIARD, B., RASSOW, J. & PFANNER, N. (1996) Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *Embo J*, 15, 2668-77.
- WAKIL, S. J., STOOPS, J. K. & JOSHI, V. C. (1983) Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem*, 52, 537-79.
- WANG, X., WURTELE, E. S., KELLER, G., MCKEAN, A. L. & NIKOLAU, B. J. (1994) Molecular cloning of cDNAs and genes coding for beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase of tomato. *J Biol Chem*, 269, 11760-8.
- WEAVER, L. M., LEBRUN, L., FRANKLIN, A., HUANG, L., HOFFMAN, N., WURTELE, E. S. & NIKOLAU, B. J. (1995) Molecular cloning of the biotinylated subunit of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 107, 1013-4.
- WIESMANN, U. N., SUORMALA, T., PFENNINGER, J. & BAUMGARTNER, E. R. (1998) Partial 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with fatal outcome due to progressive respiratory failure. *Eur J Pediatr*, 157, 225-9.
- WILCKEN, B., WILEY, V., HAMMOND, J. & CARPENTER, K. (2003) Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med*, 348, 2304-2312.
- WOOD, H. G. & BARDEN, R. E. (1977) Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem*, 46, 385-413.
- WURTELE, E. S. & NIKOLAU, B. J. (1990) Plants contain multiple biotin enzymes: discovery of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase in the plant kingdom. *Arch Biochem Biophys*, 278, 179-86.
- ZHENG, X., ROSENBERG, L. E., KALOUSEK, F. & FENTON, W. A. (1993) GroEL, GroES, and ATP-dependent folding and spontaneous assembly of ornithine transcarbamylase. *J Biol Chem*, 268, 7489-93.
- ZYTKOVICZ, T. H., FITZGERALD, E. F., MARSDEN, D., LARSON, C. A., SHIH, V. E., JOHNSON, D. M., STRAUSS, A. W., COMEAU, A. M., EATON, R. B. & GRADY, G. F. (2001) Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem*, 47, 1945-55.

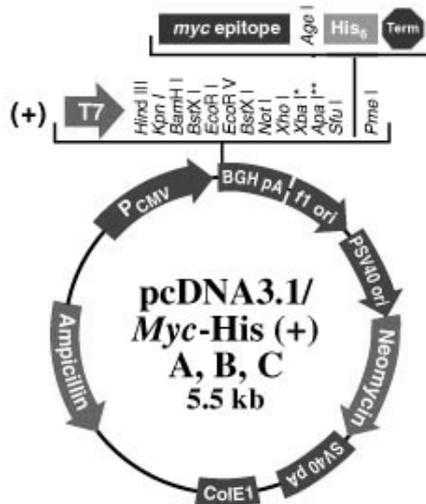
9. Anhang

9.1. Verwendete Vektoren

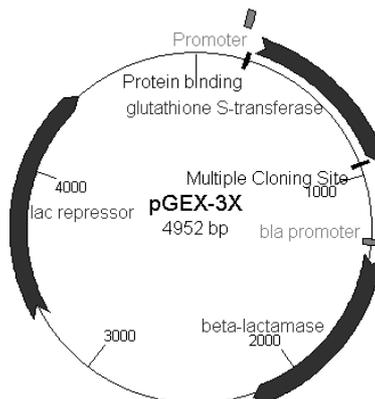
9.1.1 pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, USA)



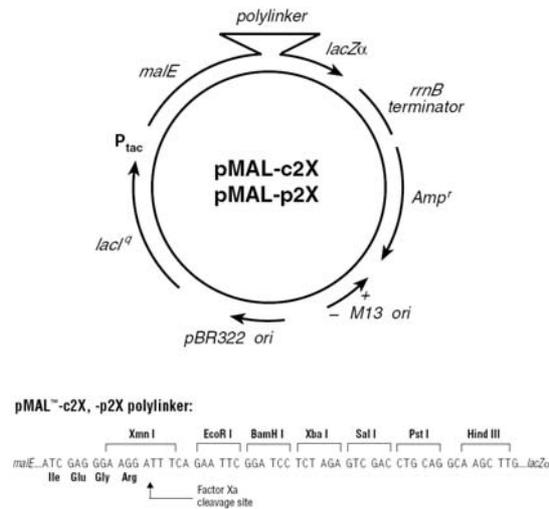
9.1.2 pcDNA3.1/Myc-His (+) A (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)



9.1.3 pGEX-3X (Pharmacia, Uppsala, Schweden)



9.1.4 pMAL-c2X (New England BioLabs GmbH, Frankfurt)



9.2 Alignments von Aminosäuresequenzen

9.2.1 Alignment der MCCα-Untereinheiten von *H. sapiens*, *M. musculus*, *A. thaliana* und *A. nidulans* (Interspezies-Alignment)

MCCAhs	1	MAAASAVSVLLVAAEERNRWRHLPSLLLPPIRWWRQRTMKYITATGRNITKVLIANRGEI
MCCAm	1	----MAAAALAAVDRNQLRRVPIILLQPREWAWKLRITMKYCTTPGGSITKVLIANRGEI
MCCAat	1	-----MSMMTVAALRRNVRRKNHSMIVR---YISGASAMKPKEQ---CTIEKILVANRGEI
MCCAan	1	-----MPLSSLRLTSARLIGQTVVARRSRRTASIVISNSSSN-FRALDSILLIANRGEI
MCCAhs	61	ACRVMRTAKKLGVTAVYSEADRNMSHVDMADEAYSIGPAPSQOQSYLSMEKIIQVAKTS
MCCAm	57	ACRVIRTAKKMGVQSVAVYSEADRNMSHVDMADEAYSIGPAPSQOQSYLAMEKIIQVAKSS
MCCAat	50	ACRIMRTAKRLGIQTVAVYSDADRSILHVKSADAEAVRIGPPSARLSYLSGVTIMEAART
MCCAan	52	ALRVGRATAAQHCIRVTTLYTDPDSQAQHALSTPYAENLIG---SVSAYLDGDRILELAKAQ
MCCAhs	121	AAQAIHPGCGFLSENMEFAELCKQEGIFIGPPPSAIRDMGKSTSKSIMAAAGVPVVEG
MCCAm	117	AAQAIHPGYGFLSENMEFAELCKQEGIFIGPPSSAIRDMGKSTSKSIMAAAGVPVVEG
MCCAat	110	CAQAIHPGYGFLSESDFAQLCEDSLTIFIGPPASAIRDMGDKSASKRIMCAAGVPLVPG
MCCAan	109	CCQCIHPGYGFLSENSEFARKCTEAGLVFIGPPWKAIEDMGDKRCKHIMTAAGVPCVPS
MCCAhs	181	YHGEDQSDQCLKEHARRIGYPVIKAVRGGGKGMRIVRSEEFQEQLESARREAKKSFN
MCCAm	177	YHGKDQSDQCLREHACKIGYPVIKAVRGGGKGMRIVRSEEFQEQLESARREAKKSFN
MCCAat	170	YHGHEQDIDHKSEAFKIGYPLIKPTHGGGKGMRIVQSGKDFADSFLGAREAAASFG
MCCAan	169	YHGENQDPNFEAEADKIKYPVLIKAIKGGGKGMRIARSKBEFQAQLQSAKSEAMNSFG
MCCAhs	241	DDAMLIEKFVDTPRHVEVQVFGDHHGNAVYLFERDCSVORRHOKIIEEAPAPGIKSEVVRK
MCCAm	237	DDAMLIEKFVDTPRHVEVQVFGDHHGNAVYLFERDCSVORRHOKIIEEAPAPGINPEVRR
MCCAat	230	VNTILLEKYITPRHIEVQIFGDKHGNVHLVERDCSVORRHOKIIEEAPAPNISEKFRRA
MCCAan	229	DDHVLVEKYITTPRHIEVQVFADKHGNVALLGERDCSTORRHOKIIEESPAPHLPDTRK
MCCAhs	301	KLGEAAVRAAKAVNYVGAGTVEFIMDSKHN-FCFMEMNTRLQVEHPVTEMITGIDLVEWQ
MCCAm	297	KLGEAAVRAAKAVKYVGAGTVEFIMDSRHN-FYFMEMNTRLQVEHPVTEMITGIDLVEWQ
MCCAat	290	NLGOAAVSAARAVGYYNAGTVEFIVDIESDQFYFMEMNTRLQVEHPVTEMITVQODLVEWQ
MCCAan	289	DIWAKARSAAALAVRYEGAGTVEFIFDNDTGBEFFFMEMNTRLQVEHPVTEMITVQODLVEWQ
MCCAhs	360	LRIAAGEKIPLSQEEITL----QGHAFEARIYAEDPSNNFMFPVAGPLVHLSLTPRADPSTR
MCCAm	356	LRIAAGEKIPLSQEEITPL----QGHAFEARIYAEDPDNFMFPVAGPLVHLSLTPSADPSTR
MCCAat	350	LRVANGEPPLPSQSEVPM----SGHAFEARIYAENVKGFLLPATGVLNHYRPAVSPSVR
MCCAan	349	LKVAEGAEPLPLQEEVEANIATHGHATEARIYAENPAQGFLLPDSGALLHVRTPATTEVDR

MCCAhs 416 IETGVRQGDDEVSVHYDPMIAKLVVWAADROAALTKLRYSLRQYNIIVGLPTNIDFLNLSG
MCCAm 412 IETGVRQGDDEVSVHYDPMIAKLVVWASDROSALSKLRYCLHQYNIIVGLRSNVDFLLRSLG
MCCAat 406 IETGVRQGDDEVSMHYDPMIAKLVVWGGNRGEALVKLKDCLSNFOVAGVPTNINFLQKLAS
MCCAan 409 IDAGFVQGDDEVSAHYDPMIAKLIVRGADROEATRKLACSLGRVEVAGPATNIEFLKSVCK

MCCAhs 476 HPEFEAGNVHTDFIPQHHKQLLSR---KAAAKESLCOAALGLLILKEKAMTDFTLQAHDO
MCCAm 472 HPEFEAGNVHTDFIPQHHKDLPSH---STIAKESVCOAALGLLILKEKEMTSAFKLHIDQD
MCCAat 466 HKEFAVGNVETTFIEHHKSDLFADE--SNPAATEVAYKAVKHSAAALVACISTIEHSTWN
MCCAan 469 SADFTISGKVEITGYIEKHHDLEFAQSPTEPEVLAQVALACLHDDARLAAQKATNFQGSAVG

MCCAhs 534 FS-----PFSSSGRRLNISYTRNMTLK-DGKNNVAVAVTYNHDGYSYMQIE
MCCAm 530 FS-----PFSFSSGRRLNISYTRNMTLR-SGKSDIVIAVTYNRDGSYDMQID
MCCAat 524 ESNHGKVPISIWYSNPPFRVHHEAKQTIELEWNNECECTGSLNLSLGVRYQPDGSYLIEEG
MCCAan 529 FG-----PGRQQHMTFTTNSANNEAFD-----VKVQQTGQNVFNKIG

MCCAhs 580 DKTFQVLGNLYSEGDCITYLKCSVNGVASKAKLITILEN-----TIYLFSEKESIE
MCCAm 576 NKSFRVLGDLSSSEDCITYLKSSINGVARKSKFILLDN-----TVHLFSMEGSIE
MCCAat 584 NDSPSLELRVTRACKDPRVFAAGLSMNVSLAAYLKDGYKHIHIWHGSEHHPKQKVGIE
MCCAan 569 ---EHTFEQVTSHPNADFRITISFFPHTRLDTTVIRDC-----DSIVVQRGRQYR

MCCAhs 629 IDIP---VPKYLSSVSSQETQGGPLAPMTGTIEKVFVKAGDKVKAGDSLMMVMIAMKMEHT
MCCAm 625 VGIP---VPKYLSPVSAEGAQGGTIAPMTGTIEKVFVKAGDRVKAGDSLMMVMIAMKMEHT
MCCAat 644 FSEDEGVGHRITSEETSHPPGTIVAPMAGLVVKVIVENEAKVDQGPILIVLEAMKMEHV
MCCAan 617 LITPR--AKWMEKALGMKDVNSVLAPMPCKVLRVVEVQAGDTVEKDQPLVVLVSMKMEIV

MCCAhs 686 IKSPKDGTVKKVFYREGAQANRHTPLVEFEFEESDKRESE-----
MCCAm 682 IKAPKDGRIKKVFFSEGAQANRHAPLVEFEFEESDK-----
MCCAat 704 VKAPSSGSIQDLKVKACQOVSDGSALFRIG-----
MCCAan 675 IIRSPQRGKIPKSSIKKETNAKAGHRLWSLLVVKTRRNRYGRTEAMLHQ

9.2.2 Alignment der MCCβ-Untereinheiten von *H. sapiens*, *M. musculus* und *A. thaliana* (Interspezies-Alignment)

MCCBhs 1 -----MVAVLRDLALRPCARASAPAGPRAYH----GDSVASLGTQPDLSAL
MCCBmm 1 -----MWCALRSALRPCRAAVPPORAYH----GDSVARLGTQPDSSAST
MCCBat 1 MLRILGRRVVSASKEITSLQQWRIRPCTDSRPDPFRITFRGLQKGFQVQILPDGVDRNSSEA

MCCBhs 42 YQENYEQMKALVNQLHERVEHITKLGGEKARALHISRKLLPRERIDNLDPGSPFLELS
MCCBmm 42 YQENYEQMKALVSQLHERAQYVRLGGESEKARARHTSRKLLPRDRIDNLDPGSPFLELS
MCCBat 61 ESNNSIAMEGTISELRSHTIKVLAGGGEAAVKRNRSRNKLLPRERIDRLIDPGSSFLELS

MCCBhs 102 QFAGYQLYDNEEVPGGIITGIGRVSGVECMITANDATVKGGAAYYPVTVKKQLRAQEIAM
MCCBmm 102 QFAGYQLYGDEEVPAGGIITGIGRVSGVECMITANDATVKGGTYYYPVTVKKHVRQAQIAL
MCCBat 121 QLACHRLYLEEP-LPSGGIITGIGPIHCRICMFMANDPTVKGGTYYPTITKKHLRAQEIAA

MCCBhs 162 QNRLPCIYLVDSGGAYLPRQADVFPDRDHFGRTFYNQAIMSSKNITQIAVVMGCTAGGA
MCCBmm 162 QNRLPCIYLVDSGGANLPRQADTFPDRDHFGRTFYNQAIMSSKNITQIAVVMGCTAGGA
MCCBat 180 RCRLRPCIYLVDSGGAYLPKQAVVFPDKENFGRTFYNESVMSSDGIPTQIALIVGCTAGGA

MCCBhs 222 YVPAMADENIIVRKQGTIFLAGPPLVKAATGEEVSAEDLGGADLHCRKSGVSDHWALDDH
MCCBmm 222 YVPAMADENIIVQKQGTIFLAGPPLVKAATGEEVSAEDLGGADLHCRKSGVIDHYALDDH
MCCBat 240 YTPAMADESVMVKGNGTIFLAGPPLVKAATGEEVSAEDLGGATVHCITVSGVSDYFAQDEL

MCCBhs 282 HALHLTRKVVRLNYQKKLDVITIEPS-----EPLFPADELYGIVGANLKRISFDVREVI
MCCBmm 282 HALHLTRKVVRSLNQYQKMDVITIEPS-----EPLFPADELYGIVGANLKRISFDVREVI
MCCBat 300 HGLATGRNIVKNIHMAAKQGEFTFGSKNLVYKEPLMDINELRSTAPVDHKQQFDVRSIT

MCCBhs 336 ARIVDGSRFTEFKAFYGDTLVTGFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGIHFVQLCCQRN
MCCBmm 336 ARIVDGSRFNEFKALYGDTLVTGFARIFGYPVGIIGNNGVLFSESAKKGAHFVQLCCQRN
MCCBat 360 ARIVDGSSEFDEFKQYGTTLVTGFARIVGQTVGIIGNNGILFNESALKGAHFTELCSQRK

MCCBhs 396 IPLLFLQNITGFMVGRFYEAEGIKDGAKMVAAVACAQVPKITLIIGGSYGAGNYGMCGR
MCCBmm 396 IPLLFLQNITGFMVGRDYEAEGIKDGAKMVAAVACAKVPKITVIIGGSYGAGNYGMCGR
MCCBat 420 IPLVFLQNITGFMVGSRAEANGIAKAGAKMVAVSAKVPKITLIIGASFGAGNYAMCGR

```

MCCBhs 456 AYSRFLYIWPNARISVMGGEQAANVLATITKQDQAREGKQFSSADEAALKEPIIKKFEE
MCCBmm 456 AYSRFLYIWPNARISVMGGEQAATVLTARDQKAREGKQFSSAEAAALKEPIIKRFEE
MCCBat 480 AYSRFLYIWPNARISVMGGEQAAGVLTQIERATKKRQGIKNTSEEEBAFKKKTVDAMER

MCCBhs 516 EGNPPYSSARVWDDGIIDPADTRLVLGLSFSAAALNAPIEKTFDFGIFRM
MCCBmm 516 EGNPPYSSARLWDDGIIDPVDTRLVLGLSLSAALNAPIORTDFGIFRM
MCCBat 540 EGNPPYSSARLWDDGVIDPCDTRKVLGLCLSAAALNRPLEDTRFGVFRM

```

9.2.3 Alignment der α -Untereinheiten von 3-MCC, PCC und PYC von *H. sapiens* (Paralogen-Alignment)

```

MCCAhs 1 MAAASAVSVLLVAAERNRWRHRLPSLLLPPTWVWRQRTMKYTTATGNITKVLIANRGEI
PCCAhs 1 -----MLSAALRTLKHVLY--YSRQCLMVSRNLGSVGYPNEKTFDKILVANRGEI
PYChs 1 -----MLKFRTVHGLR-LLGIRRTSTAPAA--PNVRRLEYKPIKKVMVANRGEI

MCCAhs 61 ACRVVRTAKKLGVQTVAVYSEADRNMSMHVDMADEAYSTG-PAPSQQSYLSMEKTIQVAKT
PCCAhs 50 ACRVVRTCKKMGIKTVAIHSVDASSVHVKMADEAVCVG-PAPTSKSYLNMDATMEATKK
PYChs 49 ATRVFRACTELGIRTVAIYSEQDTGOMHRQKADEAYLIGRGLAPVQAYLHPDIKVAKE

MCCAhs 120 SAAQAHPGCGFLSENMEFAELCKQEGCIFIGPPPSAIRDMCLKSTKSSIMAAAGVPVVE
PCCAhs 109 TRAQAVHPGYGFLSENKEFARCLAAEDVVFIFGPDTHAIQAMGDKIESKLLAKKAEVNTIP
PYChs 109 NNVDVHPGYGFLSERADFAQACQDAGVRFIFGSPFVVRKMGDKVEARAIAAAGVPVVP

MCCAhs 180 CVHGEDQSDQCLKEHARRIGYPVMIKAVRGGGKGMRIVRSEQEFQEQLESARREAKKSF
PCCAhs 169 GFDGVVKDAEEAVRIAREIGYPVMIKASAGGGKGMRIAWDDEETREGRLSQEAASSF
PYChs 169 GTDAPITSLHEAHEFNNTYGFPLIFKAAAYGGGRGMRVHVSVEELEBENYTRAYSEALAAF

MCCAhs 240 NDDAMLIEKFVDTPRHVEVQVFGDHHGNAVYLERDCSVQRRHQKITEEAPAPGKSEVVR
PCCAhs 229 GDRLLIEKFIDNPRHIEIQVLGDKHGNAIWLNERECSIQRRNOKVVEEAPSIFLDAETR
PYChs 229 CNGALFVEKFLKPRHIEVQLGDQYGNILHLYERDCSIQRRHQKVVEIAPAAHLDPQIR

MCCAhs 300 KKLGEAAVRAAKAVNIVGAGTVEFIMDSKHNFCFMEMNTRLOVEHPVTEMITCTDLVEWQ
PCCAhs 289 RAMGEQAVALARAVKYSSAGTVEFLVDSKKNFYFLEMNTRLOVEHPVTECITGLDLVQEM
PYChs 289 TRLTSDSVKLAQVGMENAGTVEFLVDRHGKHVYFLEVNSRLOVEHIVTEEITDLDLVHAQ

MCCAhs 360 IRIAG---EKIPLSQEETITLQGHAFEARITYAEDPSNPF-MPVAGPLVHLSIPRADPSTR
PCCAhs 349 IRVAKG---YPLRHKQADIRINGWAVECRVYAEPPYKSFGLPSIGRLSQYQEBLHLEPVR
PYChs 349 IHVAEGRSLPDLGLRQENIRINGCATQCRVTTEDPARSF-QPDTGRLEVERSGEGVIRL

MCCAhs 416 IETGVRQCDESVVHYDPMIAKLVVWAADRQAALTKLRYSLROYNTVGLPTNIDFLLNLSG
PCCAhs 406 VDSGILQEGSDISIIYDPMISKLITYGSDRTEALKRMADALDNYVIRGVTHNIALLRVTHI
PYChs 408 DNASAFQGAIVSPPHYDSLIVKVIHAHCKDHPTAATKMSRALAEIRVRGVKTNIAFLQNLN

MCCAhs 476 HPEFEACNVHIDFIPQHHKQLLSRKAAKEISLCAALGLLKEKAMIDTFTLQAHQDQFS
PCCAhs 466 NSRFVKGDISTKFLSIVYPDGFKGMHLTKSEKNQLLAIASSLFFVAFQLRAQHFOENSRMP
PYChs 468 NQOFLAGTVDTIQEIDEN-PELHQLRPAQNRAQKLLHVLGHVNVNGPTPIIPVKASPSPTD

MCCAhs 536 EFSSSSC-----RRLNISY
PCCAhs 526 VIKPDIAN-----WELSVKIL
PYChs 527 FVVPAVPIGPPPAGFRDILLREGPEGFARAVRNHPGLLLMDTTFRDAHQSLLATRVRTED

MCCAhs 550 TENMTLKDGNVAIAVTYNHD-----
PCCAhs 541 HDKVVHTVVASNNGSVFSVEVDG-----
PYChs 587 LKKIAPYVAHNFSKLFSMENWGGATFDVAMRFLYECPWRRQLRELIPNIPFQMLLRGA

MCCAhs 572 -----
PCCAhs 563 -----
PYChs 647 NAVGYTNPDPNVVFKFCEVAKENGMDVFRVFDLSLNYLPNMLLGMEAAGSAGGVVEAAISY

MCCAhs 572 -----GSYSMQIEDKTFQVLGNLYS-----
PCCAhs 563 -----SKLNVTSTWNLASPLLSVSV-----
PYChs 707 TGDVADPSRITKYSLQYMGLEELVRAGTHILCIKDMAGLLKPTACTMLVSSLRDRFPDL

```

MCCAhS 592 -----
PCCAhS 583 -----
PYChS 767 PLHIHTHDTSGAGVAAMLACAQAGADVVDVAADSMSGMTSQPSMGALVACTRGTPLDTEV

MCCAhS 592 -----FGDCTYIKCSVNGVASKAKLIILENT-----
PCCAhS 583 -----DGTQRTVQCLSRREAGGNMSIQFLG-----
PYChS 827 PMERVFYDYSEYEWGARGLYAAFDCHATMKSNSNDVYENIIPGGQYTNLHFQAHSMGLGSK

MCCAhS 618 -----IYLFSEKESIEIDIPVPKYLSS-----
PCCAhS 607 -----T-VYKVNILTRLAAELNKFME-----
PYChS 887 FKEVKKAYVEANQMLGDLIKVTPSSKIVGDLAQFMVQNGLSRAEAEAQAEELSFPRSVVE

MCCAhS 640 -----
PCCAhS 628 -----
PYChS 947 FLQGYIGVPHGGFPEPFRSKVLKDLPRVEGRPGASLPPLDLQALEKELVDRHGEEVTPED

MCCAhS 640 -----
PCCAhS 628 -----
PYChS 1007 VLSAAMYPDVFAHFKDFTATFGPLDSLNTLRLFLQGPKIAEEFEVELERGKTLHIKALAVS

MCCAhS 640 -----VSSQETQGGPLAPMTGTEKVFVK-----
PCCAhS 628 -----KVTEDTSSVLRSPMPGVVVAVSVK-----
PYChS 1067 DLNRAGQRQVFELNGQLRSILVKDTQAMKEMHFHPKALKDVKQIGAPMPKVIDIKV

MCCAhS 664 AGDKVKAGDSLMMMLAMKMEHTIKSPKDGTVKVFYREGAQANRHTPLVEFEESDCKRE
PCCAhS 652 PGDAVAEGQELCVIEAMKMONSMTACKTGTVRSVHCQAGDIVGEGDLLVELE-----
PYChS 1127 AGAKVAKGQPLCVLSAMKMEFVVTSFMEGTVRKVVHTKDMILEGDDLLEIE-----

MCCAhS 724 SE
PCCAhS --
PYChS --

9.2.4 Alignment der β -Untereinheiten von 3-MCC und PCC von *H. sapiens* (Paralogen-Alignment)

MCCBhs 1 MWAVLRRLALRPCARASPAAGPRAYHGDSVASLGTQPDLGSAFYQENYKMKKALVNOIHERV
PCCBhs 1 MAAALRVAA----VG-----AR-LSVLASGLRAAVRSLCSQATSINERLENKR

MCCBhs 61 EHIKLGGEKARALHISRGLLPRERIDNLDIPGSPFLELSQFAGYQLYDN-----EEV
PCCBhs 44 RTALLGGGQRIRIDAQHKGKLTARERISLLLDPGSFWESDMFVEHRCADFMAADKKNK

MCCBhs 115 PGGGIITGTIGRVSQVECMIIANDATVKGCAAYPVTVKQLRAQEIAMQNRLECIYLVDSG
PCCBhs 103 PGDSVVTGRGRINCRLVYVFSODFTVFGGSLSGAHAQKICKIMDQAITVGAIVLGLNDSG

MCCBhs 175 GAYLPRQADVFPDRDHFGRTFYNOAISMKNIAQIAVVMGSCTAGGAYVPAADENIIVR
PCCBhs 163 GARIQEGVESLAG----YADILRNVTASGVIPQISLIMGPCAGGAVVSPALTDFTFVVK

MCCBhs 235 KQGTIFLAGPPIVKAATGEEVSAEDLGGADLHCRKSGVSDHWALDDHHALHLTRKVVVRL
PCCBhs 219 DTSYLFITGPDVVKSVINEDVQOELGGAKTHTTMSGVAHRAFENDVDALCNLRDFFNYL

MCCBhs 295 NYQKKLDVTEPSEEP-LFPADELYGIVGANLKRSDVREVIARIVDGSRFTEFKAFYGD
PCCBhs 279 PLSSQDPASVRECHDPSDRLVPELDTIVPLESTKANMVDIHSVVDEREFEIIMPVYAK

MCCBhs 354 TLVITGFARIFSYVVGIVGN----NGVLFSESAKKGTHFVQICQQRNIPLFLQNIITGFM
PCCBhs 339 NLIIVGFARINRRTVGIIVGNQPKVASGCLDINSVVKCAFVRFQDAFNILPLITFVDVPGFL

MCCBhs 409 VGREYBAEGTAKDGAKMVAAVACAQVPKITLIGGSGYACNYMCGRAYSPRFLYIWPNA
PCCBhs 399 PGTAQPYGGIIRHGAKLLYAFBEATVPKVTVITRKAYGGAYDVMSSKHLCGDTNYAWPTA
MCCBhs 469 RISVMGGEQANVLAITTKDQARREGKQFSSADEAALKEPIIKKFEENPNYSSARVWD
PCCBhs 459 ETAVMG---AKGAVEITFKGHEN-----VEAAQAEYIEKFNAPPAAVRGEV

MCCBhs 529 DGIIDPADTRLVIGLSFSAALNAPTEKTFDFGIFRM--
 PCCBhs 503 DLIIQPSSIRARICCDLDVLASKKVOIPWRKHANIPLE

9.3 Phosphorylierungsvorhersagen des NetPhos 2.0 Servers für MCC α (725 AS)

Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	5	MAAASAVSV	0.008	.
Sequence	8	ASAVSVLLV	0.010	.
Sequence	24	HRLPSLLLP	0.012	.
Sequence	80	VAVYSEADR	0.631	*S*
Sequence	86	ADRNSMHVD	0.873	*S*
Sequence	97	DEAYSIGPA	0.792	*S*
Sequence	103	GPAPSQQSY	0.128	.
Sequence	106	PSQQSYLSM	0.234	.
Sequence	109	QSYLSMEKI	0.950	*S*
Sequence	120	VAKTSAQA	0.027	.
Sequence	133	CGFLSENME	0.023	.
Sequence	155	GPPPSAIRD	0.750	*S*
Sequence	164	MGIKSTSKS	0.547	*S*
Sequence	166	IKSTSKSIM	0.532	*S*
Sequence	168	STSKSIMAA	0.921	*S*
Sequence	187	GEDQSDQCL	0.015	.
Sequence	220	RIVRSEQEF	0.575	*S*
Sequence	230	EQLESARRE	0.667	*S*
Sequence	238	EAKKSFNDD	0.993	*S*
Sequence	277	ERDCSVQRR	0.636	*S*
Sequence	296	PGIKSEVRK	0.366	.
Sequence	327	FIMDSKHNH	0.057	.
Sequence	371	KIPLSQEEI	0.996	*S*
Sequence	392	AEDPSNNFM	0.017	.
Sequence	406	LVHLSTPRA	0.436	.
Sequence	413	RADPSTRIE	0.659	*S*
Sequence	427	GDEVSVHYD	0.045	.
Sequence	454	KLRYSLRQY	0.981	*S*
Sequence	474	LLNL ₂ SGHPE	0.129	.
Sequence	499	QLLLSRKAA	0.980	*S*
Sequence	507	AAKESLCQA	0.110	.
Sequence	535	HDQFSPFSS	0.932	*S*
Sequence	538	FSPFSSSSG	0.862	*S*
Sequence	539	SPFSSSSGR	0.332	.
Sequence	540	PFSSSSGRR	0.501	*S*
Sequence	541	FSSSSGRRL	0.898	*S*
Sequence	548	RLNISYTRN	0.859	*S*
Sequence	573	NHDGYSMQ	0.879	*S*
Sequence	575	DGYSMQIE	0.019	.
Sequence	591	GNLYSEGDC	0.074	.
Sequence	601	YLKCSVNGV	0.025	.
Sequence	607	NGVASKAKL	0.026	.
Sequence	622	IYLF ₂ SKEGS	0.703	*S*
Sequence	626	SKEGSIEID	0.816	*S*
Sequence	638	PKYLSSVSS	0.076	.
Sequence	639	KYLSSVSSQ	0.548	*S*
Sequence	641	LSSVSSQET	0.917	*S*
Sequence	642	SSVSSQETQ	0.948	*S*
Sequence	673	KAGDSLMM	0.021	.

Sequence	688	HTIKSPKDG	0.998	*S*
Sequence	719	EEEESDKRE	0.994	*S*
Sequence	724	DKRESE---	0.991	*S*

^

Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
Sequence	31	LPPRTWVWR	0.105	.
Sequence	38	WRQRTMKYT	0.852	*T*
Sequence	42	TMKYTTATG	0.011	.
Sequence	43	MKYTTATGR	0.080	.
Sequence	45	YTTATGRNI	0.577	*T*
Sequence	50	GRNITKVL I	0.086	.
Sequence	67	RVMRTAKKL	0.583	*T*
Sequence	75	LGVQTVAVY	0.380	.
Sequence	119	QVAKTSAAQ	0.029	.
Sequence	165	GIKSTSKSI	0.271	.
Sequence	252	KFVDTPRHV	0.992	*T*
Sequence	320	VGAGTVEFI	0.045	.
Sequence	338	MEMNTRLQV	0.080	.
Sequence	347	EHPVTEMIT	0.106	.
Sequence	351	TEMITGTDL	0.048	.
Sequence	353	MITGTDLVE	0.047	.
Sequence	376	QEEITLQGH	0.031	.
Sequence	407	VHLSTPRAD	0.934	*T*
Sequence	414	ADPSTRIET	0.219	.
Sequence	418	TRIETGVRQ	0.510	*T*
Sequence	449	QAALTKLRY	0.142	.
Sequence	465	VGLPTNIDF	0.048	.
Sequence	486	GNVHTDFIP	0.011	.
Sequence	523	EKAMTDTFT	0.061	.
Sequence	525	AMTDTFTLQ	0.035	.
Sequence	527	TDTFTLQAH	0.006	.
Sequence	550	NISYTRNMT	0.023	.
Sequence	554	TRNMTLKDG	0.907	*T*
Sequence	567	AIAVTYNHD	0.015	.
Sequence	582	IEDKTFQVL	0.058	.
Sequence	596	EGDCTYLKC	0.027	.
Sequence	617	ILENTIYLF	0.569	*T*
Sequence	645	SSQETQGGP	0.375	.
Sequence	654	LAPMTGTIE	0.065	.
Sequence	656	PMTGTIEKV	0.832	*T*
Sequence	685	KMEHTIKSP	0.835	*T*
Sequence	693	PKDGTVKKV	0.936	*T*
Sequence	709	ANRHTPLVE	0.522	*T*

^

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
Sequence	41	RTMKYTTAT	0.232	.
Sequence	79	TVAVYSEAD	0.039	.
Sequence	96	ADEAYSIGP	0.941	*Y*
Sequence	107	SQQSYLSME	0.844	*Y*
Sequence	181	VVEGYHGED	0.132	.
Sequence	200	RRIGYPVMI	0.048	.
Sequence	270	GNAVYLFER	0.034	.
Sequence	315	KAVNYVGAG	0.550	*Y*
Sequence	387	EARIYAEDP	0.601	*Y*

Sequence	430	VSVHYDPMI	0.052	.
Sequence	453	TKLRYSLRQ	0.054	.
Sequence	458	SLRQYNIVG	0.249	.
Sequence	549	LNISYTRNM	0.202	.
Sequence	568	IAVTYNHGD	0.027	.
Sequence	574	HDGSYSMQI	0.129	.
Sequence	590	LGNLYSEGD	0.065	.
Sequence	597	GDCTYLKCS	0.061	.
Sequence	619	ENTIYLFSSK	0.915	*Y*
Sequence	636	PVPKYLSSV	0.660	*Y*
Sequence	699	KKVFYREGA	0.184	.

9.4 Phosphorylierungsvorhersagen des NetPhos 2.0 Servers für MCC β (563 AS)

Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	16	CARASPAGP	0.987	*S*
Sequence	27	YHGDSVASL	0.217	.
Sequence	30	DSVASLGTQ	0.651	*S*
Sequence	39	PDLGSALYQ	0.006	.
Sequence	77	ALHISRGLK	0.047	.
Sequence	95	IDPGSPFLE	0.049	.
Sequence	101	FLELSQFAG	0.023	.
Sequence	127	IGRVSGVEC	0.982	*S*
Sequence	173	YLVDSGGAY	0.545	*S*
Sequence	202	QAIMSSKNI	0.751	*S*
Sequence	203	AIMSSKNIA	0.004	.
Sequence	215	VVMGCTAG	0.028	.
Sequence	256	GEEVSAEDL	0.996	*S*
Sequence	270	HCRKSGVSD	0.879	*S*
Sequence	273	KSGVSDHWA	0.981	*S*
Sequence	307	TIEPSEEPL	0.723	*S*
Sequence	328	NLKRSFDVR	0.192	.
Sequence	342	IVDGSRFTE	0.250	.
Sequence	378	GVLFSSEAK	0.053	.
Sequence	380	LFSESAKKG	0.790	*S*
Sequence	444	IIGGSYGAG	0.010	.
Sequence	458	GRAYSPRFL	0.968	*S*
Sequence	471	NARISVMGG	0.993	*S*
Sequence	498	GKQFSSADE	0.962	*S*
Sequence	499	KQFSSADEA	0.867	*S*
Sequence	522	NPYYSSARV	0.014	.
Sequence	523	PYYSSARVW	0.017	.
Sequence	544	VLGLSFSA	0.033	.
Sequence	546	GLSFSAALN	0.003	.
^				

Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	33	ASLGTQPD	0.110	.
Sequence	121	GGIITGIGR	0.063	.
Sequence	139	ANDATVKGG	0.212	.
Sequence	149	YYPVTVKKQ	0.559	*T*
Sequence	194	HFGRTFYNQ	0.046	.
Sequence	217	MGCTAGGA	0.049	.

Sequence	238	RKQGTIFLA	0.480	.
Sequence	251	VKAATGEEV	0.687	*T*
Sequence	287	ALHLTRKVV	0.625	*T*
Sequence	303	KLDVTIEPS	0.085	.
Sequence	345	GSRFTEFKA	0.845	*T*
Sequence	354	FYGDTLVTG	0.110	.
Sequence	357	DTLVTGFAR	0.068	.
Sequence	385	AKKGTHFVQ	0.056	.
Sequence	405	LQNITGFMV	0.009	.
Sequence	438	VPKITLIIG	0.016	.
Sequence	484	NVLATITKD	0.070	.
Sequence	486	LATITKDQR	0.210	.
Sequence	537	DPADTRLVL	0.752	*T*
Sequence	556	PIEKTDFGI	0.070	.

^

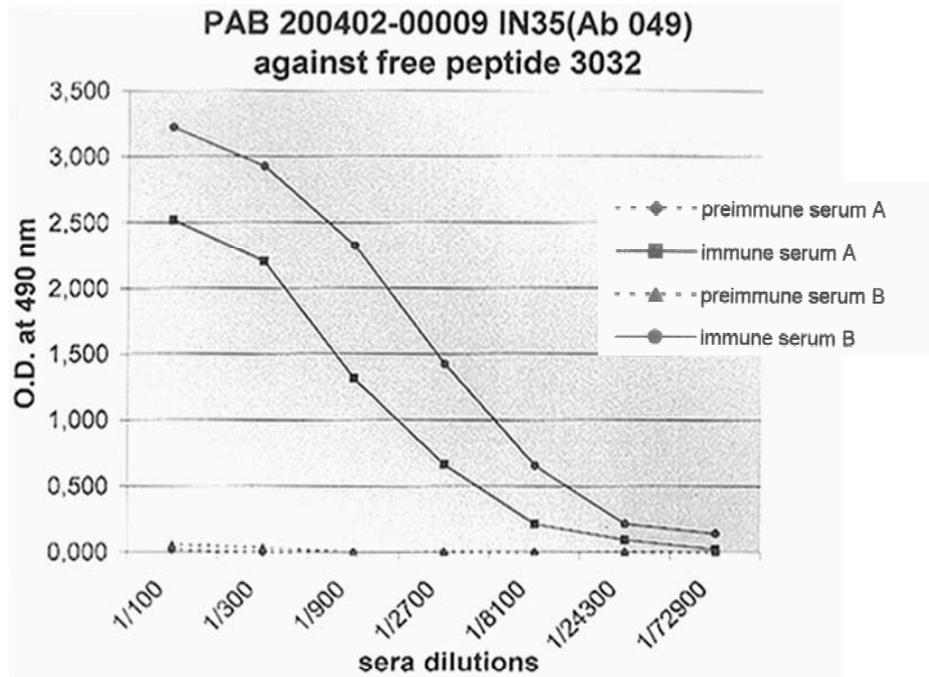
Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
v				
Sequence	23	GPRAYHGDS	0.010	.
Sequence	42	GSALYQENY	0.372	.
Sequence	46	YQENYQMK	0.923	*Y*
Sequence	106	QFAGYQLYD	0.036	.
Sequence	109	GYQLYDNEE	0.064	.
Sequence	145	KGGAYYPVT	0.152	.
Sequence	146	GGAYYPVTV	0.016	.
Sequence	169	LPCIYLVDS	0.009	.
Sequence	177	SGGAYLPRQ	0.153	.
Sequence	196	GRTFYNQAI	0.019	.
Sequence	222	AGGAYVPAM	0.246	.
Sequence	296	RNLNYQKKL	0.328	.
Sequence	318	ADELYGIVG	0.970	*Y*
Sequence	351	FKAFYGDTL	0.554	*Y*
Sequence	365	RIFGYPVGI	0.011	.
Sequence	413	VGREYEAEG	0.193	.
Sequence	445	IGGSYGAGN	0.070	.
Sequence	450	GAGNYGMCG	0.084	.
Sequence	457	CGRAYSPRF	0.012	.
Sequence	463	PRFLYIWPN	0.435	.
Sequence	520	EGNPYYSSA	0.831	*Y*
Sequence	521	GNPYYSSAR	0.816	*Y*

9. 5 ELISA-Bindungstests der Peptidantikörper gegen die Peptide MCC α 3032 und MCC β 3034

Exemplarisch für die ELISA-Bindungstests (durchgeführt von der Firma INBIOS, Martinsried) aller Peptidantikörper werden hier die Analysen der Peptidantikörper gegen MCC α 3032 und MCC β 3034 gezeigt:

A



B

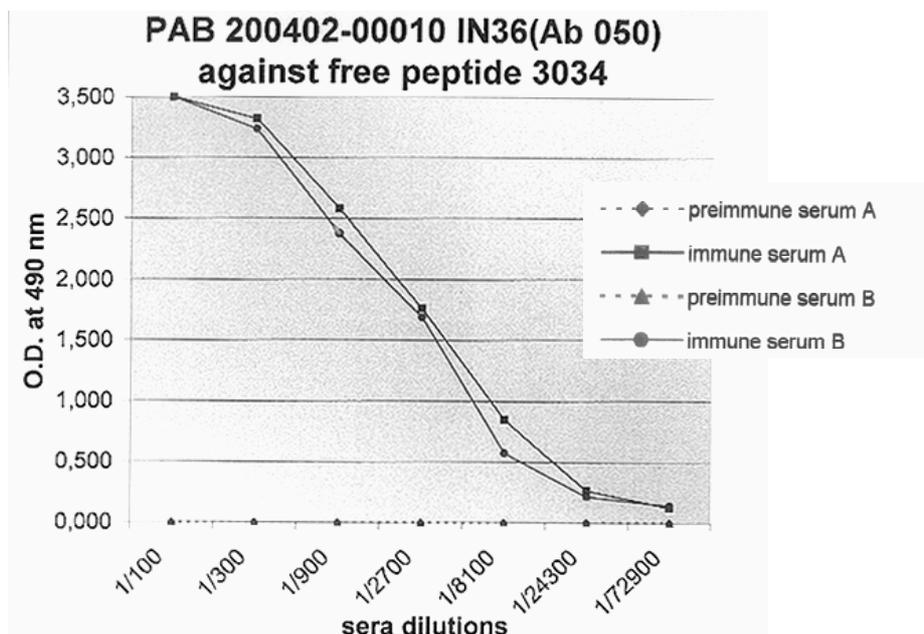


Abb. 29A/B: ELISA-Tests (der Firma INBIOS) der Peptidantikörper (gebildet von Kaninchen A und B) gegen die Peptide 3032 (A) und 3034 (B). Aufgetragen sind die Verdünnungen der Kaninchen-Immunsereen und die jeweils erreichte OD bei 490 nm. Die Präimmunsereen A und B enthielten keine AK gegen die Peptide 3032 und 3034.

10. Abkürzungen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
BSA	Rinderserumalbumin
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenzgen
CDP- <i>Star</i> TM	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
dd	Didesoxy-
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExPASy	Expert Protein Analysis System
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	9,81 m/s ²
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
h	Stunde(n)
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MBP	Maltose-bindendes Protein
3-MCC	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
MCC _α	α-Untereinheit der 3-MCC
MCC _β	β-Untereinheit der 3-MCC
min	Minute(n)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
MPP	Mitochondriale Prozessierungspeptidase
MSF	Mitochondrialer Import-Stimulationsfaktor
NGS	Neugeborenen-Screening
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
P _i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Saline-Puffer
PCC	Propionyl-CoA-Carboxylase

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMF	Peptidmassenfingerprint
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit nachfolgender PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TBS	Tris-Saline-Puffer
TBS-T	Tris-Saline-Puffer mit Tween 20
TIM	Translokase der inneren Mitochondrienmembran
TOM	Translokase der äußeren Mitochondrienmembran
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ÜS	Überstand
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp

Danksagung

An erster Stelle danke ich PD Dr. Wulf Röschinger für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten. Seine Unterstützung, seine wertvollen Anregungen, sein Wissen und die freundschaftliche Zusammenarbeit trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß danke ich für die Bereitschaft meine Arbeit vor der Fakultät für Biologie zu vertreten. Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle für die wertvollen Anregungen und die konstruktive Kritik bedanken.

Herrn Prof. Dr. Adelbert A. Roscher danke ich für die Möglichkeit, im Forschungszentrum Kubus zu arbeiten. Sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft waren für diese Arbeit von großer Bedeutung.

Dr. Peter Mayerhofer danke ich herzlich für die fundierte Anleitung, für Unterstützung meiner Projekte und für seine große Bereitschaft sein Wissen weiterzugeben. Mit einer Vielzahl von Ideen war er mir immer wieder eine große Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Roman Polanetz für die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit. Seine engagierte Arbeit, insbesondere auch in kritischen Projektphasen, seine Freundschaft, interessante Diskussionen und viele aufmunternde Worte waren eine große Hilfe für die Entstehung dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt Sylvia Heidenreich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor. Ihr unermüdlicher Einsatz, ihre Zuverlässigkeit, ihre große Hilfsbereitschaft und Freundschaft waren für mich stets eine große Unterstützung.

Bei Christoph Albert und Birgit Niederer möchte ich mich für die Mitarbeit an diesem Projekt bedanken. Speziell Christophs Fleiß und unermüdlicher Forschergeist waren für das Entstehen dieser Arbeit sehr wertvoll.

PD Dr. Johannes Herrmann und Stephan Meier möchte ich für die Durchführung des in vitro Import-Assays danken. Besonders möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und für die Unterstützung in „mitochondrialen“ Fragen bedanken.

Ich danke Dr. Katja Anslinger für die Bereitstellung des humanen Nierengewebes.

Ein herzlicher Dank gilt auch den weiteren Kollegen der „K0.21“-Truppe. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit, die angenehme, bisweilen sehr heitere Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, viele fruchtbare Diskussionen und für die schönen gemeinsamen Feiern.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meiner Familie, die mit mir zusammen Höhen und Tiefen überwunden und mich immer bedingungslos unterstützt hat, und meinem Freund Ralph. Seine liebevolle Unterstützung, seine Aufmunterung und sein Verständnis waren mir eine große Hilfe.

Lebenslauf

Name: Sonja Christa Stadler
Geburtsdatum: 21. Juli 1975
Geburtsort: München

Aus-und Weiterbildung:

09/82-07/86 Besuch der Grundschule in Pliening

09/86-07/92 Besuch des Franz-Marc-Gymnasiums Markt Schwaben

09/92-07/95 Besuch des Edith-Stein-Gymnasiums München,
Abschluss: Abitur

10/95-07/02 Studium der Biologie an der LMU in München

09/01-07/02 Diplomarbeit mit dem Titel „Dreidimensionale Anordnung von Lysozymgendomäne und Chromosomenterritorien in hämatopoetischen Zell-Linien von *Gallus gallus*“ bei Prof. Dr. T. Cremer im Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München

12/02-08/06 Promotion zum Thema „Die humane 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase: Charakterisierungen des Enzyms und des Enzymdefektes“ bei PD Dr. med. W. Röschinger im Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der LMU München, vor der Fakultät für Biologie vertreten durch Frau Prof. Dr. E. Weiß

08/99-05/05 Studentische/wissenschaftliche Hilfskraft im Labor für Immungenetik der Kinderpoliklinik der LMU unter der Leitung von Prof. Dr. E. Albert

Publikationen

Stadler, S. C., Polanetz R., Maier E. M., Heidenreich S. C., Niederer B., Mayerhofer P.U., Lagler F., Liebl B., Fingerhut R, Olgemöller B., Muntau A. C-, Roscher A. A., Röschinger W. (2006) Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase: Population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. Hum Mut 27 (8): 748-759

Stadler S. C., Polanetz R., Meier S., Mayerhofer P. U., Herrmann J. M., Anslinger K., Roscher A. A., Röschinger W., Holzinger A. (2005) Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase. Biochem Biophys Res Commun 334 (3): 939-946

Stadler S., Schnapp V., Mayer R., Stein S., Cremer C., Cremer T., Dietzel S. (2004) The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. BMC Cell Biology 5 (1):44

Eidesstattliche Erklärung

Diese Dissertation wurde von PD Dr. med. Wulf Röschinger (Forschungszentrum Kubus, Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU, München) betreut. Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß vertritt diese Dissertation vor der Fakultät für Biologie.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Der in vitro Import-Assay und die dazugehörigen Abbildungen wurden von PD Dr. Johannes Herrmann und Stephan Meier vom Adolf Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU angefertigt.

Die 2D-Gele, die PMF-MALDI-Massenspektrometrie, die Aminoterminal Sequenzierung und die dazugehörigen Abbildungen wurden von der Firma TopLab, Martinsried erstellt.

München, den 14.6.06

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jörg Hübner', is written over a horizontal line.

Unterschrift