

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Mitochondrialer Import
und Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk
varianter Glutaryl-CoA-Dehydrogenase**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Daniel Engels

aus Pirmasens

2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Søren W. Gersting

Mitberichterstatter: PD Dr. D. Mokranjac

PD Dr. K. Hell

Prof. Dr. S. Lorenzl

Mitbetreuung durch den

habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

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

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Mitochondrium	1
1.1.1 Morphologie und Genetik	1
1.1.2 Der mitochondriale Proteinimport	2
1.2 Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel	7
1.2.1 Klinik	7
1.2.2 Diagnostik	8
1.2.3 Therapie	9
1.2.4 Glutaryl-CoA-Dehydrogenase	10
1.2.5 Pathomechanismus des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels	12
1.2.6 Genetik	12
1.3 Hypothesen	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Substanzen und Kits	14
2.1.2 Puffer und Medien	16
2.1.3 DNA- und Proteinstandards	19
2.1.4 Vektoren und cDNA	20
2.1.5 Antikörper	21
2.1.6 Organismen	22
2.1.7 Geräte	23
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.9 Software	25
2.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterienstämmen	26
2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i>	26
2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27

2.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	27
2.2.5	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.6	DNA-Gelelektrophorese	28
2.2.7	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29
2.2.8	Gateway-Klonierung	29
2.2.9	Mutagenese mittels PCR-basierter <i>site-directed mutagenesis</i>	31
2.2.10	Restriktionsverdau	35
2.2.11	Sequenzanalyse	35
2.3	Zellbiologische Methoden	36
2.3.1	Kultivierung von COS-7-Zellen	36
2.3.2	Kultivierung von COS-7-Zellen für SILAC	37
2.3.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	38
2.4	Proteinbiochemische Methoden	39
2.4.1	Proteinexpression	39
2.4.2	Proteinextraktion aus eukaryoten Zellen	40
2.4.3	Proteinextraktion aus prokaryoten Zellen	41
2.4.4	Proteinreinigung mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie	41
2.4.5	Zellfraktionierung	42
2.4.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	43
2.4.7	SDS-Gelelektrophorese	43
2.4.8	<i>Blue Native PAGE</i> (BN-PAGE)	43
2.4.9	Coomassie-Färbung von SDS- und BN-PAGE-Gelen	44
2.4.10	Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen	44
2.4.11	Western Blot	44
2.4.12	Dot Blot	47
2.4.13	<i>Transfection competition assay</i>	47
2.4.14	<i>Protein protection assay</i>	47
2.4.15	Fluoreszenzmikroskopie	48
2.4.16	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen	49

3	Ergebnisse.....	58
3.1	<i>Missense</i> -Mutationen führen zu einem reduzierten mitochondrialen Import der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase	58
3.1.1	Bestimmung der Prozessierung des Wildtyps und varianter GCDH	58
3.1.2	Korrelation zwischen Gesamtproteinmenge, p/m-Quotient und Position des Aminosäureaustausches varianter GCDH	61
3.1.3	Bestimmung der subzellulären Lokalisation des <i>precursors</i> sowie maturer GCDH.....	64
3.1.4	Bestimmung des Zusammenhangs von Expressionszeit und p/m-Quotient.....	68
3.1.5	Vergleich der Stabilität der pGCDH zwischen Wildtyp und Variante	70
3.1.6	Identifikation von Proteinen eines 90-kDa-Proteinkomplexes.....	71
3.2	Die Bindung der GCDH an die äußere Mitochondrienmembran ist unabhängig von der <i>mitochondrial targeting sequence</i>	75
3.2.1	Bestimmung der subzellulären Lokalisation MTS-deletierter GCDH-Varianten	75
3.2.2	Analyse der Bindung nukleär kodierter mitochondrialer Proteine an Mitochondrien <i>in vitro</i>	77
3.3	Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern der mGCDH.....	78
3.3.1	Hypothesenfreie Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern der mGCDH mittels <i>affinity purification coupled mass spectrometry</i> (AP-MS/MS)	79
3.3.2	Hypothesenbasierte Bestimmung cytosolischer Protein-Protein-Interaktionen nukleär kodierter mitochondrialer Proteine mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)	83
3.4	Variante GCDH zeigten veränderte Protein-Protein-Interaktionen mit dem Netzwerk cytosolischer molekularer Chaperone	94
3.4.1	Ko-Immunopräzipitation der GCDH mit Hsc70.....	94
3.4.2	Quantitative Analyse der Chaperon-Klient-Interaktion mittels <i>luminescence-based mammalian interactome assay</i> (LUMIER assay)	95
3.5	Die Stärke der Interaktion zwischen varianter GCDH und Hsc70 korreliert mit der Prozessierung der GCDH.....	99

3.5.1	Korrelation der Interaktionsstärke zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His und der Prozessierung der GCDH.....	99
3.5.2	p/m-Quotienten und LUMIER-Werte für die Protein-Protein-Interaktion zwischen Hsc70 und GCDH in Abhängigkeit der Hsc70-Aktivität.....	99
4	Diskussion.....	103
4.1	Der mitochondriale Proteinimport.....	104
4.2	Die Rolle des maturen Anteils nukleär kodierter mitochondrialer Proteine beim mitochondrialen Proteinimport.....	109
4.3	Das cytosolische Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk nukleär kodierter mitochondrialer Proteine.....	110
4.4	<i>Proteostasis regulators</i> und <i>pharmacological chaperones</i>	121
	Abbildungsverzeichnis.....	124
	Tabellenverzeichnis.....	127
	Abkürzungsverzeichnis.....	128
	Literaturverzeichnis.....	132
	Veröffentlichungen.....	155
	Danksagung.....	156
	Eidesstattliche Versicherung.....	157

Zusammenfassung

Zirka 99 % des mitochondrialen Proteoms sind nukleär kodiert. Mitochondriale Matrixproteine werden als Präkursor-Proteine im Cytosol synthetisiert und post-translational in das Mitochondrium importiert, um dort nach Abspaltung eines Signalpeptids in reife und funktionelle Proteine prozessiert zu werden [1]. Die cytosolischen molekularen Chaperone Hsc70 und Hsp90 binden kotranslational das Präkursor-Protein. Damit werden die Aufrechterhaltung eines ungefalteten Zustandes und die Übergabe an mitochondriale Importrezeptoren zur korrekten mitochondrialen Translokation gewährleistet [2-5]. Dennoch ist das Zusammenspiel von cytosolischen Proteinen, mitochondrialen Importrezeptoren und Präkursor-Proteinen nicht hinreichend untersucht [6, 7]. Die meisten monogenetischen mitochondrialen Erkrankungen basieren auf Mutationen in der nukleären DNA [8, 9]. Mutationsbedingte Veränderungen der Primärsequenz von cytosolischen Proteinen führen häufig zu Veränderungen ihrer Tertiär- und Quartärstruktur und in der Folge zu Störungen des Protein-Protein-Interaktionsnetzwerks der betroffenen Proteine [10-12]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass *Missense*-Mutationen in mitochondrialen Präkursor-Proteinen zu Veränderungen des cytosolischen Protein-Protein-Interaktionsnetzwerks führen, insbesondere zu Störungen der Interaktion mit Proteinen des Proteinhomeostasenetzwerks, die einen reduzierten mitochondrialen Import zur Folge haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss genetischer Variation auf den Import nukleär kodierter mitochondrialer Proteine charakterisiert. Es konnten cytosolische Mechanismen der Krankheitsentstehung am Beispiel des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels, basierend auf Mutationen im Gen der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH), aufgedeckt werden. Mutationen im maturen Anteil des Proteins können zu einem Importdefekt in das Mitochondrium führen. Es konnte gezeigt werden, dass der mature Anteil der GCDH, auch ohne Vorliegen einer mitochondrialen Signalsequenz am N-Terminus, eine Bindung an die Mitochondrienoberfläche vermitteln kann. Mittels massenspektrometrischer sowie lumineszenz- und fluoreszenzspektroskopischer Methoden konnte ein cytosolisches Interaktionsnetzwerk mitochondrialer Präkursor-Proteine identifiziert werden. Quantitative Interaktionsanalysen zeigten eine reduzierte oder aufgehobene Bindung varianter Präkursor-Proteine an die cytosolischen molekularen Chaperonen Hsc70 und Hsp90 sowie den löslichen mitochondrialen Importrezeptor Tom34. Die Stärke der Bindungen an Hsc70 war negativ korreliert mit dem Ausmaß des Importdefektes.

Es wird gefolgert, dass neben einem *loss of function* ein *loss of import* für variante nukleär kodierte mitochondriale Proteine als krankheitsauslösender Mechanismus relevant sein kann. Die Erkenntnisse rücken cytosolische molekulare Chaperone und deren Einfluss auf den mitochondrialen Import in den Fokus der Evaluierung neuer Therapiestrategien, beispielsweise durch den Einsatz von *proteostasis regulators*, die durch Regulation von mit GCDH interagierenden Proteinen des Proteinhomeostasenetzwerks wirken, oder (de-) stabilisierenden Substanzen, die die energetische Balance des mitochondrialen Präkursor-Proteins zugunsten eines effektiveren Importes modulieren. Die Charakterisierung des

mitochondrialen Importes varianter nukleär kodierter Proteine sowie ihres cytosolischen Interaktionsnetzwerks könnten als Parameter des molekularen Phänotyps zu einem besseren Verständnis von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen und des klinischen Verlaufs betroffener Patienten mit genetischen mitochondrialen Erkrankungen beitragen.

1 Einleitung

Als vor 2.000 Millionen Jahren *Alphaproteobacteriae* und methanogene *Archaea* fusionierten, war nicht vorherzusehen, ob diese Liaison dauerhaft den sich verändernden Umweltbedingungen standhalten könnte. Die Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre lag bei zirka 3 % und begann zu steigen [13]. Oxygenophobe, hydrogenophile *Archaea* boten den *Alphaproteobacteriae* Schutz und stellten einen Wasserstoff-Handelspartner dar. Im Gegenzug produzierten *Alphaproteobacteriae* Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid. Somit wurde eine interspezifische metabolische Brücke von *Archaea* zu *Alphaproteobacteriae* geschlagen und eine Symbiose etabliert [14]. Diese führte so weit, dass Wirt und Symbiont strukturell miteinander verschmolzen und durch Gentransfer beide Partner irreversibel zusammenschürte: Die eukaryote Zelle entstand [15]. Nachdem Metabolik, Morphologie und Genetik verschmolzen und vermischt wurden, bedurfte es einer Interaktion zwischen Wirt (dem phylogenetisch späteren Cytosol) und Symbiont (Mitochondrium). Dies beinhaltete einerseits den Transport von Metaboliten, andererseits den Austausch von Proteinen. Der genetische Bauplan dieser Proteine lag nun nicht mehr zwingend am selben Ort wie das Protein selbst. Durch die Notwendigkeit des Proteintransportes vom Wirt zum Symbionten mussten zelluläre Hilfsstrukturen, vornehmlich molekulare Chaperone, nicht nur die Reifung und Faltung neu synthetisierter Peptide unterstützen, sondern auch den Proteinimport von nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen koordinieren [16, 17].

Ziel dieser Arbeit ist es, Erkenntnisse über den Einfluss genetischer Variationen in nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen auf den mitochondrialen Proteinimport zu gewinnen. Hierbei liegt der Fokus auf dem Zusammenspiel des im Cytosol synthetisierten Präkursor-Proteins (*precursor*) mit anderen cytosolischen Proteinen, die über Protein-Protein-Interaktionen bei diesem Prozess eine unentbehrliche Rolle einnehmen. Dies soll an einem Krankheitsmodell eines Stoffwechseldefektes, dem Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, analysiert werden.

1.1 Das Mitochondrium

1.1.1 Morphologie und Genetik

Das Mitochondrium ist ein essenzielles Zellorganell der Eukaryoten, das sich in vier Subkompartimente unterteilt: Die äußere mitochondriale Membran (*outer mitochondrial membrane*, OMM), die innere mitochondriale Membran (*inner mitochondrial membrane*, IMM), den Intermembranraum (*intermembrane space*, IMS) sowie die mitochondriale Matrix (*mitochondrial matrix*, MM) [18]. Diese Morphologie folgt einer Theorie, wie eingangs aufgezeigt, bei der das Mitochondrium Produkt einer Inkorporation eines amitochondrialen Organismus in einen anderen sei, wobei sämtliche Membranen erhalten geblieben sind [19, 20]. Das bakterielle (mitochondriale) Genom ist nicht konserviert. Es fand eine Kondensation

des genetischen Materials des Symbionten statt [21]. Von den ursprünglich rund 630 Genen sind noch 13 im (humanen) mitochondrialen Genom (mtDNA) verblieben [22, 23]. Dies entspricht 1 % der zirka 1.000 mitochondrialen Proteine des Menschen [21]. Genetische Information wurde zwischen Nukleus und Mitochondrium ausgetauscht, sodass die Mehrheit aller mitochondrialen Proteine nukleär kodiert ist [24]. Verbleibenden Gene der mtDNA sind wahrscheinlich aufgrund der Lokalisation des resultierenden Proteins nicht in den Nukleus gewandert. Von 13 mitochondrial kodierten Proteinen sind 10 an Proteinkomplexen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) an der inneren Mitochondrienmembran beteiligt. Käme es zu einer cytosolischen Expression dieser Proteine, könnten diese aufgrund deren Hydrophobizität vom *signal recognition particle* (SRP) erkannt und ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert werden. Dies kann ein Grund für das Verbleiben des (relativ kleinen) mitochondrialen Genoms sein. Somit gewährt die Genlokalisierung die korrekte Proteinlokalisierung [23].

1.1.2 Der mitochondriale Proteinimport

Nukleär kodierte mitochondriale Proteine werden an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert. Verschiedene molekulare Mechanismen sind notwendig, um nukleär kodierte mitochondriale Proteine zum jeweiligen subzellulären Bestimmungsort zu transportieren. Es können je nach Bestimmungsort mitochondriale Matrixproteine von Proteinen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran und Proteinen des Intermembranraumes unterschieden werden. Die meisten dieser Proteine tragen am N-Terminus eine amphipatische, α -helikale, positiv geladene Extension aus 10 bis 60 Aminosäuren, die *mitochondrial targeting sequence* (MTS) [25, 26]. Die MTS vermittelt die Bindung des *precursors* an die Mitochondrienoberfläche und den Import in das entsprechende submitochondriale Kompartiment. Erreicht der *precursor* die mitochondriale Matrix, wird die MTS abgeschnitten, sodass ein matures Protein entsteht, das nach dem anschließenden Faltungsprozess seine Funktion ausführen kann [27].

Mit der MTS bindet der noch im Cytosol lokalisierte *precursor* an die Translokationsrezeptoren (*translocator of the outer mitochondrial membrane*, TOM) Tom20, Tom22 und Tom70 der Mitochondrienoberfläche [28, 29]. Tom20 ist der wesentliche Rezeptor zur Erkennung und Bindung der MTS. Tom22 ist als Co-Rezeptor essentiell für die Funktion von Tom20. Eine unterschiedliche Ligandenspezifität scheint wahrscheinlich, wenngleich deutliche Evidenz hierfür fehlt. Tom70 bindet Proteine ohne MTS, die die innere Mitochondrienmembran zum Translokationsziel haben [28]. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass mature Anteile von *precursors* von mitochondrialen Proteinen der inneren Mitochondrienmembran an die mitochondriale Oberfläche binden können [30]. Es sind vier verschiedene Importwege für nukleär kodierte mitochondriale Proteine bekannt. Nachdem *precursors* der Proteine, die in der mitochondrialen Matrix lokalisiert sind, die äußere Membran über den TOM-Komplex passiert haben, werden sie über den TIM-Komplex (*translocase of the inner membrane*) über die innere Mitochondrienmembran transportiert und erreichen mit Hilfe des *presequence translocase-associated motor* (PAM) die mitochondriale Matrix. Dort findet

eine Abspaltung der MTS durch die *mitochondrial processing peptidase* (MPP) statt. Proteine, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, werden ebenfalls über den TOM-Komplex importiert und mittels Tim22 sortiert. Proteine der äußeren Mitochondrienmembran gelangen über TOM-Komplex in den Intermembranraum und werden dort mittels der *sorting and assembly machinery* (SAM) zurück in die äußere Mitochondrienmembran transloziert. Intermembranproteine tragen spezifische Cystein-Motive und werden nach dem Import durch den TOM-Komplex im Intermembranraum durch die *mitochondrial import and assembly machinery* (MIM) gehalten [27].

Im Gegensatz zur Proteintranslokation in das endoplasmatische Retikulum ist davon auszugehen, dass der mitochondriale Import nukleär kodierter Proteine posttranslational stattfindet [31]. Eine spontane Faltung beziehungsweise Aggregation des *precursors* muss verhindert werden, da die Translokation in entfalteter Konformation durchgeführt wird [32, 33]. Dieser energetisch aufwändige Zustand wird durch molekulare Chaperone (*heat shock proteins*, Hsp) aufrechterhalten. Am besten charakterisiert sind die Hsc70/Hsp40- und Hsp90/p23-Systeme [34]. Hsp90 und Hsp70 komplexieren den *precursor* und binden an Tom70. Die mitochondriale Proteintranslokation kann ohne Hsp70 nicht initiiert werden, da es wesentlich als *unfoldase* agiert und (spontan) gefaltete Proteine nicht importiert werden können. Der eigentliche Mechanismus des Transports durch die mitochondriale Doppelmembran wird von Hsp70 dabei nicht beeinflusst [35, 36]. Die Bindung von Hsp70 an den *precursor* muss ko-translational stattfinden. Nach beendeter Synthese (und damit vollständiger Faltung des Polypeptids) kann Hsp70 eine Importkompetenz des *precursors* nicht mehr wahren [36, 37]. Die MTS des *precursors* ist eine Voraussetzung für die Bindung an Hsp70, das eine (vorzeitige) Faltung des *precursors* verhindert [38]. Die Notwendigkeit und Funktion des Ko-Chaperons Hsp40 für die mitochondrialen Proteintranslokation ist nicht vollkommen geklärt [37]. Neben Hsp70 bindet auch Hsp90 an mitochondriale *precursor* und fungiert in Zusammenarbeit mit Hsp70 als Ligand für den Tom70-Rezeptor auf der mitochondrialen Oberfläche [2, 4]. Dabei erkennt ein *tetratricopeptid repeat motif* des Tom70 exponierte hydrophobe Seitenketten des *precursors* [39, 40]. Es besteht ebenfalls eine Interaktion zwischen Hsp70 und Hsp90 sowie Hsc70 und Hsp90, vermittelt durch das Ko-Chaperon Sti1 [41-44].

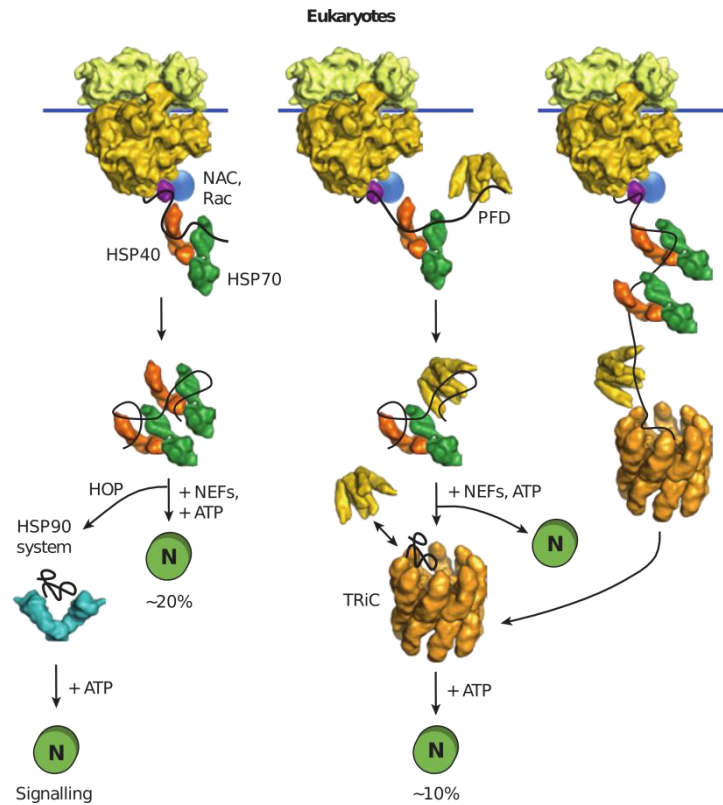


Abbildung 1: Mechanismus der kotranslationalen Proteininteraktion mit molekularen Chaperonen. Das am Ribosom (gelb) synthetisierte Polypeptid wird von Hsp70 (grün) gebunden. Hsp40 (rot) und NAC (blau) regulieren die Dephosphorylierung und damit die Freisetzung des Klienten. Nach der Hsp70-Interaktion wird der (noch ungefaltete) Klient entweder dem Hsp90-System (türkis) zum *signalling* oder *trafficking* oder dem TRiC (orange) zur finalen Faltung im Cytosol übergeben (aus [45]).

Wie alle acht Proteine der Hsp70-Klasse verfügt Hsc70, der konstitutiv exprimierte, cytosolische Vertreter der Hsp70-Familie, über eine N-terminale ATPase-Aktivität und eine C-terminale Polypeptidbindedomäne (Abbildung 1). Hsp40 (DnaJ im prokaryoten System) und ein *nucleotide exchange factor* regulieren diese Dephosphorylierung [45-47]. Nach ATP-Hydrolyse des an die Chaperone gebundenen Adenosintriphosphates und anschließender Freisetzung des *precursors* von Hsp70 oder aus dem Hsp70/Hsp90-Komplex an der mitochondrialen Oberfläche gelangt das Polypeptid in das Kanalprotein Tom40, welches die Translokation in entfaltetem Zustand durch die OMM erlaubt. Tom40 und dessen membranständige Rezeptoren (Tom20, Tom22 und Tom70) sowie die kleinen Tom-Proteine (Tom7, Tom6, Tom5) werden als TOM-Komplex zusammengefasst (Abbildung 2) [48]. Tom34 ist ein weiterer löslicher Importrezeptor, der mit dem Sti1-vermittelten Hsp70-Hsp90-Komplex und dem murenen Anteil des *precursors* interagiert und die Bindung an den membranständigen TOM-Komplex vermittelt [49, 50]. Der TOM-Komplex wurde detailliert in *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* studiert. Eine Strukturähnlichkeit zum humane TOM-Komplex ist anzunehmen [48].

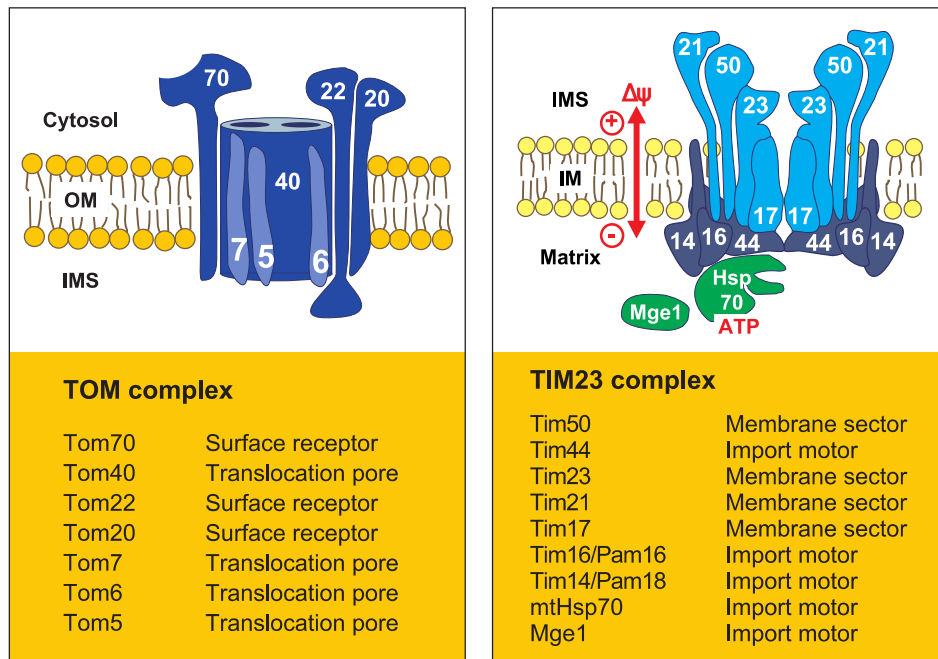


Abbildung 2: Architektur des TOM- und TIM-Komplexes. Der *translocase of the outer membrane complex* (TOM) setzt sich aus dem Fassprotein Tom40 mit dessen Untereinheiten Tom7, Tom5 und Tom6 sowie den Rezeptoren Tom70, Tom22 und Tom20 zusammen. Der *translocase of the inner mitochondrial membrane complex* (TIM) besteht aus einer Transmembrandomäne (*membrane sector*) sowie löslichen Anteilen in der mitochondrialen Matrix (*import motor*). Letztere sind hauptsächlich für die Hydrolyse des ATPs verantwortlich, welche neben dem elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\psi$) als Energiequelle für den Import dient (aus [48]).

Die *translocase of the inner mitochondrial membrane* (TIM) ermöglicht den Transport des mitochondrialen *precursors* durch die IMM. Der TIM-Komplex lässt sich in einen strukturellen und funktionellen Anteil unterteilen: Tim50, Tim23, Tim21 und Tim17 formen den integralen Kanalproteinkomplex, durch den der *precursor* transloziert wird. Tim44, Tim16, Tim14, mtHsp70 und Mge1 (GREPL1 in *H. sapiens*) fungieren als Importmotor (Abbildung 2) [48, 51]. Im Gegensatz zum Transport durch die OMM ist die Translokation des *precursors* durch die IMM energieabhängig. Zur Öffnung des Tim23 ist ein elektrisches Membranpotential ($\Delta\psi$) notwendig. Des Weiteren dient der Spannungsgradient über der IMM als Voraussetzung einer elektrophoretischen Kraft, die den *precursor* mechanisch bewegt. Hat der N-Terminus die mitochondriale Matrix erreicht, so wird durch eine Hydrolyse von ATP eine Konformationsänderung des mtHsp70 induziert, welches den *precursor* in die mitochondriale Matrix zieht. Die Hydrolyse ist reguliert über das Ko-Chaperon Tim14 und den *nucleotide exchange factor* mge1 (Abbildung 3) [50, 52]. Die Bindung der MTS und maturer Anteile des *precursors* an mtHsp70 gewährleisten hierbei die Irreversibilität der Proteintranslokation; so würde bei einer partiellen Translokation ohne mechanischen Zug seitens der mitochondrialen Matrix das zu translozierende Protein den TIM- und TOM-Komplex wieder in Richtung Cytosol verlassen [53].

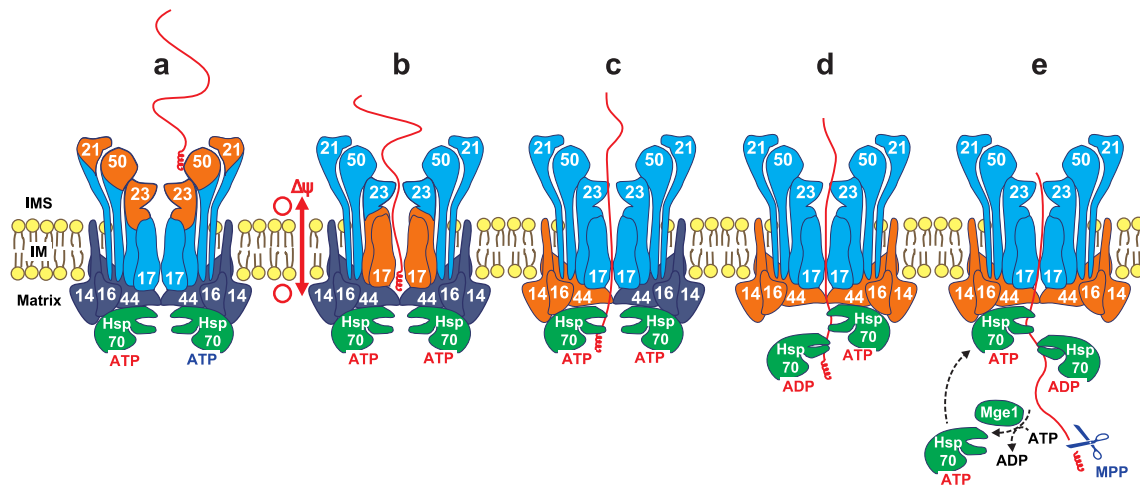


Abbildung 3: Mechanismus der TIM-vermittelten IMM-Translokation. Nach erfolgreicher Initiierung der IMM-Translokation durch Signalsequenzen des Klienten (a) folgte die spannungsabhängige Translokation durch die Faserstrukturen des TIM-Komplexes (b). Mitochondriales Hsp70 (mtHsp70) fungiert mit dessen hydrolytischer Aktivität als ATP-abhängiger Motor seitens der mitochondrialen Matrix (c). Hierbei agieren mehrere mtHsp70-Moleküle durch Dissoziation vom TIM-Komplex synergistisch (d). Schließlich wird die *mitochondrial targeting sequence* (MTS, spiralförmig) durch die *mitochondrial processing peptidase* (MPP) prozessiert (e) und das Polypeptid dem Faltungsapparat übergeben (aus [48]).

Nach erfolgreicher Translokation des *precursors* wird die N-terminale MTS durch die Metalloendoprotease *mitochondrial processing peptidase* (MPP) hydrolytisch gespalten. Einige importierte Proteine werden des Weiteren durch die *intermediate cleaving peptidase 55* (Icp55) und die *mitochondrial intermediate peptidase* (Oct1) um eine weitere Aminosäure beziehungsweise ein Octapeptid verkürzt [54, 55]. Dabei wird die instabilisierende MTS entfernt, die Halbwertszeit des Proteins nimmt dadurch zu [56]. Die abgespaltenen Peptide werden entweder weiter degradiert (durch die *presequence peptidase*) oder über den ABC-Membrantransporter Mdl1 aus dem Mitochondrium exportiert [54, 57].

Das prozessierte mitochondriale Protein muss nach der Translokation gefaltet werden, um dessen katalytische oder strukturelle Funktion auszuüben und Aggregation zu verhindern. Für diesen Prozess ist das molekulare Chaperon Hsp60 notwendig [58]. Hsp60 (GroEL in Prokaryonten) setzt sich aus einem 800 bis 900 kDa Doppelringkomplex zusammen, der zusammen mit Hsp10 (GroES im prokaryoten System) eine fassähnliche Struktur bildet. Ungefaltete Substratproteine mit einer Masse bis zu 60 kDa können durch hydrophobe Seitenketten der apikalen Struktur gebunden werden. Die Hydrolyse von ATP erlaubt das Schließen der Struktur durch Hsp10 (GroES), sodass das zu faltende Protein vollständig gegenüber den hydrophilen, negativ geladenen Seitenketten im Inneren der *cis*-Seite des Hsp60 (GroEL) exponiert wird. Nach etwa zehn Sekunden und nach abgeschlossener Hydrolyse von 7 Molekülen ATP dissoziiert ein zuvor gebundenes Protein auf der *trans*-Seite von Hsp10 (GroES) [45, 59-61].

1.2 Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel

Der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel (MIM# 231670) ist eine angeborene Stoffwechselstörung, dem ein Funktionsverlust des mitochondrialen Enzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH, EC 1.3.99.7) zugrunde liegt [62]. Die Glutaryl-CoA-Dehydrogenase katalysiert die FAD-abhängige oxidative Decarboxylierung des beim Katabolismus von Lysin, Hydroxylysin und Tryptophan anfallenden Glutaryl-CoA zu Crotonyl-CoA und CO₂ [63]. Ein mutationsinduzierter Verlust der enzymatischen Aktivität der GCDH führt zur Akkumulation des Substrats Glutaryl-CoA sowie der sekundär entstehenden 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA), Glutaconsäure und Glutarylcarnitin. Im Rahmen des Neugeborenen Screenings auf angeborene Stoffwechselstörungen können diese Metabolite im Serum des Patienten mittels Tandem-Massenspektrometrie nachgewiesen werden.

1.2.1 Klinik

Bei Geburt können betroffenen Neugeborene durch eine Makrozephalie klinisch auffällig werden. Jenseits der Makrozephalie bestehen bei den meisten Patienten keine weiteren Symptome [64, 65]. Unbehandelt entwickeln die meisten Patienten im Alter zwischen 3 und 6 Jahren dystonisch-dyskinetische Bewegungsstörungen [66]. Die Symptomatik manifestiert sich meist im Kontext einer enzephalopathischen Krise, ausgelöst durch eine katabole Stoffwechsellaage bei Gastroenteritiden, respiratorischen Infekten, Impfungen oder chirurgischen Eingriffen [64]. Die Morbidität und Mortalität der Patienten mit enzephalopathischer Krise ist hoch und korreliert mit der Anzahl der Krisen [62, 67]. Die Ausbildung der Bewegungsstörung ist prognosebestimmend [68]. Die Bewegungsstörung ist in der Regel irreversibel und geht häufig mit schwerer körperlicher Behinderung einher. Die Dyskinesie kann ebenso die Schlundmuskulatur betreffen und zu Dysphagie führen [65]. Es wurden zwei weitere klinische Verlaufsformen beschrieben, bei denen neurologische Defizite ohne enzephalopathische Krisen auftreten [68, 69]. Die *insidious onset*- sowie *late onset*-Verlaufsform. Patienten mit diesen Verlaufsformen zeigen eine geringere striatale Atrophie und weniger Dystonie verglichen mit Patienten mit enzephalopathischer Krise [68]. Neben den neurologischen Symptomen besteht Evidenz, dass einige Patienten zusätzlich eine chronische Niereninsuffizienz entwickeln könnten [70].

In der Magnetresonanztomographie zeigen sich eine bifrontotemporale Atrophie oder Hypoplasie, erweiterte prätemporale Subarachnoidalräume und zystische Strukturen [65]. Während der enzephalopathischen Krise ist eine T2-Hyperintensität als Zeichen eines Ödems in den Basalganglien erkennbar [65]. Im Verlauf entwickelt sich häufig eine Atrophie des Striatums, eine Ventrikulomegalie sowie eine mikroenzephal Makrozephalie [66, 71]. Diese können von subduralen Hygromen und Blutungen begleitet werden [65].

Busquets *et al.* kategorisieren die Verlaufsformen wie folgt: Ein schwerer Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel ist durch eine statische oder progressive Dystonie gekennzeichnet, bei der Aufstehen, Laufen oder Sprechen unmöglich sind (i). Als mittelschwer wird eine

klinische Präsentation mit Dystonie bezeichnet, bei der jedoch die Fähigkeit des Laufens erhalten bleibt (ii). Die milde Verlaufsform zeigt eine neurologische Symptomatik, die ein normales Leben ermöglicht (iii). Asymptomatisch sind jene Patienten, die keine dystone Bewegungsstörungen entwickeln trotz genetischer oder laborchemischer Auffälligkeit (iv) [72]. Neben dem klinischen Phänotyp kann ein klinisch-biochemischer Phänotyp definiert werden. Dieser beschreibt das Ausmaß der renalen Glutarsäure- und 3-Hydroxyglutaratexkretion. Es wird zwischen *high excretors* ($\geq 100 \text{ mmol GA/mol Kreatinin}$) und *low excretors* ($< 100 \text{ mmol GA/mol Kreatinin}$) unterschieden [73]. Der Genotyp basiert auf einer Mutationsanalyse des GCDH-Gens. Bei mehr als der Hälfte der Patienten ist keine GCDH-Aktivität in Fibroblasten nachweisbar [74]. Folglich eignet sich die Bestimmung des Genotyps zur Diagnosesicherung. Schillaci *et al.* beschrieben zwei Fälle von *low excretors*, die nicht über das Neugeborenen-Screening als Patienten identifiziert wurden. Die Bestimmung des Genotyps zur Diagnosestellung ist in solchen Fällen die verlässliche Methode [75]. Des Weiteren ist die Exkretion der Intermediärmetabolite Glutarsäure und 3-Hydroxyglutarat negativ von der GCDH-Restenzymaktivität abhängig. Somit besteht eine Korrelation zwischen Genotyp, Restenzymaktivität und klinisch-biochemischem Phänotyp [64, 74]. Der klinische Phänotyp korreliert hingegen nicht mit der Menge an ausgeschiedener Glutarsäure und 3-Hydroxyglutarat. Zwischen den *low excretors* und *high excretors* besteht kein Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit oder des Alters des ersten Auftretens einer enzephalopathischen Krise, der (motorischen) Lebenseinschränkung oder der Morbidität [64]. Ein klinischer Verlauf kann demnach nicht anhand des Genotyps, der Restenzymaktivität oder der renalen Glutarsäure- beziehungsweise 3-Hydroxyglutaratausscheidung vorhergesagt werden [76].

1.2.2 Diagnostik

Seit Mai 2005 wird in Deutschland zur Diagnose angeborener Stoffwechselstörungen das Neugeborenen-Screening durchgeführt. Der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel ist eine von 14 Erkrankungen, die mit diesem Verfahren früh erfasst werden sollen [77, 78]. Hierfür wird dem Neugeborenen zwischen der 36. und 72. Lebensstunde Fersenblut entnommen und auf einer Filterkarte als Trockenblutprobe asserviert. Zum Ausschluss eines Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels wird Glutarylcarnitin (C5DC) mittels Tandem-Massenspektrometrie bestimmt [66, 79]. Wird eine erhöhte C5DC-Konzentration gemessen, so soll dieser Befund durch ein erneutes Messen aus demselben Material bestätigt werden. Des Weiteren soll eine quantitative Bestimmung des C5DC sowie der GA und 3-OH-GA aus Blut und Urin mittels GC/MS erfolgen [66]. Da einige Patienten aufgrund zu niedriger C5DC-Konzentrationen nicht identifiziert werden konnten, kann mittels dieser Methode die diagnostische Sensitivität gesteigert werden [80-82]. Falsch-positiv gemessene C5DC-Konzentrationserhöhungen sind beim Vorliegen einer anderen Stoffwechselstörung möglich. So unterscheiden sich die Massenspektren der C5DC und dem Hydroxydecanoylcarnitin kaum [83]. Hydroxydecanoylcarnitin fällt bei MCAD-Mangel an und kann als Hinweis auf einen Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel fehlgedeutet werden. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Serumakkumulation des renal eliminierten C5DC bei kongenitalen Nephropathien [84]. Das

Neugeborenen-Screening auf Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel hat somit eine hohe diagnostische Sensitivität (95,6 %) bei reduzierter Spezifität [68]. Zur Diagnosestellung erfolgt neben der quantitativen Messung der akkumulierenden Metaboliten eine Mutationsanalyse. Werden zwei krankheitsassoziierte Mutationen nachgewiesen, darf die Diagnose des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels gestellt werden. Wird nur eine krankheitsassoziierte Mutation nachgewiesen, so erfolgt die enzymatische Aktivitätsbestimmung aus Fibroblasten des Patienten. Zeigt sich hierbei eine normale GCDH-Enzymaktivität, so kann die Diagnose des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels verworfen werden [66].

1.2.3 Therapie

Bei einem positiven Screeningergebnis (auf C5DC) sowie einer erhöhten Konzentration von GA und 3-OH-GA in Serum und Urin sollte umgehend eine Therapie initiiert werden [66]. Durch einen frühen Therapiebeginn kann eine enzephalopathische Krise abgewendet werden [85, 86]. Die Therapie basiert auf drei Säulen: Einer lysinarmen Diät (i), einer pharmakologischen Therapie zur forcierten Glutarsäureexkretion mit L-Carnitin (ii) und einer Notfalltherapie zu Deeskalation kataboler Stoffwechsellagen (iii). Die adäquate und konsequente Therapie ist mit einem besseren neurologischen Verlauf assoziiert und eine adhärenztherapie ein stärkerer positiver Prädiktor als biochemische oder genetische Charakterisierungen [62, 68]. Die Behandlung sollte von einem multidisziplinären Team durchgeführt werden, da dies ebenso positiv den Krankheitsverlauf beeinflussen kann [80].

Ziel der diätischen Therapie ist es, die Zufuhr von metabolischen Vorstufen der Glutarsäure und 3-Hydroxyglutarsäure zu minimieren. Die lysinarme Diät wird mit einer lysinfreien und tryptophanarmen Aminosäuremischung supplementiert, um einer Malnutrition vorzubeugen. Das Verabreichen von Muttermilch ist nach vorausgehender Gabe der Aminosäuremischung zur Reduktion der Lysinaufnahme angebracht. Bis zum sechsten Lebensjahr sollte eine lysinarme Diät eingehalten werden. Nach dem sechsten Lebensjahr sollte eine altersadaptierte Diät mit kontrollierter Eiweißzufuhr erfolgen. Langzeitergebnisse des Erfolgs dieses Therapieregimes sind jedoch noch ausstehend [66].

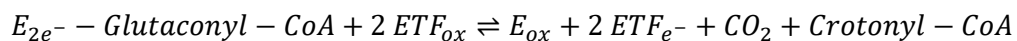
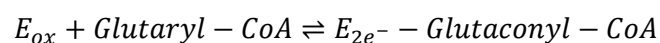
Neben der diätischen Therapie wird eine lebenslange Pharmakotherapie mit L-Carnitin empfohlen [66]. Aufgrund der gesteigerten Konjugation der anfallenden Glutarsäure an L-Carnitin und Exkretion von C5DC findet sich ein sekundärer Mangel des Plasma-L-Carnitin [87]. Dies hat zur Folge, dass intrazellulär das Verhältnis von Acyl-CoA zu Acylcarnitinen verändert ist [88]. Pharmakologisch wird diesem Mechanismus durch die orale Supplementation von L-Carnitin entgegengewirkt. Ziel ist es, nach einer Therapieinitiation mit 100 mg L-Carnitin /kg pro Tag die Aufrechterhaltung eines (laborchemisch) normalen L-Carnitin-Plasmaspiegels mit 50 mg L-Carnitin/kg pro Tag zu gewährleisten [62].

Ziel einer Notfalltherapie ist die Umkehr der katabolen Stoffwechsellage mittels hochdosierter intravenöser Glukosezufuhr, der forcierten Detoxifikation mit L-Carnitin-Supplementation, der Verminderung der Produktion der akkumulierenden Substanz durch eine

proteinfreie Diät sowie der Korrektur einer eventuell derangierten Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz [66, 89, 90]. Die Therapie sollte umgehend nach der Diagnosestellung begonnen werden, um neurologische Spätfolgen zu reduzieren [80, 91].

1.2.4 Glutaryl-CoA-Dehydrogenase

1975 konnte bei einem Geschwisterpaar mit Dystonie, Opisthotonus und Athetose erstmals eine erhöhte Urinausscheidung an Glutarsäure gemessen werden. Die Exkretion war nach L-Lysin-Gabe erhöht und konnte durch proteinarme Diät reduziert werden. In Fibroblasten der Patienten wurde isotopenmarkiertes Glutaryl-CoA mit reduzierter Kinetik metabolisiert, was einen Funktionsverlust der GCDH, welche Glutaryl-CoA physiologischerweise umsetzt, vermuten ließ [92-95]. Das *GCDH*-Gen wurde von Biery *et al.* und Schwartz *et al.* beschrieben [96, 97]. 1986 wurde das Enzym GCDH erstmals charakterisiert [98]. GCDH liegt als Homotetramer vor und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Das Enzym nutzt Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Kofaktor und speist Reduktionsäquivalente über das *electron-transferring flavoprotein* (ETF) in die Atmungskette ein. Die Länge der Primärsequenz des Monomers beträgt 438 Aminosäuren und die Untereinheit hat eine molare Masse von 43,3 kDa [99]. Das als *precursor* synthetisierte Monomer wird zwischen Serin an der Position 44 und Arginin der Position 45 der Primärsequenz nach Translokation in das Mitochondrium durch die MPP prozessiert, sodass mature GCDH entsteht. Die GCDH ist demnach ein nukleär kodiertes mitochondriales Matrixprotein. GCDH und Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD, EC 1.3.99.3), einer Acyl-CoA-Dehydrogenase mit Substratspezifität für mittellangkettige Fettsäuren, zeigen eine Sequenzhomologie von 28 % [100]. Der Reaktionsmechanismus der GCDH ist anderen Acyl-CoA-Dehydrogenasen ähnlich [101, 102], durch die Abspaltung von Sauerstoff wird eine Doppelbindung eingefügt zwischen C2 und C3 des Substrats, so dass als Zwischenprodukt Glutaconyl-CoA entsteht. Zusätzlich verfügt die GCDH über eine katalytische Decarboxylaseaktivität, die unter Abspaltung von CO₂ Glutaconyl-CoA in Crotonyl-CoA überführt:



Die Kristallstruktur der GCDH zeigt die (Struktur- und Funktions-) Verwandtschaft zu acht weiteren Acyl-CoA-Dehydrogenasen [63]. GCDH besitzt allerdings als einzige Acyl-CoA-Dehydrogenase eine katalytische Funktion zur Decarboxylierung, die enzymatisch nicht an die Dehydrierung gekoppelt ist. Die Struktur des Monomers besteht aus drei Domänen: einer N-terminalen α -helikalen Domäne (blau), gefolgt von einer β -Faltblattstruktur (orange), die in eine C-terminale α -helikale Domäne (grün) mündet (Abbildung 4). Die homotetramere Quartärstruktur setzt sich symmetrisch aus einem Dimer zweier Dimere zusammen. Dabei sind 30 % der Oberfläche eines einzelnen Monomers zur Innenseite des Tetramers gewandt. Die Oligomerisierungsdomäne der GCDH befindet sich am C-Terminus [103].

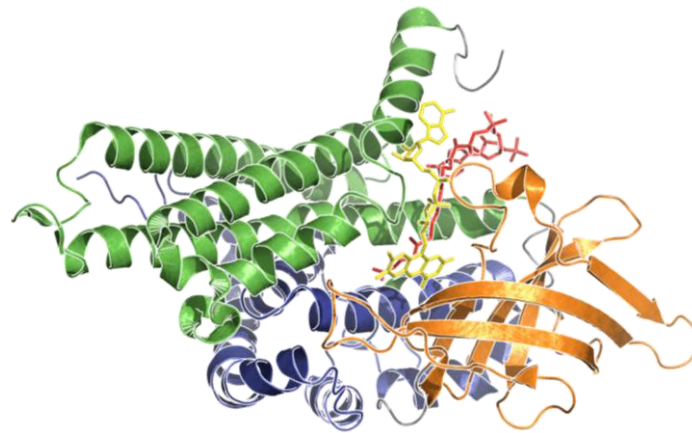


Abbildung 4: Kristallstruktur der GCDH. Die N-terminale α -helikale Domäne ist blau, die mittlere β -Faltblatt-Domäne orange und die C-terminale α -helikale Domäne grün dargestellt. Es zeigt sich ein gebundenes Molekül des Kofaktors FAD (gelb) sowie des Substrates (rot) (PDB ID: 1SIQ).

Das Substrat Glutary-CoA ist zwischen dem Ko-Faktor FAD und Glu370 eingebettet. Arg96 stabilisiert das als Zwischenprodukt entstehende Crotonyl-CoA-Anion, bevor es durch Glu370 protoniert wird (Abbildung 5). Glu87, Ser95, Thr170 und Thyr369 vermitteln die Orientierung des Substrates für die Decarboxylierung. Ist das Substrat nicht gebunden, so ist das aktive Zentrum um Glu370 von drei Wassermolekülen besetzt, die durch die höhere Affinität des Glutaryl-CoAs zum aktiven Zentrum im Falle einer notwendigen Substratumsetzung verdrängt werden [63]. Die Struktur des aktiven Zentrums wird von Aminosäureresten der N-terminalen α -Helix (Glu87, Arg94 und Ser95) und C-terminalen α -Helix (Tyr369 und Glu370) gebildet.

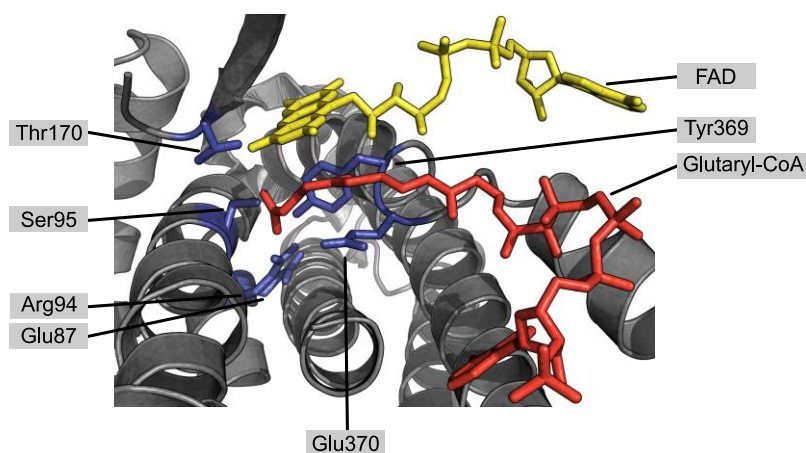


Abbildung 5: Das aktive Zentrum der GCDH. Im aktiven Zentrum gebundenes Substrat (rot) wird vom Kofaktor FAD (gelb) und Glu370 flankiert. Glu87, Arg94, Ser95, Thr170 und Tyr369 binden und stabilisieren das Substrat (PDB ID: 1SIQ).

1.2.5 Pathomechanismus des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels

Bei einem Funktionsverlust der GCDH kommt es zu einer Akkumulation von Glutaryl-CoA. Intrazellulär wird vermehrt Glutaryl-CoA an freies Carnitin durch die Carnitin-Acylcarnitin-Transferasen (CPTI, CPTII) verestert. Der intrazelluläre Mechanismus der Hydroxylierung zu 3-Hydroxyglutarsäure (3-OH-GA), die im Urin des Patienten nachgewiesen werden kann, ist unklar [104]. Die GCDH wird vor allem hepatisch und renal exprimiert. Im zentralen Nervensystem findet sich eine inhomogene Verteilung: Im Cortex und Striatum ist die Menge des Enzyms im Gegensatz zu anderen ZNS-Geweben gering. Beachtet man die morphologisch-strukturellen Veränderungen des ZNS bei Patienten mit Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, die sich vor allem im Striatum finden, ist dies paradox [105]. Im Mausmodell führte exogen zugeführte GA und 3-OH-GA nicht zu einer Konzentrationserhöhung im ZNS [106]. Es wird deshalb der Mechanismus des *trapping* aufgeführt: Trotz geringer GCDH-Expression in den Basalganglien findet sich intrazellulär eine erhöhte Konzentration von 3-OH-GA durch eine reduzierte Membranpermeabilität der Substanz [104, 107]. 3-Hydroxyglutarat kann über den *Na⁺-dependent dicarboxylate cotransporter* NaDC3 eine biologische Membran passieren und den *organic cation transporter* OCT2 inhibiert [108]. Erhöhte Konzentrationen der Glutarsäure und des 3-Hydroxyglutarat können den Export von Succinat aus Astrozyten vermindert [109]. Es wird gefolgert, dass die Anaplerotik des Zitratzyklus in (striatalen) Neuronen vermindert sein könnte. Sekundär kann dieser Mechanismus zu einer verminderten ATP-Synthese und zur Apoptose führen. Zusätzlich zeigt 3-Hydroxyglutarat einen Einfluss auf die Morphologie und Neogenese von Gefäßen, was die Genese der chronischen subduralen Hämorrhagie erklären kann [110].

1.2.6 Genetik

Der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel wird autosomal-rezessiv vererbt. Das *GCDH*-Gen befindet sich auf Chromosom 19p13.2 [111]. Es setzt sich aus einer 7 kb Komposition von 11 Exons und 10 Introns zusammen [96, 97, 112]. Bis dato wurden 137 *Missense*- oder *Nonsense*-Mutationen beschrieben [113]. Der Genotyp der Patienten ist stark variierend mit einer niedrigen Frequenz der meisten Mutationen [114]. Es finden sich nur wenige prävalente Mutationen in umschriebenen Kohorten: c.1298C>T (p.A421V) unter den Amischen in Pennsylvania und c.743C>T (p.P248L) sowie c.1093G>A (p.E365K) unter der türkischen Bevölkerung [96, 114]. Die häufigste Mutation ist c.1240C>T (p.R402W) mit einer Allelfrequenz von 12 bis 16 %. Sie ist vor allem in Europa vertreten [115]. Die beschriebene Genetik führt zu einer weltweiten Prävalenz von 1:100.000 Neugeborenen mit ungleicher Verteilung respektive der ethnischen Zugehörigkeit [68, 116-120].

1.3 Hypothesen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den mitochondrialen Import sowie das cytosolische Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk varianter nukleär kodierter mitochondrialer Proteine zu untersuchen. Es wird angenommen, dass die Beobachtung dieser Mechanismen ein weiterer Aspekt zur Aufschlüsselung der Pathogenese von monogenetischen Erkrankungen, denen variante nukleär kodierte mitochondriale Proteine ursächlich sind, sein kann. Es ist bekannt, dass *Missense*-Mutationen, wie sie bei diesen Erkrankungen vorkommen können, zu einer reduzierten Proteinstabilität mit Fehlfaltung oder Aggregation führen können [121]. Der Faltungszustand eines Proteins ist beim mitochondrialen Import wichtig. Um erfolgreich importiert werden zu können, müssen mitochondriale Präkursor-Proteine in einem ungefalteten Zustand gehalten werden [32, 33]. Strukturelle Veränderungen des Proteins, wie sie durch Mutationen ausgelöst werden können, können dementsprechend einen Einfluss auf den mitochondrialen Import haben. Des Weiteren sind Protein-Protein-Interaktion für den mitochondrialen Import unerlässlich, da sie den korrekten Faltungszustand des Proteins während der Proteintranslokation gewährleisten und dessen Übergang vom Cytosol zur mitochondrialen Membran durch Bindung an mitochondriale Importrezeptoren vermitteln [6, 34, 48, 122]. Es wurde gezeigt, dass *Missense*-Mutationen in der Sequenz des zu importierenden Proteins die Protein-Protein-Interaktion zu molekularen Chaperonen verändern können [123]. Die *Missense*-Mutationen der GCDH sind alle im maturen Anteil der Proteinprimärsequenz lokalisiert [113]. Daraus lassen sich folgende Hypothesen ableiten:

- A. *Missense*-Mutationen führen zu einem veränderten mitochondrialen Import varianter nukleär kodierter mitochondrialer Proteine im Vergleich zu Wildtyp-Proteinen.
- B. Der mature Anteil nukleär kodierter mitochondrialer Proteine hat einen Einfluss auf den mitochondrialen Import.
- C. Variante nukleär kodierte mitochondriale Proteine zeigen ein verändertes Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk verglichen zu Wildtyp-Proteinen.
- D. Der mature Anteil nukleär kodierter mitochondrialer Proteine hat, neben der N-terminalen mitochondrialen Signalsequenz, einen Einfluss auf die Interaktion mit molekularen Chaperonen.
- E. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem veränderten mitochondrialen Import varianter nukleär kodierter mitochondrialer Proteine und deren Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk im Cytosol.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen und Kits

Sofern nicht anders angegeben wurden die Substanzen in *pro analysi* Qualität verwendet. Kits und Reagenzien wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt und gelagert. Sofern nicht abweichend angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaG (Darmstadt, Deutschland), Biorad (Hercules, USA) und Roche (Basel, Schweiz) bezogen. Antibiotika wurden als konzentrierte Stammlösung präpariert, bei -20 °C gelagert und den Medien kurz vor Verwendung in entsprechender Menge zugesetzt.

Substanz	Lösung
Ampicillin (#13399, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	50 mg/ml in Wasser
Kanamycin (#26899, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	10 mg/ml in Wasser
Chloramphenicol (#16785, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	34 mg/ml in Ethanol
Spectinomycin (#35294.01, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	10 mg/ml in Wasser

Tabelle 1: Antibiotische Substanzen.

Die verwendeten Enzyme wurden bei -20 °C gelagert. Restriktionsendonukleasen wurden gemäß Herstellerprotokoll mit entsprechendem Puffer der DNA-Lösung zugesetzt und für 30 min (*fast digest*) beziehungsweise 90 min (konventionelle Enzyme) bei 37 °C inkubiert. Kits wurden nach Herstellerangaben gelagert und eingesetzt.

Kit	Produkt
Proteasen	Proteinase K, <i>Tritirachium album</i> (#539480, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) Zymolyase (#E1004, Zymo Research, Irvine, USA) Trypsin, recombinant, Proteomics Grade (#03708985001, Roche, Basel, Schweiz)
Proteaseinhibitoren	cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail (#11836153001, Roche, Basel, Schweiz)
Rekombinasen	Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix (#11789021, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (#11791020, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Restriktionsendonukleasen	FastDigest Xba1 (#FD0684), FastDigest Sal1 (#FD0644) und Eco321 (EcoRV) (#ER0301, alle Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Bradford-Reaktion	Quick Start™ Bradford Protein Assay (#5000201, Biorad, Hercules, USA)
zellfreie Expression	TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System (#L1170, Promega, Madison, USA)
Chemilumineszenz	ECL Western Blotting Substrate (#32106, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34095, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Coomassie-Farbstoff	Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution (#1610436, Biorad, Hercules, USA)
BN-PAGE	NativePAGE™ 5 % G-250 Sample Additive (#BN2004, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
DNA-Präparation	Plasmid mini Prep Kit I, peqGOLD (#732-2780, Peqlab, Radnor, USA) QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (#12943, QIAGEN, Hilden, Deutschland)
PCR	KAPAHiFi™ PCR Kit (#733-2428, VWR, Erlangen, Deutschland)
DNA-Gelextraktion	QiAquick Gel Extraction Kit (#28704, QIAGEN, Hilden, Deutschland)
Mitochondrienisolierung	Mitochondria Isolation Kit, human (#130-094-532, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

Immunopräzipitation (LUMIER)	Protino® 96 Ni-NTA (745425.1, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
------------------------------	---

Tabelle 2: Kits und Verbrauchsmaterialien.

2.1.2 Puffer und Medien

Sämtliche Puffer und Medien wurden mit destilliertem Wasser hergestellt. Puffer wurden vor Verwendung filtriert und entgast, Medien autoklaviert und bei 4 °C oder -20 °C gelagert. Reduzierende oder instabile Substanzen sowie Enzyme wurden direkt vor Verwendung in entsprechender Konzentration der Lösung hinzugegeben.

2.1.2.1 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
SEM-Puffer	250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS-KOH (pH 7,2)
Lösung A	0,25 mM Sucrose, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1,5 mM mgCl ₂ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 0,1 mM PMSF
Transfektionspuffer	4,2 mM Ca(NO ₃) ₂ , 5,4 mM KCl, 4,1 mM mgSO ₄ , 103 mM NaCl, 23,8 mM NaHCO ₃ , 5,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 11,1 mM D(+)-Glucose, 20 mM HEPES (pH 7,3), 3,3 µM Glutathion, N ₂ -Begasung für 60 min/l Lösung
Lysepuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 % (v/v) Glycerol, 1 % (v/v) IGEPAL CA-630, 1 mM mgCl ₂
Puffer 1	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (v/v) IGEPAL CA-630
Puffer 2	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 % (v/v) Glycerol
Trypsin-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 M Urea, 1mM DTT
Elutionspuffer (<i>on-column-digestion</i>)	50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 M Urea, 5 mM Chloroacetamid
Urea-Puffer	50 mM Tris (pH 7,6), 8 M Urea

Säulenpuffer (Affinitätschromatographie)	20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
SEC-Puffer	20 mM HEPES (pH 7,0), 200 mM NaCl
Maltose-Puffer	10 mM Maltose, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Entfärbelösung	25 % (v/v) Methanol, 12,5 % (v/v) Essigsäure
HEPES-Puffer	20 mM HEPES, 200 mM NaCl
TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl (pH 8,0), 89 mM Na ₃ BO ₃ , 2mM EDTA-Na ₂
Homogenisierungspuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 600 mM Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2 % (w/v) BSA
Zymolyase-Puffer	20 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4), 1200 mM Sorbitol
DTT-Puffer	100 mM Tris-H ₂ SO ₄ (pH 9,4), 10 mM Dithiothreitol
Transferpuffer	25 mM Tris (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol
MOPS-Laufpuffer	NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (#NP0001, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
BN-PAGE-Anodenpuffer	NativePAGE™ Running Buffer (20x) (#BN2001, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
BN-PAGE-Kathodenpuffer	NativePAGE™ Cathode Buffer Additive (20x) (#BN2002, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
LDS-Puffer	NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (#NP0007, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
BN-PAGE-Puffer	NativePAGE™ Sample Buffer (4x) (#BN2003, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Stripping Puffer	Restore™ Western Blot Stripping Buffer (#21059, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)

DNA-Ladungspuffer	Gel Loading Buffer (#G2526-5ML, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
SDS-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 % SDS (w/v), 10 Glycerin (v/v)
Waschpuffer (Co-IP)	50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
Lysepuffer (Co-IP)	1 % IGEPAL CA-630 (v/v) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
LUMIER-Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 % (v/v) IGEPAL® CA-630 (pH 8,0)
NPI-10	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (pH 8,0)
NPI-20	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol (pH 8,0)
NPI-250	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol (pH 8,0)

Tabelle 3: Puffer und Lösungen.

2.1.2.2 Medien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % NaCl (w/v), 1 % Trypton (w/v), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, pH 7,5
YPD-Medium	2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glucose (nach Autoklavieren steril hinzugeben)
RPMI-Medium	RPMI 1640 Medium (#11875093, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
DMEM-Medium, Arginin- und Lysin-frei	DMEM, high glucose, no glutamine, no lysine, no arginine (#A1443101, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Glutamin-Supplement	GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (#35050061, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	Gibco® Fetal Bovine Serum, qualified, USDA-approved regions (#10437028, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)

FBS, dialysiert	Dialyzed Fetal Bovine Serum (#26400044, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung	Penicillin-Streptomycin-Glutamine (10x) (#10378016, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (#15140122, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)

Tabelle 4: Zellkulturmedien

2.1.2.3 Kulturplatten

Zur Herstellung von Selektionsagaroseplatten wurde dem flüssigen Agar-LB-Gemisch entsprechende Mengen einer antibiotischen Substanz hinzugegeben, wobei eine maximale Temperatur der Lösung von 65° C nicht überschritten wurde.

Kulturplatte	Zusammensetzung
LB-Agaroseplatten	1 % NaCl (w/v), 1 % Trypton (w/v), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Agarose, pH 7,5
YPD-Agaroseplatten	2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2,4 % (w/v) Agarose, 2 % (w/v) Glucose (nach Autoklavieren steril hinzugeben)

Tabelle 5: Agaroseplatten

2.1.3 DNA- und Proteinstandards

DNA- und Proteinstandards wurden nach Herstellerangaben präpariert, eingesetzt und gelagert.

Standard	Produkt
DNA-Standard (Gelelektrophorese, 1 kb)	1 Kb Plus DNA Ladder (#10787018, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
DNA-Standard (Gelelektrophorese, 100 bp)	100 bp DNA Ladder (#15628019, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)

Proteinstandard (SDS-PAGE, 10 bis 180 kDa)	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (#26616, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Proteinstandard (BN-PAGE, 20 bis 1200 kDa)	NativeMark™ Unstained Protein Standard (#LC0725, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Proteinstandard (Bradford-Reaktion)	Quick Start™ Bradford Protein Assay, (#5000201, Biorad, Hercules, USA)

Tabelle 6: DNA- und Proteinstandards.

2.1.4 Vektoren und cDNA

Die folgenden Vektoren und cDNA-Plasmide wurden kommerziell erworben und auf Korrektheit mittels Restriktionsverdau und Sanger-Sequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) überprüft.

2.1.4.1 Vektoren

Vektor	Produkt
Klonierungsvektor	Gateway® pDONR™201 Vector (#12536017, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Expressionsvektoren	Gateway® pEF-DEST51-V5/6xHis Vector (#12285011, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) pMAL-c2X-DEST (AG Molekulare Pädiatrie) pCR3.1-N-hRluc-DEST (AG Molekulare Pädiatrie) pCR3.1-C-hRluc-DEST (AG Molekulare Pädiatrie) pCR3.1-N-Venus-DEST (AG Molekulare Pädiatrie) pCR3.1-C-Venus-DEST (AG Molekulare Pädiatrie)

Tabelle 7: Klonierungs- und Expressionsvektoren.

2.1.4.2 cDNA

Sämtliche cDNA-Konstrukte wurden von PlasmID Repository, Boston, USA bezogen: *GCDH* in pENTR223 (Clone ID HsCD00372664), *ACADM* in pENTR223 (Clone ID HsCD00372596), *BCKDHA* in pDNRLIB (Clone ID HsCD00328862), *CPS1* pCRXLTOPO

(Clone ID HsCD00342929), *OTC* in pENTR223 (Clone ID HsCD00378384), *AVADVL* in pENTR223 (Clone ID HsCD00378844).

2.1.5 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden bei -20 °C gelagert und nach Herstellerinformation eingesetzt. Die finalen Konzentrationen sind im entsprechenden Kapitel beschrieben.

Epitop	Antikörper
anti-GCDH	mouse anti-GCDH antibody (#ab112998, Abcam, Cambridge, UK)
anti-V5	mouse anti-V5 tag antibody (#46-0705, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
anti-GAPDH	mouse anti-glyceraldehyd-3-PDH antibody (#H86504M, Meridian Life Science, Memphis, USA)
anti-Tubulin	anti-tubulin antibody (#sc-73242, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)
anti-Hsp60	rabbit anti-HSPD1 antibody (#ab46798, Abcam, Cambridge, UK)
anti-PAH	mouse anti-tryptophan hydroxylase/tyrosine hydroxylase/phenylalanine hydroxylase antibody (#MAB5278, Merck, Darmstadt, Deutschland)
anti-MBP	rabbit anti-MBP antiserum (#E8030S, New England Biolabs, Ipswich, USA)
anti- <i>mouse</i> -HRP	donkey anti-mouse IgG-HRP (#sc-2306, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)
anti- <i>rabbit</i> -HRP	donkey anti-rabbit IgG-HRP (#sc-2305, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)
anti-mouse Alexa Fluor 488	goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (#R37120, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)

Tabelle 8: Antikörper

2.1.6 Organismen

2.1.6.1 Prokaryote Organismen

Die eingesetzten Bakterienstämme wurden gemäß Standardprotokoll bei -80 °C in 50 % (v/v) Glycerin bis zur Verwendung gelagert.

2.1.6.1.1 Bakterienkultur

Zum Klonieren und Amplifizieren von Plasmid-DNA wurde der chemisch kompetente *E. coli*-Stamm DH5 α (#12297016, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) verwendet [124]. Zur Ligation linearisierter Plasmid-DNA nach Amplifikation *in vivo* wurde der chemisch kompetente *E. coli*-Stamm *XI1-Blue* (#200236, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. Proteine wurden prokaryot im *E. coli*-Stamm *BL21-CodonPlus-RIL* (#50-125-350, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) exprimiert [125].

2.1.6.2 Eukaryote Organismen

Zellkulturorganismen wurden bei -160 °C bis zur Verwendung in 50 % DMSO gelagert. Hefekulturen wurden wie prokaryote Kulturen gelagert und kultiviert.

2.1.6.2.1 Zellkultur

Alle aufgeführten Experimente *in vivo* wurden in *COS-7*-Zellen (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. *COS-7* sind adhären wachsende Fibroblasten-ähnliche Zellen, die aus der *CV-1*-Zelllinie abstammen und mittels SV40-Virus-Transformation immortalisiert wurden [126]. Es handelt sich bei der *CV-1*-Zelllinie um Nierenzellen aus *Chlorocebus aethiops*. Das transformierte *SV-1* (*simian virus 1*) befähigt zur Expression des *large T-antigen* [127]. Die Etymologie der *COS*-Zelle setzt sich zusammen aus *CV-1 in origin* und dem eingebrachten SV40-Gen [126].

2.1.6.2.2 Hefekultur

Zur Isolation von Mitochondrien wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm BY4741 verwendet [128]. Der Stamm ist eine Deletionsmutante des S288C Stammes [129].

2.1.7 Geräte

Gerät	Produkt
Spannungsquelle	PEQLAB Power Supply EV231 (Peqlab, Radnor, USA)
Fluoreszenzmessgerät	FLUOstar Optima (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	XCell SureLock® mini-Cell (#EI0001, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) XCell4 SureLock® Midi-Cell (#WR0100, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
<i>Blotter</i>	Perfect Blue™ Semi-Dry-Blotter, Sedec™ (#700-0424, VWR, Erlangen, Deutschland)
Chemilumineszenzdetektor	DIANA II (Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland)
Elektroporationsgerät	96-well Shuttle™ System (#AAM-1001S), Lonza, Basel, Schweiz) Nucleofector™ 2b Device (#AAB-1001, Lonza, Basel, Schweiz)
Massenspektrometer	Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Zentrifugen	Eppendorf® Refrigerated Microcentrifuge, Model 5417R Eppendorf® Microcentrifuge, Model 5415D Eppendorf® Centrifuge, Model 5810 (alle Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Plattformschüttler	Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Schüttler/Inkubator	New Brunswick™ Excella® E14 (New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland)
Konzentrator	Savant™ SPD131DDA SpeedVac™ (#SPD131DDA-230, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Spektrophotometer	Ultrospec™ 3100 pro UV/Visible Spectrophotometer (#80211231GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)
<i>Thermocycler</i>	peqSTAR 96X Universal Cyclers (#732-2886, Peqlab, Radnor, USA)
Ultraschallgerät	Digital Sonifier® Cell Disruptor (BRANSON ULTRASCHALL, Dietzenbach, Deutschland)
FPLC	ÄKTApurifier (#28406264, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

Spektrophotometer	NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Flüssigchromatograph	EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Inkubator	Heracell® 150 CO2 incubator (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Vortexschüttler	Vortex-Genie® 2 (#SI-0236, Scientific Industries, Bohemia, USA)
Mikroskop	Leica DM IL (Leica, Wetzla, Deutschland)

Tabelle 9: Geräte.

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Produkt
Zellkulturplatten	6-well Platte (Corning® Costar® Zellkultur-Platte, Corning, Corning, USA) Corning® HYPERFlask™ (Corning, Corning, USA) 75 cm ² -Zellkulturflaschen (Corning, Corning, USA) μ-Slides VI 0.4 (Ibidi, Martinsried, Deutschland)
Polyacrylamid-Gele	NuPAGE™ Novex™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 1,0 mM, 10-well (#NP0321PK2, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) NuPAGE™ Novex™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 1,0 mM, 20-well Version (#WG1402BOX, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) NativePAGE™ Novex™ 4-16 % Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mM, 10-well (#BN1002BOX, Thermo Fisher Scientific, Florence, USA)
Nitrozellulosemembran	Amersham Protran 0,45 NC (#10600002, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
<i>Beads</i>	μMACS Protein G MicroBeads, #130-071-101, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Säulen	MBPTrap HP (#28-9187-79, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) HiLoad Superdex 200 PG (#28989335, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) Repro-Sil-Pur® Silikat, 1,9 μM (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Entringen, Deutschland) μ Columns (#130-042-801, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
C18-Matrix	C18 <i>extraction disks</i> (3M™ Empore™ C18 Extraction Disks, #66883-U, 3M, minnesota)

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien.

2.1.9 Software

Verwendung	Software
Statistik	R (R Core Team, Wien, Österreich) Python (G. Van Rossum & F. Drake, Scotts Valley, CA, USA) Microsoft® Excel 2010 (Version 14.0.7166.5000, Microsoft, Redmond, USA)

Visualisierung	ImageJ (NIH, Version 1.46f 5) GraphPad PRISM (Version 5.01, Graph Pad Software, Inc., La Jolla, USA) Cytoscape (Version 3.5.1, Cytoscape Consortium, San Diego, CA, USA) Inkscape (Version 0.92, GNU)
Klonierung	Serial Cloner (Serial Basics)

Tabelle 11: Software

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli* Bakterienstämmen

Zur Langzeitkonservierung wurden *E. coli* in 500 µl LB-Medium mit 50 % Glycerol bei -80 °C gelagert. Intermittierend wurden *E. coli*-Kulturen auf Agaroseplatten bei 4 °C konserviert. 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden inokuliert und für 16 Stunden bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Je nach gewünschter Menge wurde die 5 ml Suspension in eine 1l-Kultur überführt und für weitere 12 bis 24 Stunden bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert und anschließend geerntet (1.000 x g, 15 min, 4 °C). Die eingesetzten Antibiotika zur Selektion wurden in Wasser (Ampicillin und Kanamycin) beziehungsweise Ethanol (Chloramphenicol) bei -20 °C als hochkonzentrierte Stammlösung gelagert und vor Inokulation zum Medium hinzugegeben. Folgende finale Konzentrationen wurde für die Selektion der genannten Plasmide verwendet: 50 µg/ml Ampicillin (pEF-DEST51, pMAL-c2X-DEST, pCR3.1-DEST), 50 µg/ml Kanamycin (pENTR221), 50 µg/ml Spectinomycin (pENTR223), 30 µg/ml Chloramphenicol (pEF-DEST51, *expression clones*).

2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in prokaryote Zellen eingebracht [130, 131]. Eine Suspension von chemisch kompetenten *E. coli* (DH5α) von 50 µl wurde mit 2 µl in Wasser gelöster Plasmid-DNA (c = 100 bis 2.000 ng/µl) versetzt. Das Gemisch wurde für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 90 Sekunden (für DH5α) beziehungsweise 45 Sekunden (für *X11-Blue* und *BL21-CodonPlus*). Die Suspension wurde anschließend umgehend für zwei min auf 4 °C gekühlt und mit 100 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) versetzt. Es folgte eine schüttelnde Inkubation bei 37 °C für weitere 90 min. Die Suspension wurde anschließend auf ein Selektionsnährboden ausgestrichen und für 16 Stunden inkubiert. Kolonien wurden mit einer Impföse in Flüssigselektionsmedium überführt und vermehrt.

2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung von amplifizierter Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine alkalische Lyse der Zellen mit nachfolgender Bindung der DNA an Silikatsäulen in ionischem Milieu angewandt [132]. Die DNA wurde dann mit Nuklease-freiem Wasser eluiert. Je nach Größe der Bakterienkultur wurde hierfür eine DNA-Mini- oder -Midipräparation angewandt.

2.2.3.1 DNA-Minipräparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA für Klonierungen wurde das Plasmid mini Prep Kit I gemäß Herstellerinstruktion verwendet. Diese Methode erbrachte eine DNA-Ausbeute von zirka 50 µl Eluat bei einer Konzentration von 100 – 500 ng/µl. Die DNA-Minipräparation ist nicht endotoxinfrei und die so gewonnene DNA wurde deshalb nicht zur Transfektion eukaryoter Zellen verwendet.

2.2.3.2 DNA-Midipräparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA zur eukaryoten Transfektion wurde das QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit gemäß Herstellerinstruktion verwendet. Diese Methode erbrachte eine DNA-Ausbeute von zirka 500 µl Eluat mit einer Konzentration von 500 – 1000 ng/µl. Die DNA-Midipräparation ist endotoxinfrei und die so gewonnene DNA wurde deshalb zur Transfektion eukaryoter Zellen verwendet.

2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der präparierten DNA-Lösung wurde spektrophotometrisch mittels NanoDrop ND-1000 bestimmt. Das Absorptionsmaximum der DNA beträgt 260 nm [133]. Mithilfe des NanoDrops ND-1000 wurde über die Extinktion die Konzentration eines Probevolumens gemessen. Das eingesetzte Volumen betrug 1 µl. Die Extinktion von 1,0 entsprach mit dieser Methode einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA und 33 µg/ml ssDNA. Neben der Konzentration wurde der Reinheitsgrad anhand des 260 nm/280 nm-Quotienten bestimmt, um Verunreinigungen mit zellulärem Material zu erkennen. Aromatische Aminosäuren zeigen ein Energieabsorptionsmaximum bei 280 nm [134]. Alle verwendeten DNA-Präparationen hatten eine Konzentration von mindestens 300 ng/µl (Midi-Präparation) beziehungsweise 50 ng/µl (Mini-Präparation) und einen 260 nm/280 nm-Quotienten $\geq 1,8$.

2.2.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation *in vitro* von DNA und DNA-Fragmenten sowie die *site-directed mutagenesis* (SDM) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

durchgeführt. Hierzu wurde das KAPAHiFi PCR Kit verwendet. Primer wurden nach Design *in silico* unter Zuhilfenahme der Programme *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) und *Sequence Manipulation Suite* (<http://www.bioinformatics.org/sms2>) sowie *Serial Cloner* (Serial Basics) von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland, synthetisiert und lyophilisiert. Die lyophilisierten Primer wurden in entsprechendem Volumen Wasser auf 100 pmol/µl gelöst und bei -20 °C gelagert. Für die Schmelztemperaturberechnung wurde die *Nearest-Neighbor*-Methode verwendet (erstbeschrieben durch Breslauer *et al.*, berechnet mit optimierten Werten von Sugimoto *et al.*) [135, 136]. Die *Annealing*-Temperatur (T_a) wurde mit folgender Gleichung berechnet [137]:

$$T_a = 0,3 \cdot T_{m_{\text{primer}}} + 0,7 \cdot T_{m_{\text{product}}} - 25.$$

Das verwendete PCR-Protokoll orientierte sich an den Herstellerinformationen des PCR-Kits. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl und setzte sich wie folgt zusammen: 1 ng Template DNA, 1,5 µl 10 µM *forward* primer, 1,5 µl 10 µM *reverse* primer, 1,5 µl 10 mM dNTP-Mix, 10 µl 5x KAPAHiFi GC buffer, 1 µl 1 U/µl KAPA HiFi HotStart DNA-Polymerase, entsprechendes Volumen Nuklease-freies Wasser zum Erreichen des finalen Reaktionsvolumens von 100 µl. Gegebenenfalls wurde die Magnesiumionenkonzentration erhöht (bis zu 5 mM), um die Ausbeute zu erhöhen. Lag zudem ein hoher GC-Gehalt der Primer beziehungsweise im *Annealing*-abschnitt der Matrizen-DNA vor (> 65 %), so wurde zusätzlich DMSO (bis zu 10 % v/v) oder alternativ oder additiv Formamid (bis zu 10 % v/v) eingesetzt und das Wasservolumen entsprechend reduziert.[137] Die initiale DNA-Denaturierung wurde bei 95 °C für 3 Minuten einmalig durchgeführt (1). Es folgte eine weitere Denaturierung bei 98 °C für 20 Sekunden (2). Das *annealing* belief sich auf 15 Sekunden bei berechneter Temperatur, zirka 5 – 10 °C unter der *Annealing*-Temperatur (3). Die Extension wurde bei 72 °C durchgeführt, die Zeitspanne richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (60 s/kb) (4). Die Schritte 2 bis 4 wurden 20 bis 30 Mal wiederholt (entsprechend der Größe und Bindung des Primers). Final wurde einmalig bei 72 °C extendiert (1 min/kb). Die Probe wurde nach Beenden der PCR entweder kurzzeitig bei 4 °C oder längerfristig bei -20 °C gelagert.

2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe eines (amplifizierten) DNA-Fragmentes wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde eine modifizierte Methode nach Lee *et al.* angewandt [138]. Hierzu musste DNA linearisiert in wässriger Lösung vorliegen. 9 µl der Probe wurden mit 1 µl Gel Loading Buffer versetzt. Zur Präparation des Gels wurde entsprechend der zu erwartenden Größe des Fragmentes 0,9 % oder 3 % Agarose (w/v) in 100 ml TBE-Puffer gelöst und kurzzeitig siedend erhitzt und anschließend mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Die Lösung wurde in eine Kammer gegossen und bei Raumtemperatur gekühlt. 5 µl beziehungsweise 20 µl der DNA-Probe, entsprechend einer qualitativen oder quantitativen Analyse sowie ein Standard wurden im Agarosegel im elektrischen Feld bei 120 V für eine

Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde durch das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Durchleuchtung detektiert.

2.2.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei Gelelektrophorese zur Isolierung eines DNA-Fragmentes, welches zur weiteren Klonierung benötigt wurde, wurde die Agarose unter UV-Durchleuchtung auf entsprechender Höhe quaderförmig ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Agarosefragment mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerprotokoll extrahiert. Die DNA wurde anschließend über im Kit enthaltene Silikatsäulen aufgereinigt und die Konzentration spektrophotometrisch mittels NanoDrop bestimmt.

2.2.8 Gateway-Klonierung

Zum Einbringen von proteinkodierender cDNA in entsprechende Expressionsvektoren wurde die Gateway-Technologie (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Landy *et al.* beschrieben 1989 erstmals die Rekombination zwischen Bakterien-DNA und der DNA des Bakteriophagen λ , die bei dieser Technologie *in vitro* angewandt wird [139]. Die Reaktion ist dreigliedrig: Einführen der *attachment sites* (*att*) an den 5'- und 3'-Terminus des in das Plasmid einzubringenden Gens mittels PCR (1), Erzeugen eines *entry clones* durch Insertion des Gens in einen Donor-Vektor (2), Erzeugen eines *destination clones* durch Rekombination zweier Vektoren mit Genaustausch [140, 141].

2.2.8.1 Einführung der *attB*-sites in ein Gen

Mittels PCR wurden dem 5'- und 3'-Terminus eines Gens *attB sites* (*attachment site B*, die zum weiteren Klonieren mit entsprechenden Vektoren benötigt wurden) angefügt (GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT) [140]. Hierfür wurden Primer synthetisiert, die 5'-, beziehungsweise 3'-terminal die Sequenz der *attB sites* und jeweils überlappend und komplementär die Sequenz des 5'-, beziehungsweise 3'-Endes des Gens kodierten. Zur Verbesserung der Translationsinitiation im eukaryoten System wurde zwischen *attB site* und 5'-Terminus des Gens eine Kozak-Sequenz (gccRccAUGG, R entspricht einem Purin) eingeführt [142].

Die *Annealing*-Temperatur wurde bei dieser Klonierungstechnik speziell adjustiert: Die initialen fünf Zyklen der PCR wurden mit einer *Annealing*-Temperatur durchgeführt, die dem komplementären Bereich im Gen entsprachen. Für die restlichen Zyklen wurde die *Annealing*-Temperatur für die volle Länge des Primers berechnet und eingesetzt, da davon auszugehen ist, dass dann die volle Länge des Primers an entstandene DNA-Fragmente bindet. Zudem wurde ein niedriger GC-Gehalt im nicht-überlappenden Anteil des Primers angestrebt [143].

2.2.8.2 Erzeugung von *entry clones* (BP-Reaktion)

Ziel der lysogenen BP-Reaktion ist es, das *attB*-trunkierte Gen in einen *Donor*-Vektor zu klonieren. Es entsteht daraus ein *entry clone*, der wiederum als (universelles) *Template* für die Insertion des Gens in (verschiedene) Expressionsvektoren diene. Das experimentelle Verfahren orientierte sich an der Herstellerinformation. 50 fm des *attB*-flankierte PCR-Produktes wurden mit 150 ng des *Donor*-Vektors pDONR201, 1 µl BP Clonase und nukleasefreiem Wasser (auf 5 µl Reaktionsvolumen ergänzt) für 1 bis 16 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die BP Clonase ist eine Integrase (Int), die mithilfe des bakteriellen *integration host factors* (IHF) die *attB site* des PCR-Produktes mit der *attP site* des *Donor*-Vektors rekombiniert, das Gen in den Vektor integriert und flankierende *attL sites* generiert [140]. Die Reaktion wurde durch Hinzugeben von 1 µl Proteinase K und Inkubation bei 37 °C für 10 min beendet und das Reaktionsgemisch in *E. coli* transformiert. Zur Selektion positiver Klone wurde die transformierte Zellsuspension auf kanamycin- oder spectinomycinhaltigen Selektivagarplatten, respektive des Vektors, ausgestrichen. Das für das CcdB-Protein codierende Gen *ccdB* verhinderte das Wachstum von Klonen, die den nicht-rekombinierten *Donor*-Vektor (mit Antibiotikumresistenzen) aufgenommen haben. Das CcdB-Protein ist ein Gyrasehemmer. Es befindet sich im ursprünglichen, leeren *Donor*-Vektor und wird erst nach erfolgreicher Rekombination durch das gewünschte Gen ersetzt [144].

2.2.8.3 Erzeugung von Expressionsvektoren (LR-Reaktion)

Ziel der lytischen LR-Reaktion ist es, Expressionsvektoren zu erzeugen. Die LR-Reaktion findet zwischen einem (zuvor generierten) *entry clone* und einem leeren pDEST-Vektor statt. Expressionsvektoren kodieren die cDNA eines zu exprimierenden Proteins. Ein T7-Promotor am 5'-Terminus erlaubt eine adäquate eukaryote Transkriptionsinitiation. Ein *affinity tag* am 3'-Terminus (V5 und 6xHis bei pEF-DEST51) erleichtert die Detektion und Aufreinigung des exprimierten Proteins mit etablierten Antikörpern.

50 – 150 ng des *entry clones* wurden mit 150 ng des leeren pDEST-Vektors und 1 µl der LR-Clonase II Enzym Mix (bei einem mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllten Gesamtvolumen von 5 µl) bei 25 °C für 1 – 18 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und Inkubation bei 37 °C für 10 min beendet. Die *attL-sites* des *entry clones* wurden mit den *attR sites* des (leeren) pDEST-Vektors rekombiniert: Das Gen wurde herausgeschnitten und in den pDEST-Vektor integriert. Es entstand ein Expressionsvektor mit dem von *attB sites* flankierten Gen, das ursprünglich mittels PCR amplifiziert wurde. Die Reaktion wird von der LR Clonase katalysiert (Int, IHF und excisionase, Xis) [140]. Positive Klone wurden auf Ampicillinresistenz selektiert. Auch der leere pDEST-Vektor enthält das *ccdB*-Gen, um die Rate an falsch-positive Klone zu minimieren. Für die vorliegenden Klonierungen und Proteinexpression im eukaryoten System wurde der Gateway-Vektor pEF-DEST51 (Thermo Fisher Scientific, Florence, USA) verwendet. Für Proteinexpression in Prokaryonten wurde der pMAL-c2X-DEST-Vektor verwendet, für BRET-Interaktionsanalysen

pCR3.1-Vektoren mit N- und C-terminalem Venus und hRLuc. Letztere Vektoren enthalten im *backbone* am 3'-Ende (C-terminal) bzw. 5'-Ende (N-terminal) der *attR sites* die Gensequenz, die für Venus oder hRLuc kodiert. Das Genprodukt ist dementsprechend ein Fusionsprotein, das über fluoreszierende (Venus) oder lumineszierende (hRLuc) Eigenschaften verfügt und somit in der lebenden Zelle spektroskopisch detektiert werden kann.

2.2.9 Mutagenese mittels PCR-basierter *site-directed mutagenesis*

Die (*single*) *site-directed mutagenesis* (SDM) ermöglicht das Einbringen von Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in eine Plasmid-DNA [145]. Um die pathogenen Mutationen in das *GCDH*- bzw. *ACADM*-Gen einzubringen oder Bereiche im Gen (beispielsweise die *mitochondrial targeting sequence*) zu deletieren, wurde auf diese PCR-basierte Mutagenese zurückgegriffen. Die Methode wurde nach Laible *et al.* modifiziert angewandt [146]. Es wurden Primer entworfen, die mittig in der Primersequenz für die einzubringende Mutation (oder Deletion) kodieren, 25 – 45 Nukleotide lang und an den Enden reich an Guanin und Cytidin sind. Die Mutation lag in der Regel mindestens 8 Nukleotide vom Ende des Primers entfernt. *Forward* und *reverse* Primer waren komplementär. Die PCR wurde wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Als Matrizen-DNA diente die cDNA der jeweiligen Proteine als *entry clone*. Um die Matrizen-DNA (ohne Mutation) aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, wurde die Probe mit *DpnI*, einer Typ IIM Restriktionsendonuklease, verdaut. Diese erkennt methylierte DNA-Motive, wie sie (in diesem experimentellen Ansatz) nur *in vivo* erzeugt werden können (und somit nicht die *in vitro* synthetisierten PCR-Produkte modifizieren) [147, 148]. Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel gereinigt (vgl. Kapitel 2.2.6 und 2.2.7) und in *XI1-Blue E. coli* transformiert (vgl. Kapitel 2.2.2).

2.2.9.1 Liste der Primer für die SDM des *GCDH*- und *ACADM*-Gens

Im Folgenden sind die untersuchten Mutationen des *GCDH*- und *ACADM*-Gens gelistet. Die beschriebenen Primer wurden zur Einführung der jeweiligen Mutation als *forward*, die komplementären Primer als *reverse* Primer verwendet. Die dargestellten Sequenzen sind 5'- zu 3'-orientiert. Die Nomenklatur folgt den Vorschlägen der Human Genome Variation Society [149]. Die Nukleotid- und Aminosäurepositionen beziehen sich auf die vollständige cDNA bzw. Primärsequenz des Proteins einschließlich der *mitochondrial targeting sequence* (MTS).

2.2.9.1.1 Mutationen im *GCDH*-Gen

Für eine umfangreiche quantitative und qualitative Darstellung der Genetik des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels wird auf Zschocke *et al.*, Busquets *et al.*, Keyser *et al.*, Goodman *et al.* und Radha *et al.* verwiesen [72, 114, 115, 150]. Im Folgenden sind die hier

untersuchten GCDH-Mutationen mit entsprechender Primersequenz, die zur SDM verwendet wurden, aufgelistet.

Mutation	Variante	Primersequenz	Referenz
g.248T>C	p.F71S p.Phe71Ser	ctcatcagggacacct <u>ccc</u> gcacctactg	[72]
c.262C>T	p.R88C p.Arg88Cys	tcgcatcctgttggccaatt <u>gca</u> acgaagtttt	[114]
c.412A>G	p.R138G p.Arg138Gly	ggacagtggctac <u>ggg</u> tcggcgatgag	[115]
c.532G>A	p.G178R p.Gly178Arg	ctgggctgctt <u>cgg</u> ctcacagagc	[151]
g.577G>A	p.E181K p.Glu181Lys	gggctgcttcgggctcaca <u>aag</u> cccaacag	[72]
c.680G>C	p.R227P p.Arg227Pro	ttgtagtgtgggct <u>ccg</u> tgtgaagatggctg	[114]
c.787A>G	p.M263V p.Met263Val	gcctcagccacaggc <u>gtg</u> atcatcatggacg	[151]
c.877G>A	p.A293T p.Arg293Thr	gctgcctgaacaac <u>acc</u> cggtacggcatc	[114]
c.1204C>T	p.R402W p.Arg402Trp	gagtatcacgtgatct <u>gg</u> cacgcatgaacc	[114]
c.1240G>A	p.E414K p.Glu414Lys	aggccgtgaacacctaca <u>aag</u> gtacacatgacatt	[151]
c.1262C>T	p.A421V p.Ala431Val	tacacatgacattcac <u>gtc</u> ctgatccttgggagag	[114]
c.743C>T	p.P248L p.Pro248Leu	gtctctcgcc <u>ctc</u> aggatccaggg	[114]
c.1093C>A	p.E365K p.Glu365Lys	gacaaggctgcccc <u>aag</u> atggttctctgc	[114]
g.1234G>A	p.V400M p.Val400Met	ctgacgagtatcacat <u>gat</u> ccggcagcc	[72]

c.983C>A	p.A316D p.Ala316Asp	gcccggcagtagc <u>ac</u> ctcgacaggatg	[72]
c.997C>G	p.Q333E p.Gln333Glu	gccaggaaccagctgattg <u>aga</u> aagaagctgg	[115]
c.167T>C	p.M100T p.Met100Thr	cgggagatcatttcggagac <u>cg</u> ggggagttg	[150]
c.1096G>A	p.V410M p.Val410Met	catgaacctggaggccat <u>ga</u> aacacctacgaagg	[150]
c.769C>T	p.R257W p.Arg257Trp	caagttctcgctgt <u>gg</u> gcctcagccac	[114]
c.1220T>C	p.L407P p.Leu407Pro	cacgccatgaacc <u>cg</u> gaggccgtgaac	[114]
c.775T>C	p.S259P p.Ser259Pro	cgctgcgggccc <u>ag</u> ccacaggc	[114]
c.926T>G	p.L309W p.Leu309Trp	cttcggagttctgct <u>gg</u> cacacagcccgg	[114]
c.337T>C	p.Y113H p.Tyr113His	cccaccatcaaaggacat <u>gg</u> ctgtgctgggg	[114]
c.383G>A	p.R128Q p.Arg128Gln	ggctcctggccc <u>aa</u> gagctggagcg	[114]
c.395G>A	p.R132Q p.Arg132Gln	cgagagctggagc <u>ag</u> gtggacagtggc	[114]
c.482G>A	p.R161Q p.Arg161Gln	cagcgaggaacagc <u>ag</u> cagaagtacctgc	[114]
c.583G>A	p.A195T p.Ala195Thr	cagcagcatggagaccaga <u>acc</u> cactacaactc	[114]

Tabelle 12: Mutationen im *GCDH*-Gen.

2.2.9.1.2 Mutationen im *ACADM*-Gen

Für eine umfangreiche Darstellung der Genetik des MCAD-Mangels siehe Andresen *et al.*, Matsubara *et al.*, Waddell *et al.*, Maier *et al.* und Purevsuren *et al.* [152-156]. Im Folgenden

sind die hier untersuchten *ACADM*-Mutationen mit entsprechender Primersequenz, die zur SDM verwendet wurden, aufgelistet.

Mutation	Variante	Primersequenz	Referenz
c.250C>T	p.L84F p.Leu84Phe	cccctaattagaagagcctggga <u>att</u> ggtttaataaacac	[154]
c.577A>G	p.T193A p.Thr193Ala	ggtcagaagatgtggat <u>g</u> accaacggaggaaaagc	[157]
c.616C>T	p.R206C p.Arg206Cys	gtatTTTTattggcat <u>gtt</u> ctgatccagatcc	[158]
g.985A>G	p.K329E p.Lys329Glu	ggctgaaatggcaatgaag <u>gtt</u> gaactagctagaatg	[153]
c.1085G>A	p.G362E p.Gly362Glu	gcaaaggcatttgc <u>tga</u> agatattgcaaatcagttagc	[156]

Tabelle 13: Mutationen im *ACADM*-Gen.

2.2.9.1.3 Klonierung von MTS-deletierter *GCDH*-cDNA-Konstrukten

Um einen tieferen Einblick in das Translokations- und Prozessierungsverhalten nukleär kodierter mitochondrialer Proteine zu erhalten, wurden Expressionskonstrukte kloniert, bei welchen die MTS entfernt wurde. Die Sequenz des murens Proteins ohne MTS wurde mittels PCR aus dem Gen amplifiziert und mit *att sites* versehen (Kapitel 2.2.8). Zwischen *attB* der *forward* Sequenz wurde eine Kozak-Sequenz mit Startcodon (ATG) eingeführt. Der *reverse* Primer flankierte das Ende der murens Sequenz mit *att sites*, verzichtete dabei auf ein Stoppcodon, sodass im Expressionsvektor (pEF-DEST51) C-terminal der *affinity tag* (V5) transkribiert und translatiert wurde. Die Primer sind 5'- zu 3'-orientiert (Tabelle 14). Mit der amplifizierten cDNA wurde wie in den Kapiteln 2.2.8.2 und 2.2.8.3 beschrieben fortgefahen und das Gen in den pEF-DEST51-Vektor mittels BP- und LR-Reaktion kloniert.

Primer	Primersequenz
<i>forward</i> <i>GCDH</i> _{ΔMTS}	ggggacaagtttgtaaaaaaagcaggctatgcgtccccgagtttgactggc
<i>reverse</i> <i>GCDH</i> _{ΔMTS}	cgttcacggccagcaaggaccagctttcttgtaaaagtggctccc

Tabelle 14: Primer zur Klonierung MTS-deletierter *GCDH*.

Für die Deletion der MTS der Proteine Ornithin-Transcarbamoylase (OTC) sowie der alpha-Untereinheit der 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase (BCKDHA) wurde eine *site-directed mutagenesis* durchgeführt. Hierfür wurden folgende Primer verwendet. Das Produkt wurde mittels *DpnI* verdaut und in *E. coli* transformiert.

Primer	Primersequenz
<i>forward</i> BCKDHA Δ MTS	ctttgtacaaaaaagcaggctatgtcatctctggatgacaagcccc
<i>reverse</i> BCKDHA Δ MTS	ggggcttgcattccagagatgacatagcctgctttttgtacaaag
<i>forward</i> OTC Δ MTS	ctttgtacaaaaaagttggcatgaataaagtcagctgaagggcc
<i>reverse</i> OTC Δ MTS	ggcccttcagctgcactttattcatgcccaactttttgtacaaag

Tabelle 15: Primer zur Klonierung MTS-deletierter BCKDHA- und OTC-Varianten.

2.2.10 Restriktionsverdau

Um Klone identifizieren zu können, die das gewünschte Plasmid amplifizieren, wurde die DNA mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten. Hierzu wurden Klone von einer entsprechenden Agarplatte mit einer Pipettenspitze gepickt, in Flüssigmedium überführt und nach 12 Stunden Wachstum die DNA mittels DNA-Minipräparation isoliert und anschließend verdaut. Die Reaktion wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Gelelektrophorese auf ihre Größe analysiert und mit berechneten Werten mit der Software Serial Cloner verglichen.

2.2.11 Sequenzanalyse

Alle Klonierungen wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Die zu analysierende DNA wurde auf 50 ng/ μ l mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Konstrukte im *Donor*-Vektor wurden mit M13 *forward* und *reverse* Primer sequenziert, jene im *Destination*-Vektor mit T7-*forward*-Primer und V5-*reverse*-Primer (Tabelle 16).

Sequenzierungsprimer	Primersequenz
M13 <i>forward</i>	tgaggttcgaccagta
M13 <i>reverse</i>	caggaaacagctatgacc
T7 <i>forward</i>	taatacgactcactataggg
V5 <i>reverse</i>	cgtagaatcgagaccgaggagagg

Tabelle 16: Sequenzierungsprimer.

Die Sequenz wurde anschließend mittels der Software Serial Cloner überprüft. Als Referenz diente die cDNA-Sequenz der GCDH aus der *CCDS Database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>, CCDS 12286.1) der RefSeq-Datenbank [149].

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI-Medium) kultiviert und gelagert [159]. Das RPMI-Medium wurde vor Verwendung mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) und 1 % (v/v) einer Penicillin-Streptomycin-Lösung komplettiert. Zur Langzeitlagerung wurden COS-7-Zellen in RPMI-Medium mit 50 % (v/v) DMSO im Flüssigstickstoff konserviert. Medium und andere Reagenzien wurden vor Exposition gegenüber kultivierten Zellen im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen oder der HYPERFlask bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % (v/v) adhärent kultiviert und regelmäßig mikroskopiert sowie mittels PCR auf Mycoplasmenbefall untersucht. Jeden zweiten Tag erfolgt das zweimalige Waschen der Zellen mit *phosphate buffer saline* (PBS) sowie das Wechseln des Nährmediums.

2.3.1.1 Splitten und Ernten der Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz von zirka 90 % wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und mit einer vorgewärmten Trypsinlösung (Konzentration und Verdünnung laut Herstellerangaben) für 5 min bei 37 °C inkubiert, danach mit dem doppelten Volumen (der Trypsinlösung) Zellkulturmedium verdünnt (zur Inhibition der Protease), mechanisch abgelöst und damit in Suspension gebracht. Die Suspension wurde zur weiteren Kultivierung 1:4 – 1:10 ausgesät und mit Medium entsprechenden Volumens angereichert. Zum Ernten der Zellen wurde die Suspension zentrifugiert (200 g, 10 min, 21 °C) und das Zellpellet zweimalig mit PBS gewaschen.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration der Suspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

2.3.1.2 Transfektion von *COS-7*-Zellen

Die Elektroporation ist eine effiziente Methode, um fremde (Plasmid-) DNA in eukaryote Zellen einzubringen [160]. Für die beschriebenen Experimente wurde die aus Bakterien präparierte Plasmid-DNA in *COS-7*-Zellen transfiziert, um das gewünschte Protein eukaryot zu exprimieren. Hierzu wurde eine Nukleofektion angewandt.

2.3.1.2.1 Transfektion im 96-*well* Format

Zur Transfektion im 96-*well* Format wurden *COS-7*-Zellen pelletiert (Kapitel 2.3.1.1) und in 20 $\mu\text{l/well}$ Transfektionspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde zu 0,2 μg Plasmid-DNA hinzugegeben und vermischt. Das Volumen verschiedener DNA-Lösung wurde dabei innerhalb eines Experiments konstant gehalten. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine 96-*well* Elektroporationsplatte überführt und in das Amaxa Nucleofector 96-*well* Shuttle System eingeführt. Zur Transfektion wurde das Programm FF-104 gewählt. Nach Beendigung der Elektroporation wurde die Zellsuspension mit 80 μl RPMI-Medium verdünnt und in eine 96-*well* Zellkulturplatte überführt. Dort wurden die transfizierten Zellen mit 100 μl Medium supplementiert und 24 – 48 h inkubiert.

2.3.1.2.2 Transfektion in der Küvette

Zur Transfektion eines größeren Suspensionsvolumens mittels Elektroporationsküvette wurden *COS-7*-Zellen pelletiert (Kapitel 2.3.1.1) und pro Küvette in 200 μl Transfektionspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde zu 2,0 μg Plasmid-DNA hinzugegeben und vermischt. Das Volumen der DNA-Lösung wurde dabei zwischen den zu untersuchenden Konditionen konstant gehalten. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette überführt und in das Nucleofector-Gerät eingeführt. Zur Transfektion wurde das Programm *COS-7 DSMZ* gewählt. Nach Beendigung der Elektroporation wurde die Zellsuspension mit 800 μl RPMI-Medium verdünnt und in eine 6-*well* Platte überführt. Dort wurden die transfizierten Zellen mit 1,2 ml Medium supplementiert und 24 – 48 h inkubiert.

2.3.2 Kultivierung von *COS-7*-Zellen für SILAC

Um die relative Anzahl der Proteine zwischen zwei oder mehreren Proben mittels Massenspektrometrie vergleichen zu können, wurde SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) eingesetzt. Die Methode wurde von Ong *et al.* beschrieben [161-163]. Die Lysate aus diesen Ansätzen wurden mit GCDH Wildtyp (WT), einer GCDH-Variante und einer

Kontrolle inkubiert, um Proteininteraktionspartner zu identifizieren. Nach Proteolyse mit Trypsin und massenspektrometrischer Analyse der Peptide konnten aufgrund der Massenabweichung der Peptide exakte Verhältnisse der Abundanz des Proteins zwischen den einzelnen Ansätzen verglichen werden. Ein detailliertes Protokoll beschreiben Ong *et al.* [164]. Zellen wurden in Medien mit isotoopenmarkierten Aminosäuren (*heavy*, *middle*, *light*) kultiviert, die in das Proteom der Zelle inkorporiert werden. Es wurden Arginin- und Lysin-Isotope eingesetzt. Arginin- und lysinfreies Medium wurde mit jeweils 250 mM L-Arginin- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ (+10 Da) und L-Lysin- $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ (+8 Da) (*heavy*), L-Arginin- $^{13}\text{C}_6$ (+6 Da) und Lysin-4D (+4 Da) (*middle*) sowie L-Lysin und L-Arginin (*light*) komplettiert und damit markiert. Den Medien wurde zudem 1 % (v/v) GlutaMAX, 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung und 10 % (v/v) dialysiertes FBS zugesetzt. COS-7 Zellen wurden zur Inkorporation der Aminosäuren für fünf Passagen in entsprechendem (*heavy*, *medium* und *light*) Medium kultiviert. Eine Inkorporation der isotoopenmarkierten Proteine von mindestens 95 % wurde für alle drei Ansätze erreicht. Eine relevante Arginin-Prolin-Konversion wurde vor experimentellem Gebrauch der Zellkulturen mittels Massenspektrometrie ausgeschlossen [165]. Die Zellen wurden direkt verwendet oder mit 50 % (v/v) DMSO in entsprechendem Medium im Flüssigstickstoff gelagert.

2.3.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae wurde in YPD-Medium kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 30 °C schüttelnd (200 rpm) für 48 Stunden inkubiert. Zur Langzeitlagerung wurde der Stamm mit 15 % Glycerol in YPD-Medium bei -70 °C konserviert. Intermittierend konnte die Hefe auf YPD-Agarplatten bei 30 °C gezüchtet und bei 4 °C gelagert werden [166].

2.3.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Für Lokalisationsstudien *in vitro* wurden isolierte Mitochondrien aus *S. cerevisiae* verwendet, da dieser Organismus eine größere Ausbeute der für das Experiment benötigten Mitochondrien lieferte. Die Analysen von mitochondrialem Proteinimport, Cytoskelettarchitektur und Membranbiologie wurden intensiv an (isolierten) Hefemitochondrien durchgeführt. Eine Transparenz zum humanen System kann angenommen werden [167-169]. Die Isolierung wurde modifiziert nach Boldogh *et al.* und Gregg *et al.* Durchgeführt [170, 171]. Dabei wurde das Glycan der Zellwand der Hefe lytisch mittels Zymolyase entfernt und aus den daraus entstandenen Spheroblasten die Mitochondrien mittels Differentialzentrifugation isoliert [172]. Hierfür wurde eine 1l-Kultur bis zu einer Extinktion von 3 bei einer Absorption von 600 nm in YPD-Medium bei 30 °C und 300 rpm kultiviert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (3.000 g, 5 min, 21 °C) und zweimalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Masse des Zellpellets bestimmt. Die Zellen wurden in 2 ml Puffer pro Gramm Zellen in DTT-Puffer resuspendiert und rotierend (70 rpm) bei 30 °C für 20 min inkubiert. Die Hefe wurde geerntet und zweimalig mit Zymolyase-Puffer (ohne Zymolyase) gewaschen (jeweils 7 ml Puffer pro Gramm Zellen). Die Suspension wurde mit

1 mg/g Zymolyase-100T versetzt und 30 min rotierend (70 rpm) bei 30 °C inkubiert, wobei zellwandlose Spheroblasten entstanden [173]. Die Spheroblasten wurden zentrifugiert (2.200 g, 8 min, 4 °C) und auf 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt. Die folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt, die verwendeten Puffer hatten ebenfalls eine Temperatur von 4 °C. Zur mechanischen Lyse der Zellen wurde das Pellet in 6,5 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Zellmasse aufgenommen und darin zweimalig gewaschen (Zentrifugation mit 2.200 g, 8 min, 4 °C). Die Suspension wurde anschließend mit einem Homogenisator mit 15 Hieben behandelt, um die Zellen mechanisch zu lysieren. Das Lysat wurde 1:1 mit Homogenisierungspuffer verdünnt und mittels Zentrifugation (3.000 g, 5 min, 4 °C) wurden Zellkerne und der Debris entfernt. Der Überstand wurde durch Zentrifugation (12.000 g, 15 min, 4 °C) in eine cytosolische (Überstand) und mitochondriale (Pellet) Fraktion getrennt und die Mitochondrien in SEM-Puffer aufgenommen und weiterverarbeitet. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels Bradford-Reaktion (Kapitel 2.4.6) verwendet, um Vergleichbarkeit bei Verschiedenen Experimenten zu gewährleisten. Zur Konservierung konnte die Mitochondriensuspension in Aliquots mit einer Konzentration von mindestens 40 mg Protein pro 1 ml SEM-Puffer bei -70 °C gelagert werden [174].

2.3.3.2 Isolierung von Mitochondrien aus eukaryoten Zellen

Um Mitochondrien aus Eukaryoten zu isolieren, wurde das Mitochondria Isolation Kit, human nach Herstellerangaben verwendet. Nach partieller Lyse der Zellen wurden die Proben mit magnetischen *microbeads* inkubiert, an die ein anti-Tom22-Antikörper kovalent gebunden ist. Danach wurden die *microbeads* im magnetischen Feld vom Rest der Probe aufgetrennt und die an die *microbeads* gebundenen Mitochondrien eluiert. Die Mitochondrien wurden anschließend bei 13.000 g für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet (Mitochondrien) in entsprechender Menge SEM-Puffer resuspendiert und für die weitere Analyse verwendet.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinexpression

2.4.1.1 Proteinexpression im eukaryoten System

Um Proteine im eukaryoten System zu exprimieren, wurden COS-7-Zellen mit einer Matrizen-cDNA transfiziert. Das Protein wurde durch 24 – 48 h exprimiert und danach extrahiert (Kapitel 2.4.1.1).

2.4.1.2 Proteinexpression im prokaryoten System

Um größere Proteinmengen zur Charakterisierung *in vitro* zu gewinnen, wurde GCDH rekombinant als Fusionsprotein mit maltosebindendem Protein (MBP) exprimiert und gereinigt (MBP-GCDH). *GCDH* in pMalc2x-DEST wurde in *BL21-CodonPlus E. coli* nach beschriebenen Protokoll (Kapitel 2.2.2, mit einem Hitzeschock für 45 s) transformiert. Der *BL21*-Stamm wurde aufgrund seiner Deletion der *Lon*-Protease und der Membranprotease *OmpT* zur Proteinexpression gewählt [175, 176]. Dadurch wurde der Abbau von exprimierten Proteinen verringert und es konnten höhere Ausbeuten erzielt werden. Eine positive Klonen wurden von der Agaroseplatte in 50 ml Flüssigselektionsmedium (LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol) überführt und für 16 h bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Die Suspension wurde danach in eine größere Kultur (1 l) überführt und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 – 0,6 bei einer Absorption von 600 nm bei 37 °C weiter kultiviert (zirka 4 Stunden). Die Suspension wurde auf 20 °C gekühlt und die Proteinexpression mit 0,01 mM Isopropylthio- β -D-Galaktosid (IPTG) induziert. Nach 20 h Expression wurden die Zellen zentrifugiert (4.000 rpm, 15 min, 4 °C) und in 30 ml Säulenpuffer mit einer Tablette Proteaseinhibitor aufgenommen.

2.4.1.3 Proteinexpression im zellfreien System

Um die Translokation und Prozessierung nukleär kodierter mitochondrialer Proteine zu untersuchen, war es notwendig, gezielt jeweils *precursor* oder matures Protein zu exprimieren und dabei den mitochondrialen Import mit der Prozessierung des *precursors in vivo* zu umgehen [177]. Es wurde auf ein zellfreies Expressionssystem zurückgegriffen, um das jeweilige Protein isoliert analysieren zu können [178-180]. Das Protokoll orientiert sich an den Herstellerangaben. Das zellfreie Expressionssystem basiert auf einem Retikulozytenlysat, welches die enzymatische Ausstattung der Transkription und Translation enthält. Durch Hinzugabe einer Matrizen-DNA wird das dort kodierende Genprodukt synthetisiert. Zur Transkriptionsinitiation mit dem verwendeten Kit ist ein T7-Promotor obligat. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 40 μ l Retikulozytenlysat und 0,5 μ g Plasmid-DNA zusammen. Mit 2 μ l von 2 mM Methionin wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l ergänzt. Die Synthese wurde bei 30 °C für 60 min durchgeführt.

2.4.2 Proteinextraktion aus eukaryoten Zellen

2.4.2.1 Proteinextraktion nach Transfektion

Nach Transfektion und einer je nach Experiment variablen Expressionszeit wurden die Zellen lysiert und das exprimierte Protein wurde extrahiert. Es wurde eine nach Ji *et al.*

adaptierte Methode angewandt [181, 182]. Mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 wurden die Zell- und Organellenmembranen permeabilisiert und Proteine in Lösung überführt [183]. Das gereinigte Zellpellet wurde in entsprechendem Volumen (zirka 50 µl pro $0,2 \times 10^6$ Zellen) 1 % Triton X-100 in HEPES-Puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (750 g, 10 min, 4 °C), um lösliches Protein von Zelldebris und nicht-lysierten Zellen zu trennen. Der Überstand konnte für weitere Analysen verwendet werden.

2.4.2.2 Proteinextraktion für die Affinitätschromatographie

Um ein (isotopenmarkiertes) Proteom aus COS-7-Zellen für Protein-Proteinsinteraktionsmessungen zu extrahieren und nachfolgend mit *in vitro* exprimiertem Protein zu inkubieren für Proteininteraktionsanalysen wurde ein Protokoll nach Hubner *et al.* modifiziert und adaptiert angewandt [184]. Es wurden 10×10^6 (isotopenmarkierte) COS-7 Zellen gewaschen, geerntet und die Suspension erneut dreimalig mit PBS vom restlichen Trypsin befreit (Kapitel 2.3.1.1). Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert. Das Lysat wurde nach 30 min Inkubation bei 4 °C zentrifugiert (750 g, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei gleicher Kondition zentrifugiert. Der letzte Überstand wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung asserviert.

2.4.3 Proteinextraktion aus prokaryoten Zellen

Die in Säulenpuffer suspendierten Bakterienzellen (Kapitel 2.4.1.2) wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert. Das Reaktionsgefäß wurde auf ein Eis-Ethanol-Gemisch platziert und mittels Ultraschall dreimalig bei einer Amplitude von 60 % sonifiziert (Puls: 0,8 s; Pause: 0,2 s). Das Lysat wurde anschließend zentrifugiert (15.000 g, 20 min, 4 °C) und der Überstand als *crude extract* zur Proteinreinigung verwendet.

2.4.4 Proteinreinigung mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie

Zur Reinigung des prokaryot exprimierten Proteins wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Die Methode wurde erstmals 1968 von Cuatrecasas *et al.* beschrieben [185]. Das Lysat wird hierzu durch eine Matrix in einer Säule bewegt. Die Matrix enthält Strukturen, an die ein (Fusions-) Protein binden kann. Das Protein wird dadurch in einer stationären Phase gehalten, sodass nach Waschen der Säule das Protein eluiert werden kann und gereinigt vorliegt. Des Weiteren trägt das Fusionieren zweier Proteine zu einer höheren Stabilität und besseren Löslichkeit eines zu reinigenden Proteins bei [186, 187]. Um die Proteine respektive deren Oligomerisierung zu trennen, wurde im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) durchgeführt. Dabei werden Moleküle durch eine Matrix geleitet, die aufgrund ihrer Oberflächenstruktur

kleinere Moleküle (Monomere) retiniert, während größere Moleküle (Polymere) die Struktur schneller passieren und somit eher die Säule verlassen [188]. Die Proteinreinigung wurde bei 4 °C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch filtriert und entgast und auf 4 °C temperiert. Die Affinitätschromatographie und SEC wurden semi-automatisiert mit FPLC gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Vor Gebrauch des Systems und der Säulen wurde mit 0,1 M NaOH gewaschen und die Säulen und das System im entsprechenden Puffer mit mindestens zwei Säulenvolumina äquilibriert. Bei der Affinitätssäule handelte es sich um eine Amylose-Matrix. Die Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/min auf die Amylose-Säule geladen. Die Säule wurde mit Säulenpuffer gewaschen, bis keine Absorption des Durchflusses bei 280 nm mehr detektiert werden konnte. Die Eluierung erfolgte mit Maltose-Puffer. Die Maltose konkurriert mit dem Amylose-Rest der Säule um die MBP-Bindung und kann aufgrund der höheren Affinität das Protein aus der stationären Phase lösen. Die Eluierung wurde mittels Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt und das Eluat automatisiert fraktioniert (jeweils 2 ml). Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und zur SEC weiterverwendet. Die SEC diente zum Auftrennen des gereinigten Proteins respektive dessen Oligomerisierung. Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde über eine Gelfiltrationssäule mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min chromatographisch aufgetrennt. Der Durchfluss wurde unter UV-Absorptionsbestimmung bei 280 nm fraktioniert und die Fraktionen der Absorptionsmaxima gesammelt. Die einzelnen Fraktionen der SEC wurden 1:10 verdünnt und mittels SDS-PAGE und BN-PAGE hinsichtlich ihrer Reinheit, ihres Molekulargewichtes und Oligomerisierungszustandes analysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Reaktion bestimmt (Kapitel 2.4.6).

2.4.5 Zellfraktionierung

Mittels Differentialzentrifugation lassen sich subzelluläre Bestandteile *in vitro* trennen. Ziel der hier angewandten Fraktionierung war die Differenzierung zwischen Cytosol und (intaktem) Mitochondrium. Es wurde die Methode nach Pallotti *et al.*, basierend auf Yang *et al.*, mit Modifikationen angewendet [174, 189]. 12×10^6 COS-7-Zellen wurden wie beschrieben transfiziert, zur Proteinexpression inkubiert und nach 24 – 48 h geerntet (Kapitel 2.3.1.2). Alle der im Folgenden verwendeten Lösungen waren auf 4 °C temperiert. Das Prozedere fand stets bei 4 °C statt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lösung A resuspendiert, in einen Homogenisator entsprechenden Fassungsvermögens überführt und mit 30 Hieben homogenisiert. Es folgte die Zentrifugation (750 g, 10 min, 4 °C) des Homogenisates. Der postnukleäre Überstand (900 µl) wurde abgenommen und erneut zentrifugiert (750 g, 10 min, 4 °C). Um die cytosolische von der mitochondrialen Fraktion zu trennen, wurde eine Zentrifugation bei 12.000 g für 20 min bei 4 °C durchgeführt. Im Pellet fand sich die mitochondriale, im Überstand die cytosolische Fraktion. Das Pellet konnte in SEM-Puffer aufgenommen werden und beide Fraktionen wurden erneut zentrifugiert, um Kontaminanten zu entfernen. Anschließend wurden mittels Bradford-Reaktion (Kapitel 2.4.6) die Gesamtproteinmenge der Fraktionen bestimmt und die Fraktionen äquimolar für weitere Experimente eingesetzt.

2.4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Mittels Bradford-Reaktion wurde die Gesamtproteinkonzentration einer Lösung bestimmt. Die Reaktion basiert auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine. Die Bindung induziert eine Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm, die gemessen und mit der Farbänderung einer Standardreihe korreliert werden kann [190]. Zur Korrelation der Absorption mit der Proteinkonzentration wurde der Quotient aus der Absorption bei 590 nm und 450 nm bestimmt [191]. Die Farbreaktion ist sensitiv gegenüber Detergenzien in höheren Konzentrationen. Bei Proben mit Detergenzien (Lysate) wurden deshalb nur relative Proteinmengenkonzentrationen mittels Bradford-Reaktion gemessen. Als Farbstoff und Probenstandards wurde das Kit Quick Start Bradford Protein Assay verwendet. Die Absorption wurde in einer 96-*well* Platte mittels FLUOstar Optima bestimmt. Die Absorption der Standards wurde gegen die bekannte Konzentration aufgetragen und der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt. Es wurde ein Korrelationskoeffizient $r > 0,95$ für die Verwendung der Daten vorausgesetzt. Aus der linearen Regression konnte die Konzentration der Probe berechnet werden.

2.4.7 SDS-Gelelektrophorese

Um Proteine in Lösung respektive ihrer Masse aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt [192-194]. Um den Proteinen eine (einheitliche) Ladung zu verleihen, wurden die Probe mit LDS-Ladungspuffer versetzt. Hierfür wurde NuPAGE LDS Sample Buffer und NuPAGE Sample Reducing Agent entsprechend den Herstellerinformationen mit der Probe vermischt und für 5 min bei 95 °C thermisch denaturiert. Die präparierten Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen oder bei -20 °C gelagert. Die Elektrophorese wurde mit 10- oder 20-*well* Bis-Tris Proteingelen durchgeführt. Das jeweilige Gel wurde mit Laufpuffer umspült in eine Elektrophoresekammer gespannt. 4 µl des Proteinstandards und 10 µl der Probe wurden in Taschen der Gele geladen und die Proteine bei 120 V für 60 – 90 min aufgetrennt.

2.4.8 Blue Native PAGE (BN-PAGE)

Schägger *et al.* beschrieben 1991 erstmals eine Elektrophorese, bei der die Proteine in ihrer ursprünglichen Konformation erhalten blieben. Dabei konnten Atmungskettenkomplexe *in toto* identifiziert werden [195]. Die *blue native polyacrylamide gelelectrophoresis* (BN-PAGE) ist eine elektrophoretische Methode, bei der nicht SDS, sondern *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB G-250) an Proteine bindet. Das durchgeführte Protokoll orientiert sich an Wittig *et al.* [196]. Sämtliche Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt. Bei detergenzhaltigen Proben wurde ein Viertel des Detergenzvolumens an NativePAGE 5 % G-250 Sample Additive hinzugegeben. Es wurden 10 µl der Probe sowie 3 µl Proteinstandards pro *well* in ein Gel geladen. Die

Elektrophoresekammer wurde mit Anodenpuffer und Kathodenpuffer befüllt. Die Proteine wurden für 60 min bei 150 V, dann für weitere 90 min bei 250 V bei 4 °C aufgetrennt.

2.4.9 Coomassie-Färbung von SDS- und BN-PAGE-Gelen

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (CBB) wurde zum Färben der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in einem Gel verwendet [197]. Das Gel wurde nach der Elektrophorese in destilliertem Wasser gewaschen und für bis zu 30 min in 100 % CBB inkubiert. Der Farbstoff wurde verworfen und das Gel erneut in destilliertem Wasser gewaschen. Um unspezifische Färbungen des Gels zu entfernen, wurde das Gel anschließend in Entfärberlösung getränkt, für 20 s und 600 W in der Mikrowelle erhitzt und schließlich schüttelnd inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

2.4.10 Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Neben der Coomassie-Färbung wurde die Silberfärbung nach Chevallet *et al.* angewandt [198]. Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie-Färbung sensitiver. Somit konnten auch Proteine aus Proben mit geringerer Proteinkonzentration nach der Gelelektrophorese im Gel gefärbt werden.

2.4.11 Western Blot

Towbin *et al.* beschrieben 1979 erstmals den Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinprobe auf eine Nitrocellulosemembran [199, 200]. Die Methode erlaubt, Proteine vom Polyacrylamidgel in eine immobile Phase zu überführen, wo sie mit Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden können.

2.4.11.1 Proteintransfer

Es wurde eine *semi-dry*-Methode gewählt, die im Transferpuffer nach Towbin *et al.* durchgeführt wurde [199, 201]. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese zeigt eine höhere Spezifität bei der Detektion, wenngleich sie hinsichtlich der Proteinbindekapazität gegenüber einer PVDF-Membran unterlegen ist [202, 203]. Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel wurden vor Gebrauch beziehungsweise Weiterverarbeitung im Transferpuffer äquilibriert. Auf die Anode der Blottingkammer wurden drei in Puffer getränkte Filterpapiere platziert. Es folgte die Nitrocellulosemembran, schließlich das Polyacrylamidgel. Die obere Schicht wurde erneut durch drei getränkte Filterpapiere gebildet. Die Konstruktion schloss mit der Kathode vertikal ab. Es wurde ein elektrisches Feld mit 2 mA/cm² Membran angelegt und die Proteine für 90 min transferiert.

2.4.11.2 Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen der Membran

Unspezifische Antikörperbindestellen der Membran wurden nach durchgeführtem Proteintransfer mit 5 % Milchpulver (w/v) in TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v), für eine Stunde bei Raumtemperatur oder 16 Stunden bei 4 °C blockiert [204].

2.4.11.3 Proteinmarkierung mittels Antikörper

Um spezifisch auf die Membran transferierte Proteine zu identifizieren, wurde die Membran mit Antikörpern inkubiert (vgl. Kapitel 2.1.5). Primäre Antikörper sind gegen ein Epitop des jeweiligen Proteins gerichtet. Die Membran wurde mit der Antikörperlösung 1 – 2 h bei Raumtemperatur oder 16 Stunden bei 4 °C bei angegebenen Verdünnungen in 5 % Milchpulver (w/v) in TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v) inkubiert (Tabelle 17).

Antikörper	Organismus	Verdünnung	Inkubationszeit [h]
anti-V5	Maus	1:5.000	1
anti-GAPDH	Maus	1:40.000	1
anti-Hsp60	Kaninchen	1:2.000	2
anti-Tubulin	Maus	1:5.000	1
anti-GCDH	Kaninchen	1:500	2
anti-PAH	Maus	1:1.000	1
anti-Hsc70	Ratte	1:1.000	2

Tabelle 17: Primäre Antikörper.

Nach entsprechender Inkubation wurde die Membran dreimalig mit TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v) für jeweils 2 min gewaschen. Der sekundäre Antikörper ist spezifisch gegen das F_c-Fragment der jeweiligen Spezies des ersten Antikörpers gerichtet und an HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt. Die Membran wurde hiermit je nach Affinität 1 – 16 h bei Raumtemperatur oder 4 °C bei angegebenen Verdünnungen in 5 % Milchpulver (w/v) in TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v) inkubiert (Tabelle 18).

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit [h]
anti-Maus-HRP	1:20.000	1
anti-Kaninchen-HRP	1:20.000	1
anti-Ratte-HRP	1:20.000	1

Tabelle 18: Sekundäre Antikörper.

Als Ladungskontrolle wurde die relative Menge des Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) für cytosolische Proben oder Gesamtzelllysate bestimmt [205]. Die Membran wurde nach Antikörperbindung mit TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v) gewaschen und bei 4 °C bis zur Detektion gelagert.

2.4.11.4 Detektion des Immunoblots

Die mit Antikörpern auf den beschichteten Nitrocellulosemembran markierten Proteine wurden mittels der *enhanced-chemiluminescence*-Lösung (ECL) detektiert [206]. Die an sekundäre Antikörper gekoppelte *horseradish peroxidase* (HRP) katalysiert mittels H_2O_2 die Oxidation von Luminol, einem Lumineszenzfarbstoff. Das (instabile) Zwischenprodukt der Oxidation emittiert Licht, welches detektiert werden kann und (eingeschränkt) mit der Proteinmenge der initialen Probe korreliert [205]. Die Nitrocellulosemembran wurde zur Reduktion des Hintergrundes mit destilliertem Wasser gewaschen [207]. Das Substrat wurde auf die Membran gegeben und das emittierte Licht sofort detektiert. Als Substrat wurde das ECL Western Blotting Substrate gemäß Herstellerangaben verwendet. Bei zu schwachem Signal wurde SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate als Substrat der HRP eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einer UV-Kamera. Die Belichtungszeit variierte je nach Signalintensität zwischen 1 Sekunde und 5 min. Die Daten wurden mittels Software des Herstellers im *tagged image file format* (.tif) exportiert und mittels der Software ImageJ visualisiert und quantifiziert.

2.4.11.5 Auflösen der Antikörperbindung auf Membranen

Um mehrere Proteine, die sich nur marginal in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, auf einer Membran detektieren zu können, können Antikörperbindungen aufgelöst werden (*membrane stripping*) [208]. In einem Folgeschritt kann dann ein zweites zu untersuchendes Protein auf derselben Membran gefärbt werden. Die antikörpergebundene Nitrocellulosemembran wurde hierzu mit TBS mit 0,05 % Tween 20 (v/v) gewaschen und anschließend für 45 min bei Raumtemperatur mit Restore Western Blot Stripping Buffer inkubiert. Nach erneutem Waschen und Blockieren (Kapitel 2.4.11.2) konnten weitere Proteine mit anderen primären Antikörpern markiert werden.

2.4.11.6 Quantifizierung der relativen Proteinmengen

Die Proteinbanden wurden nach Detektion aus den unverarbeiteten Dateien mittels der Software ImageJ quantifiziert. Zur besseren Veranschaulichung wurden Rohwerte teilweise mit einem konstanten Faktor multipliziert und für weitere Berechnungen in Microsoft Excel oder RStudio importiert.

2.4.12 Dot Blot

Die immunoreaktive Menge eines Proteins wurde nach einem modifizierten Protokoll von Storey *et al.* und Panigrahi *et al.* mittels Dot Blot bestimmt [209, 210]. Auf eine trockene, unbehandelte Nitrocellulosemembran wurde 1 µl eines Zellysats getropft. Die Membran wurde für 30 min unter Raumtemperatur getrocknet. Es folgte das Blockieren und Quantifizieren der Membran (vgl. Kapitel 2.4.11).

2.4.13 *Transfection competition assay*

Zur Identifikation bestimmter DNA-Motive, die zum Verständnis der Aktivität von Promotoren dienen, haben Hube *et al.* eine Ko-Transfektion von Promotor und doppelsträngigen Oligonukleotiden, die die Transkriptionsfaktorbindestellen inhibieren, angewandt [211]. Ein modifiziertes Vorgehen wurde angewandt, um die Synthese eines zu untersuchenden Proteins zu kontrollieren. Durch Ko-Transfektion zweier proteinkodierender Plasmide konnte die Kapazität der Proteinbiosynthese zugunsten eines Kontrollproteins ausgelastet werden, um so die Synthese des zu untersuchenden Proteins kontrollieren zu können. Es musste eine zunehmende Menge der cDNA eines Kontrollproteins zu einer konstanten Menge der cDNA des zu untersuchenden Proteins transfiziert werden. Es stellte sich ein Verhältnis von (konstanten) 0,2 µg cDNA (Kontrollprotein) zu 0 – 1,4 µg cDNA des zu untersuchenden Proteins als effektiv heraus. Mit zunehmender Menge der Kontrollprotein-cDNA nahm die Menge des zu untersuchenden Proteins ab. Diese Methode erwies sich als robuster gegenüber Störungen als eine alleinige Reduktion der transfizierten DNA-Menge des zu untersuchenden Proteins.

2.4.14 *Protein protection assay*

Zur Bestimmung der Lokalisation eines Proteins innerhalb oder außerhalb der äußeren Mitochondrienmembran wurde dessen Sensitivität gegenüber limitierter Proteolyse durch Proteinase K gemäß eines modifizierten Protokolls nach Ryan *et al.* getestet [212]. Nach Proteinexpression im eukaryoten System (Kapitel 2.4.1.1) wurde eine mitochondriale Fraktion wie zuvor beschrieben aufgereinigt (Kapitel 2.4.5). Die Mitochondrien wurden in 200 µl SEM-Puffer aufgenommen und in jeweils 95 µl aliquotiert. Proteinase K wurde in einer finalen

Konzentration von 50 µg/ml zu einem Aliquot gegeben, das entsprechende Volumen SEM-Puffer zu dem anderen (Kontrolle). Es wurde 15 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die Hinzugabe von finalen 5 mM PMSF sowie die Inkubation bei 4 °C für 10 min beendete die Reaktion. Die Mitochondrien wurden erneut isoliert (12.000 g, 20 min, 4 °C) und in 75 µl SEM-Puffer mit 1 % Triton X-100 (v/v) und 5 mM PMSF resuspendiert. Zur Lyse der Mitochondrien wurde dieser Ansatz für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die cytosolische Fraktion wurde zur Solubilisierung der Proteine mit 1 % Triton X-100 (v/v) versetzt. Mittels Bradford-Reaktion wurden die Gesamtproteinkonzentrationen der Proben (einschließlich cytosolischer Fraktion) bestimmt und gleiche Gesamtproteinmengen wurden in eine SDS-PAGE geladen. Die immunchemische Färbung im folgenden Western Blot konnte die Lokalisation des Proteins von Interesse zeigen. Proteine der mitochondrialen Matrix, des Intermembranraumes und der beiden Membranen sind durch die Doppelmembran des Organelles der Proteinase K unzugänglich und bleiben intakt (Abbildung 6, **A**). Proteine, die an der cytosolischen Seite der Mitochondrienmembran gebunden sind, unterliegen der Proteolyse, werden zu Peptidfragmenten abgebaut und können nicht detektiert werden (Abbildung 6, **B**).

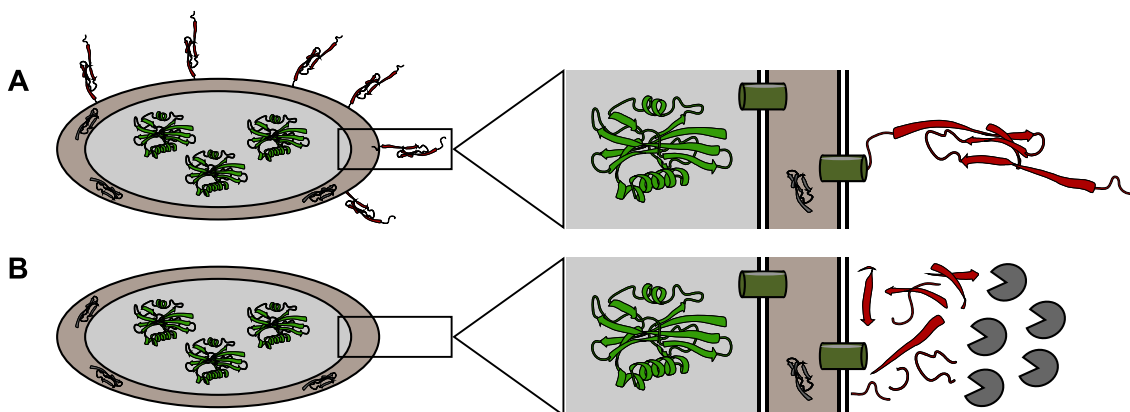


Abbildung 6: Protein protection assay (schematische Darstellung). Mitochondrien in Abwesenheit (**A**) und Gegenwart (**B**) der Proteinase K (grau, rechts unten). Periphere Proteine der äußeren mitochondrialen Matrix (rot) liegen nach Proteinase-K-Verdau lediglich als Peptidfragmente vor und können nicht mehr nachgewiesen werden. Proteine des Intermembranraumes (grau) und der Matrix (grün) sind durch die Doppelmembran der Proteinase K unzugänglich und können nach Lyse der mitochondrialen Membran noch nachgewiesen werden (Proteinabbildung modifiziert nach NADYA, 13.11.2016, <http://www.clker.com/clipart-protein-structure-.html>, CC0-Lizenz).

2.4.15 Fluoreszenzmikroskopie

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu bestimmen, wurde eine Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. $0,2 \times 10^6$ COS-7-Zellen wurden auf µ-Slides ausgesät und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Vor der Färbung wurden die Zellen mit MitoTracker (1:300 verdünnt in RPMI-Medium ohne FBS und Antibiotika) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert und mit 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Das Blockieren von unspezifischen Bindestellen erfolgte durch Inkubation mit 1 (w/v) Albumin in PBS. Der primäre Antikörper wurde in einem

Verhältnis von 1:200 in gelöstem Albumin verdünnt und für mindestens 2 h mit den Zellen inkubiert. Der sekundäre Antikörper (goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody, Alexa Fluor 488) wurde in gleichem Verhältnis verdünnt und für mindestens 1 h mit den Zellen inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimalig mit PBS gewaschen. Das Arbeitsvolumen betrug 150 µl pro Probe. Vor der Mikroskopie wurden die Proben mit Vectashield, das 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) beinhaltete, versehen, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu minimieren und die Zellkerne zu färben. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden die jeweiligen Fluorochrome (AlexaFluor488, DAPI, MitoTracker) mit Licht der entsprechenden Wellenlänge angeregt. Das emittierte Licht jedes Fluorophors wurde separat über jeweils einen entsprechenden Filter detektiert und das Signal für jeden der drei Kanäle aufgenommen. Die Färbung und Superposition der Bilddateien erfolgte mit ImageJ.

2.4.16 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

Zur Messung von Protein-Proteininteraktionen existieren zahlreiche experimentelle Möglichkeiten [213]. Zur Bestimmung der Interaktionspartner der GCDH wurden Affinitätsaufreinigung mit massenspektrometrischer Analyse der Proteine (*affinity purification coupled mass spectrometry*, AP-MS/MS), Ko-Immunopräzipitation sowie fluoreszenzbasierte Methoden (Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer, BRET, und *luminescence-based mammalian interactome assay*, LUMIER) angewandt.

2.4.16.1 *Affinity purification coupled mass spectrometry* (AP-MS/MS)

Zu Identifikation von Protein-Protein-Interaktoren der GCDH wurde eine hypothesenfreie *in-vitro*-Methode, die *affinity purification coupled mass spectrometry* (AP-MS/MS) angewandt, wie sie vor allem zur Studie des Hefe-Proteoms verwendet wird [214-217]. Im prokaryoten System wurde ein Fusionsprotein von MBP und GCDH ohne MTS synthetisiert (MBP-GCDH_{ΔMTS}), die anschließend *in vitro* mit Proteinen aus eukaryoten Zellen interagieren konnte. Bei der anschließenden Aufreinigung der MBP-GCDH_{ΔMTS} mittels Affinitätschromatographie wurden Interaktoren, die sekundär an der MBP- GCDH_{ΔMTS} gebunden wurden, mit aufgereinigt. Die Identifikation der Interaktoren erfolgte mittels Massenspektrometrie (Abbildung 7). Zuvor wurden Zellen kultiviert, deren jeweils ein Zellkulturmedium mit schweren, mittelschweren und leichten isotope markierten Aminosäuren zugesetzt wurden. Nach fünfmaligem Splitten der Zellen wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate, die jeweils leichte, mittelschwere und schwere isotope markierte Proteine enthielten, für die weiteren Analysen verwendet. Es wurden Bindepartner des MBP-GCDH_{ΔMTS} Wildtyps sowie der R138G-Variante untersucht. Das Experiment wurde in 2 Kombinationen durchgeführt: In einem ersten Experiment wurde Wildtyp MBP-GCDH_{ΔMTS} mit Zelllysaten aus der Zellkultur mit schweren, R138G MBP-GCDH_{ΔMTS} mit mittelschweren und MBP (Kontrolle) mit leichten Isotopen inkubiert. In einem

zweiten Experiment wurden die Isotopenmarkierungen rotiert: Wildtyp MBP-GCDH_{ΔMTS} (mittelschwer), R138G MBP-GCDH_{ΔMTS} (leicht) und MBP (schwer).

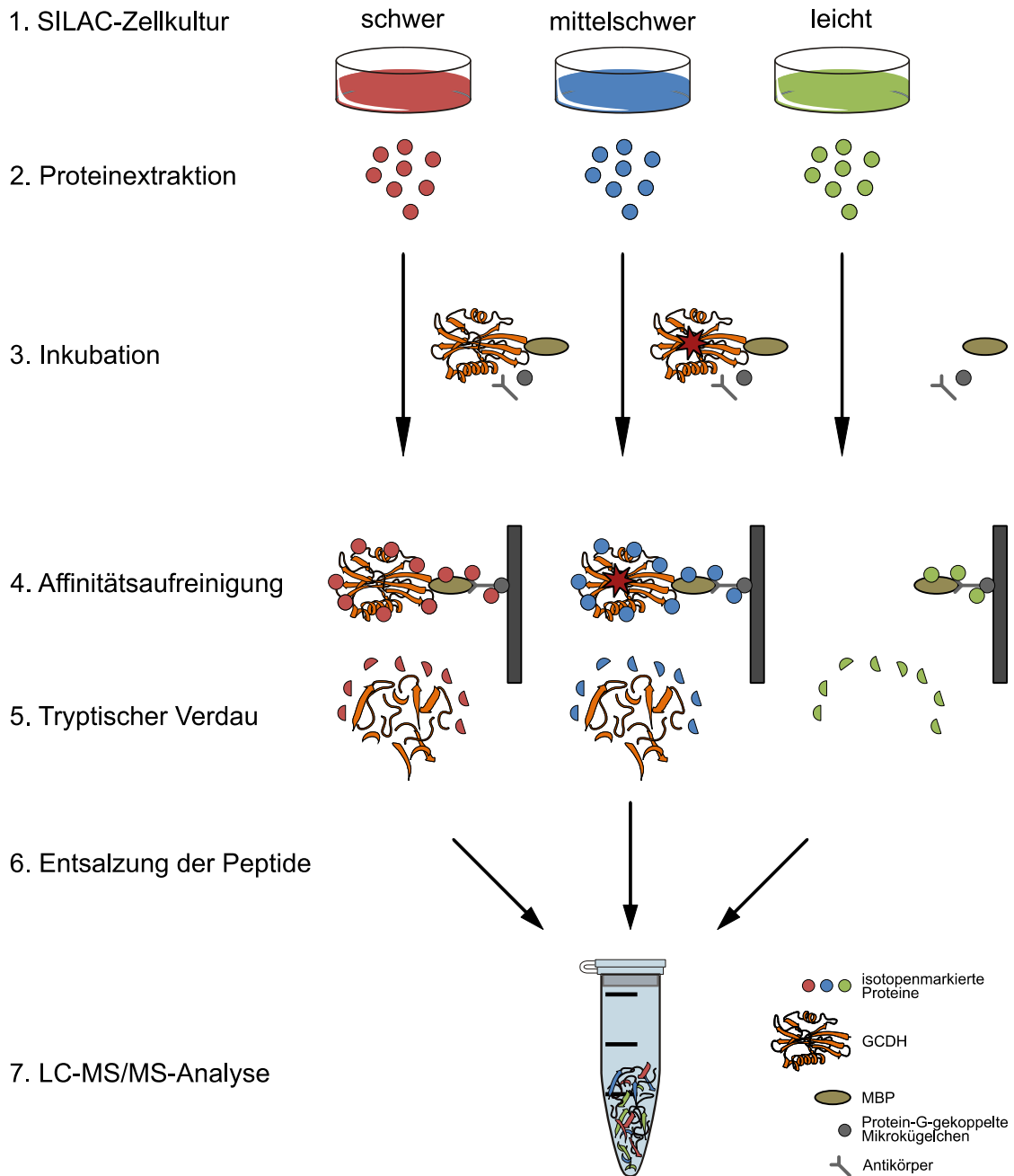


Abbildung 7: Schematische Darstellung der affinity coupled mass spectrometry (AP-MS/MS). COS-7-Zellen wurden in isotopenmarkierten Medien kultiviert (1). Nach Proteinextraktion erfolgte die Inkubation mit rekombinantem MBP-GCDH_{ΔMTS} (2, 3, maltosebindendes Protein, grün; GCDH_{ΔMTS}, orange) und anti-MBP-Antiserum sowie Protein-G-gekoppelte Mikrokügelchen (grau). Der Proteinkomplex wurde mittels Affinitätsaufreinigung angereichert und die Proteine auf der Säule mit Trypsin verdaut (4, 5). Die gewonnenen Peptide wurden nach Entsalzung mittels MS/MS identifiziert (6, 7) (Proteinabbildung modifiziert nach NADYA, 2016, <http://www.clker.com/clipart-protein-strukture-.html>, Petrischalenabbildung und Reaktionsgefäßabbildung modifiziert nach OCAL, 2007, <http://www.clker.com/clipart-9635.html> und <http://www.clker.com/clipart-11526.html>, alle CC0-Lizenz).

Affinitätsaufreinigung

Die Affinitätschromatographie wurde modifiziert nach Huber *et al.* durchgeführt [184]. Um aus den gebundenen Proteinen die für die Massenspektrometrie notwendigen Peptidfragmente zu generieren, wurde ein tryptischer Verdau direkt auf der Chromatographiesäule durchgeführt [218]. Es wurde 200 μl (isotopenmarkiertes) Lysat einer Konzentration von 5 mg/ml Protein (Kapitel 2.4.2.2) zu 5 ng/ μl gereinigtem Protein (Kapitel 2.4.4) gegeben. Wurden mehrere, unterschiedlich markierte Lysate verwendet, so wurden die Konzentrationen durch Verdünnung angepasst. Um ein Binden von potentiellen Interaktoren der MBP-GCDH ΔMTS zu gewährleisten, wurde die Lösung 60 min bei 20 °C inkubiert. 1 μg anti-MBP-Antiserum wurde mit 50 μl einer Lösung mit Protein-G-gebundenen magnetischen Mikrokügelchen für 2 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe (MBP-GCDH ΔMTS mit Lysat) zu den antikörpergebundenen *beads* hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die Säulen (M Columns) mit 1 ml Lysepuffer äquilibriert. 240 μl der Probe wurden auf die Säule geladen, der Durchfluss verworfen und die Säule dreimalig mit Puffer 1 und fünfmalig mit Puffer 2 gewaschen.

Tryptischer Verdau der Proteine auf der Säule

Antikörpergebundene MBP-GCDH ΔMTS und mögliche Protein-Protein-Interaktoren befanden sich nun in der stationären Phase der Säule. Um sie zu eluieren und gleichzeitig für die massenspektrometrische Analyse zu verdauen, wurde ein tryptischer Verdau direkt auf der Chromatographiesäule durchgeführt [184]. 100 μl Trypsin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Trypsin-Puffer wurden auf die Säule gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Peptide zweimalig mit jeweils 50 μl Elutionspuffer eluiert. Die durchgeflossenen Proben wurden gesammelt und zusammengeführt und für 16 h bei 37 °C zur vollständigen Proteolyse inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Säuredenaturierung der Protease mit 0,5 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) beendet. Mit einem Indikatorpapier wurde der pH-Wert der Probenlösung bestimmt. Da die Peptide protoniert und geladen vorliegen sollten, sollte dieser nicht größer 3 sein und wurde bei Bedarf mit TFA titriert. Das Lösungsmittel der Proben wurde vollständig evaporiert und die Peptide gegebenenfalls bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Zum Entsalzen wurden die Peptide an eine C18-Matrix gebunden, gewaschen und mit Acetonitril eluiert. Hierzu wurden zwei kreisrunde Fragmente aus C18-Extraktionsmaterial (3M Empore C18 Extraction Disks) mit einem Durchmesser von 2 mm ausgestanzt. Diese wurden mit einer Sonde in eine Pipettenspitze (Fassungsvermögen: 20 μl bis 200 μl) gestopft. Die daraus entstandene Säule wurde zweimalig mit 20 μl 100 % Acetonitril (ACN) und dreimalig mit 20 μl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert (Zentrifugation: 1.500 rpm, 5 min, Raumtemperatur). Die Peptide der Proben wurden in 0,1 % (v/v) TFA gelöst und auf jeweils eine C18-Säule gegeben. Durch Zentrifugation (1.400 rpm, 5 min, Raumtemperatur) wurden die Peptide an die Matrix gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säulen wurden zweimalig mit 0,1 % (v/v) TFA gewaschen, der Durchfluss verworfen. Mit 10 μl 70 % (v/v) ACN in 1 % (v/v) Ameisensäure konnten die Peptide eluiert werden. Das Lösungsmittel

wurde erneut evaporiert und die lyophilisierten Peptide in 5 µl 5 % (v/v) Ameisensäure im Ultraschallbad gelöst und in den Probenverteiler des Chromatographen gegeben.

Peptididentifikation mittels Massenspektrometrie

Die Peptidproben wurden chromatographisch mittels aufgetrennt und direkt in das Massenspektrometer mittels Elektrosprayinjektion (ESI) injiziert [219]. Bei der Chromatographiesäule handelte es sich um eine 25 cm Reverse-Phase-Säule, die mit Repro-Sil-Pur Silikat einer Porengröße von 1,9 µm beladen war. Die Proben wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 µl/min auf die Säule geladen. Die Eluierung erfolgte im Gradienten (0 – 95 %) über 120 min von 0,2 % (v/v) Ameisensäure in Wasser zu 0,2 % (v/v) Ameisensäure in 100 % Acetonitril bei einer Flussgeschwindigkeit von 250 nl/min.[220] Die Tandem-Massenspektrometrie-Analyse wurde nach etabliertem Protokoll durchgeführt [220]. Die Identifikation der Peptide (beziehungsweise Proteine) wurde mittels MaxQuant (Version 1.3.0.5) durchgeführt und mit der UNIPROT-Datenbank *homo sapiens* abgeglichen [221].

Ziel war es, unspezifisch präzipitierte Proteine von spezifischen Interaktoren der MBP-GCDH_{ΔMTS} zu identifizieren. Keilhauer *et al.* konnten ein *beadome* identifizieren [222]. Dabei handelt es sich um Proteine, die nicht mit dem zu untersuchenden Protein präzipitiert werden, sondern unspezifisch an die Säule beziehungsweise die Affinitätsmatrix binden. Die relative Menge der präzipitierten Proteine wurde mittels MaxQuant berechnet. Die intensitätsbasierte absolute Quantifizierung (iBAQ) wurde für jedes Protein berechnet, indem die gemessene Peptidintensität durch die Anzahl der theoretisch zu detektierenden Peptide geteilt wurde [223]. Dieser Quantifizierungswert wurde für ein Protein in allen Proben (schwer, mittelschwer, leicht, jeweils für beide Kombinationen) bestimmt. Das iBAQ-Verhältnis gibt Aufschluss über die Anreicherung eines Proteins in einer bestimmten Probe. Somit konnten spezifische Protein-Protein-Interaktionspartner von unspezifischem Hintergrund differenziert werden.

Entfaltung des rekombinanten Proteins

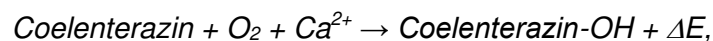
Um den Einfluss des Faltungszustandes auf die Protein-Protein-Interaktion zu analysieren, wurde in einem separaten Experiment MBP-GCDH_{ΔMTS} chemisch denaturiert und im Anschluss die Interaktion von Wildtyp und varianter MBP-GCDH_{ΔMTS} mit Zelllysatproteinen gemessen. Zur MBP-GCDH_{ΔMTS} wurde 200 % (v/v) 100 % (NH₄)₂SO₄ gegeben und die Lösung bei 4 °C für 30 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 20.000 g bei 4 °C über 20 min. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das resultierende Pellet wurde in 15 µl Urea-Puffer aufgenommen und für die weiteren Experimente verwendet.

2.4.16.2 Ko-Immunopräzipitation

Um Protein-Protein-Interaktionen, die mittels AP-MS/MS identifiziert wurden, zu verifizieren, wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. GCDH wurde als Fusionsprotein mit einer Affinitätsmarkierung (V5-6xHis) exprimiert und aus einem Zelllysats über eine Affinitätsaufreinigung isoliert. In einem zweiten Schritt wurde in dieser Probe potentielle Interaktionspartner mittels Western Blot detektiert [224]. 2×10^6 COS-7-Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ cDNA, die für GCDH-V5-6xHis kodiert, transfiziert. Nach 48 h Expression wurden die Zellen chemisch mittels 1 % (v/v) Triton-X-100 in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) lysiert. Die Probe wurde mit $2,5 \mu\text{g}$ anti-V5-Antikörper sowie $50 \mu\text{l}$ an Protein-G gekoppelten magnetischen Mikrokügelchen für 30 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Zwischenzeitlich wurden Säulen (μ Columns) in einem vorgesehenen Ständer, der ein elektromagnetisches Feld appliziert (μ MACS Separator), angebracht und mit Lysepuffer äquilibriert. Nach der Inkubation wurde die Probe auf die Säule geladen und vierfach mit jeweils $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen. Der Durchfluss sowie die einzelnen Waschschrte wurden asserviert. Anschließend wurde das Protein mit $50 \mu\text{l}$ SDS-Puffer ($95 \text{ }^\circ\text{C}$) zweimalig eluiert. Als Kontrollen dienten Proben ohne Antikörper, mit nicht gegen GCDH-V5-6xHis gerichtetem Antikörper und ein Ansatz ohne GCDH-V5-6xHis, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Sämtliche Fraktionen wurden mittels Western Blot auf das Vorhandensein der GCDH-V5-6xHis sowie des hypothetischen Protein-Protein-Interaktors überprüft.

2.4.16.3 Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)

Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) wurde verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle zu untersuchen [225]. Hierzu wurden zwei Proteine jeweils als Fusionsprotein mit *Renilla*-Luziferase (hRluc) und Venus exprimiert. Venus ist eine Mutante des gelbfluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent protein*, YFP, F46L/F64L/M153T/V163A/S175G) mit dreißigfacher relativer Fluoreszenzstärke im Vergleich zu YFP mit einem Emissionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 528 \text{ nm}$ bei einer Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$ [226]. Das Enzym *Renilla*-Luziferase katalysiert die Reaktion von



wobei die freiwerdende Energie (ΔE) als Licht mit $\lambda_{\text{max}} = 475 \text{ nm}$ detektiert werden kann [227]. Zwei Proteine, deren Interaktion untersucht werden soll, werden als C- und N-terminales Fusionsprotein mit jeweils Venus und hRluc ko-exprimiert. Es ergibt sich eine Matrix mit acht verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten (Abbildung 8, **A**). Alle acht Kombinationsmöglichkeiten wurden bei der zu testenden Protein-Protein-Interaktion gemessen, da die Position des hRluc und Venus sowie der Fusionspartner *per se* einen Einfluss auf Stabilität und Faltung des Fusionsproteins sowie die Protein-Protein-Interaktion haben können. So können Interaktionsepitope eines Proteins durch das Fusionsprotein maskiert und Interaktionen zu dem zu untersuchenden Partnerprotein verhindert werden [228,

229]. Befinden sich die beiden Fusionsproteine in räumlicher Nähe ($r < 100 \text{ \AA}$, entsprechend dem Förster-Radius), so kann eine Energieübertragung stattfinden. Die aus der Coelenterazinreaktion freiwerdende Energie (hRluc: Donor) wird auf Venus übertragen (Akzeptor). Dies führt zu einer Anregung des Venus, dessen Emission detektiert werden kann (Abbildung 8, **B – E**) [228, 230]. Die simultane Detektion von Donor- und Akzeptor-Signal ergibt den BRET-Wert der Protein-Protein-Interaktion.

Um Protein-Protein-Interaktionen zu analysieren, wurden $0,2 \times 10^6$ COS-7-Zellen mit $0,25 \mu\text{g}$ cDNA des Donors und $0,75 \mu\text{g}$ des Akzeptors transfiziert (Nukleofektion) und für 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer 96-well Platte mit $200 \mu\text{l}$ RPMI-Medium inkubiert. Das Coelenterazin wurde in Methanol gelöst (1 mg/ml) und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Vor der Messung wurden $127 \mu\text{l}$ der Lösung mit 1 ml Reaktionspuffer und $6,6 \text{ ml}$ PBS verdünnt. Zur Detektion wurde $150 \mu\text{l}$ des Mediums abgenommen und in einem automatisierten Verfahren das Coelenterazin mit einer finalen Konzentration $c_{\text{CTZ}} = 30 \mu\text{M}$ pro well injiziert. Es folgte die duale Lumineszenzmessung (PHERAstar FSX) mit 10 Messintervallen à 20 ms mit einem Emissionsfilterset für $535 \pm 30 \text{ nm}$ (Venus) und $475 \pm 30 \text{ nm}$ (hRluc/CTZ). Um einen Energietransfer zu bestimmen, wurde eine BRET *ratio* bestimmt [231]. In einem ersten Schritt wurde geprüft, ob das Luziferase-Signal $\text{Emission}_{\text{hRluc}} > 18358,6$ ist (Grenzwert nach Kalibrierung der Methode). Dann wurden die Signale beider Kanäle ins Verhältnis gesetzt:

$$BRET = \frac{\text{Emission}_{\text{Venus}}(535 \pm 30 \text{ nm})}{\text{Emission}_{\text{hRluc}}(475 \pm 30 \text{ nm})}$$

Hiervon wurde das Hintergrundsignal subtrahiert, das aus einer BRET-Messung von Zellen, die ausschließlich hRluc-Fusionsproteine (hRluc-GCDH oder Pex19-hRluc, kein Akzeptor) exprimierten, resultierte:

$$BRET_{\text{Hintergrund}} = \frac{\text{Emission}_{\text{Venus}}(535 \pm 30 \text{ nm})}{\text{Emission}_{\text{hRluc}}(475 \pm 30 \text{ nm})}$$

sodass schließlich der BRET-Wert berechnet werden konnte:

$$BRET - \text{Wert} = BRET - BRET_{\text{Hintergrund}}$$

Um Protein-Protein-Interaktionen aus den errechneten Werten zu ermitteln, wurde einerseits eine statistische Methode, andererseits eine interne Validierungsmethode angewandt. So wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ein p-Wert für H_0 : BRET-Wert = 0 berechnet. Des Weiteren wurden Toleranzgrenzwerte für den absoluten Wert der BRET-Wert auf Basis interner Kalibrierungen festgelegt. Eine

$$BRET - \text{Wert} > 0,0263$$

zeugte von einer positiven Interaktion, für

$$0,0263 > BRET - \text{Wert} > 0,0091$$

wurde ein Graubereich definiert.

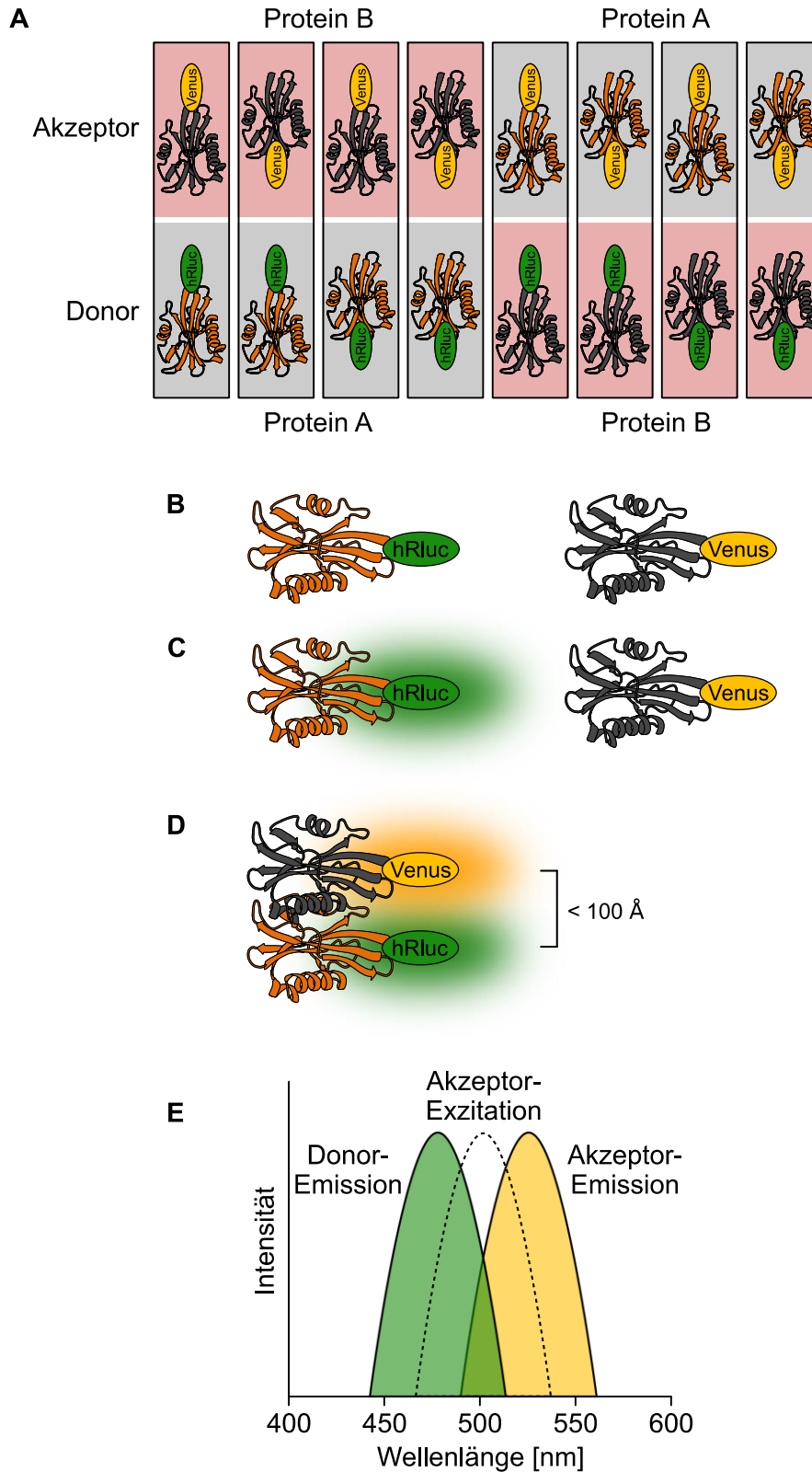


Abbildung 8: Schematisierte Darstellung des BRET. Proteine, deren Interaktion untersucht werden soll, werden jeweils N- und C-terminal mit Venus (gelb), einer Variante des gelbfluoreszierenden Proteins (*yellow fluorescent proteins*, YFP), sowie der Luziferase aus *Renilla reniformis* (hRluc) als Fusionsproteine in acht Kombinationen ko-exprimiert (**A**, **B**). Nach Hinzugabe des hRluc-Substrates Coelenterazin wird Licht durch hRluc emittiert (**C**). Befinden sich beide zu untersuchende Proteine in räumlicher Nähe ($r < 100 \text{ \AA}$), kann Energie aus der hRluc-Reaktion (Donor) auf Venus (Akzeptor) übertragen und somit ein Venus-Signal detektiert werden (**D**, **E**, adaptiert aus [229]) [226, 227, 229, 230] (Proteinabbildung modifiziert nach NADYA, 2016, <http://www.ciker.com/clipart-protein-strukture-.html>, CC0-Lizenz).

2.4.16.4 *Luminescence-based mammalian interactome (LUMIER) assay*

Um eine Protein-Protein-Interaktion quantitativ zu messen, wurde ein *luminescence-based mammalian interactome* (LUMIER) *assay* durchgeführt [232-236]. Es wurden zwei Proteine, deren Interaktion gemessen werden sollte, als Fusionsproteine mit hRluc und V5-6xHis ko-exprimiert. Das Protein mit der V5-6xHis-Markierung wurde über eine Affinitätsmatrix aufgereinigt. Wenn das hRluc-Fusionsprotein an das V5-6xHis-markierte Protein bindet und der Proteinkomplex isoliert wurde, konnte eine Lumineszenz nach der Affinitätsreinigung gemessen werden.

Die cDNA potentieller Interaktionspartner wurde jeweils in pEF-DEST51-V5/6xHis und pCR3.1-N-hRluc-DEST bzw. pCR3.1-C-hRluc-DEST kloniert. Die Fusionsproteine wurden in $0,2 \times 10^6$ COS-7-Zellen ko-exprimiert (jeweils 0,15 µg cDNA pro Elektroporation im 96-*well* Format, Abbildung 9, **A**). Nach 24 Stunden Proteinexpression wurden die Zellen mit 130 µl LUMIER-Lysepuffer lysiert und durch Zentrifugation (750 g, 15 min) wurde die post-nukleäre Fraktion gewonnen. 20 µl der Probe wurden mit 30 µl PBS verdünnt und die Lumineszenz wurde gemessen (Lumineszenz 1, **B**). Eine 96-*well* Platte (Protino 96 Ni-NTA) wurde als Matrix für die Komplexreinigung mit 500 µl Ni-NTA-Agarose (Protino Ni-NTA-Agarose) beladen und mit LUMIER-Lysepuffer äquilibriert. Um einen Fluss zu erzeugen, wurde zwischen jedem Schritt ein Vakuum von 0,8 bar für jeweils eine Minute angelegt. 100 µl der Probe wurden mit 550 µl NPI-10 in jeweils ein *well* gegeben und für 20 min schüttelnd (1.100 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer wurde mittels Vakuumapplikation entfernt und die Säulen dreimalig mit jeweils 500 µl NPI-20 gewaschen (Abbildung 9, **C** und **D**). Schließlich wurden die bindenden Proteine mit 100 µl NPI-250 eluiert und die Lumineszenz aus 50 µl des Eluates bestimmt (Lumineszenz 2, **E**). Die Mono-Expression des hRluc-Fusionsproteins diente als Kontrolle. Das Luziferase-Signal nach der Reinigung (Lumineszenz 2) ist proportional zum Signal im Lysat (Lumineszenz 1) und muss demnach in Relation zum Signal der Kontrolle gesetzt werden [236]. Die Lumineszenz wurde wie im Kapitel 2.4.16.3 beschrieben detektiert. Aus Lumineszenz 1 und Lumineszenz 2 wurde ein Quotient berechnet und der Quotient der Kontrolle subtrahiert (LUMIER-Wert):

$$LUMIER - Wert = \frac{Emission_{Lumineszenz\ 2}}{Emission_{Lumineszenz\ 1}} - \frac{Emission_{Kontrolle\ Lumineszenz\ 2}}{Emission_{Kontrolle\ Lumineszenz\ 1}}$$

Um zu testen, ob sich das Messsignal signifikant vom Hintergrund unterschied, wurde eine zweiseitige, ungepaarte t-Teststatistik für $H_0: \mu = 0$ (mit μ = Mittelwert unabhängig gemessener LUMIER-Werte) berechnet.

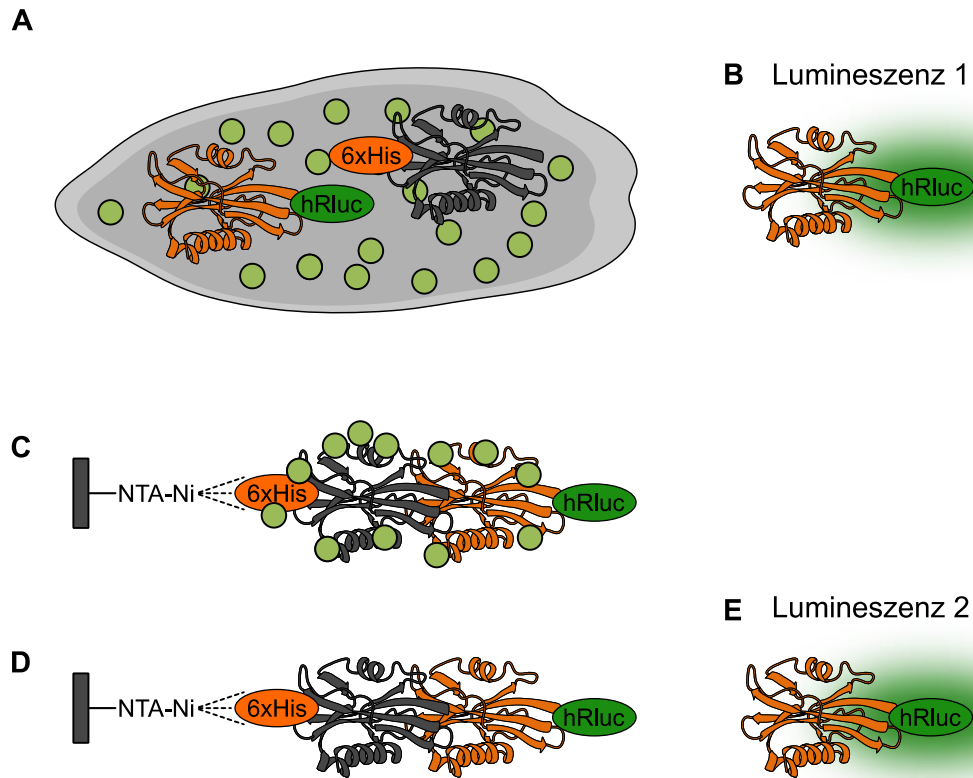


Abbildung 9: Prinzip des LUMIER assays. Zu testende Proteine wurden als Fusionsprotein mit hRluc und V5-6xHis-markiert eukaryot exprimiert (A). Nach der Lyse wurde die Lumineszenz 1 gemessen (B). Der Interaktionskomplex wurde mittels Ni-NTA-Matrix an eine Säule gebunden (C) und gereinigt (D). Im Eluat wurde die Lumineszenz 2 bestimmt (E). Als Kontrolle diente eine Mono-Expression des hRluc-Fusionsproteins (Hintergrund-Lumineszenz). Der Quotient aus Lumineszenz 1 und 2 und Subtraktion des Quotienten der Kontrolle quantifiziert die Protein-Protein-Interaktion (Proteinabbildung modifiziert nach NADYA, 2016, <http://www.clker.com/clipart-protein-strukture-.html>, CC0-Lizenz).

3 Ergebnisse

3.1 *Missense*-Mutationen führen zu einem reduzierten mitochondrialen Import der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase

3.1.1 Bestimmung der Prozessierung des Wildtyps und varianter GCDH

Um den Effekt pathogener *Missense*-Mutationen der GCDH auf den mitochondrialen Import zu untersuchen, wurden Wildtyp und Varianten der GCDH eukaryot exprimiert und die Proteinmenge sowie die Proteinprozessierung mittels Western Blot analysiert. Wildtyp-GCDH konnte als Doppelbande detektiert werden: *precursor* und matures Protein (pGCDH und mGCDH, Abbildung 10). Varianten der GCDH zeigten eine Erhöhung des Verhältnisses zwischen *precursor* und maturem Protein (p/m-Quotient). Des Weiteren war die Gesamtproteinmenge der Varianten, verglichen zum Wildtyp, vermindert. Die Lokalisation der Aminosäuresubstitutionen war über die gesamte Primärsequenz verteilt. Varianten der Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD), die (wie auch die GCDH) zu den Acyl-CoA-Dehydrogenasen zählt, zeigten ebenfalls eine Erhöhung des p/m-Quotienten. Eine Ausnahme war die MCAD-Variante L84F, die einen reduzierten p/m-Quotienten zeigte. Die Massendifferenz beider Banden der GCDH in der SDS-Gelelektrophorese war größer als jene der MCAD. Die *mitochondrial targeting sequence* (MTS) ist unter den nukleär codierten mitochondrialen Matrixproteinen nicht konserviert [48]. Die MTS der GCDH besteht aus 44 Aminosäuren, die MTS der MCAD aus 25 [99, 237], demnach waren die spezifischen Doppelbandenmuster kongruent respektive der in der Literatur vorbeschriebenen Längen der MTS. Die Ergebnisse zeigten, dass GCDH und MCAD variantenspezifisch vom jeweiligen *precursor* zu maturem Protein prozessiert wurden.

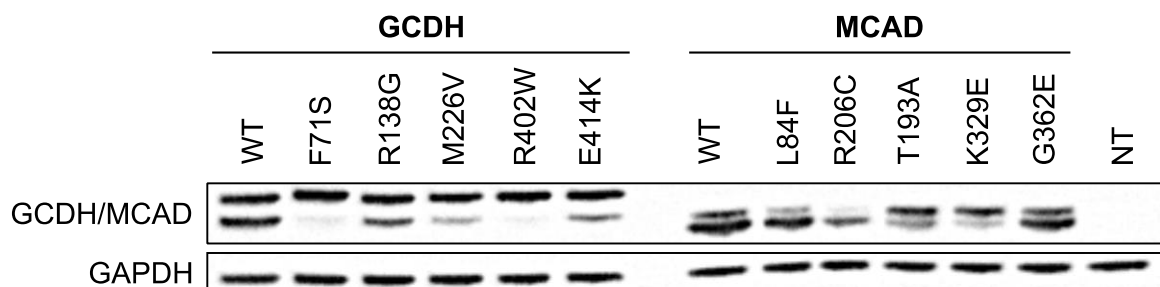


Abbildung 10: Western Blot zur Bestimmung der Proteinmenge von Wildtyp und varianter GCDH und MCAD. Gesamtzellfraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die immunoreaktive Proteinmenge im Western Blot detektiert. GCDH und MCAD wurden als *precursor* (obere Bande) und matures Protein (untere Bande) nachgewiesen. Das Verhältnis beider Reifungszustände, der p/m-Quotient, war variantenspezifisch (WT: Wildtyp, NT: nicht transfizierte Kontrolle).

GCDH und MCAD sind mitochondriale Matrixproteine. Um sicherzustellen, dass in der analysierten Gesamtzellfraktion, aus denen die Proteinmengen der GCDH und MCAD bestimmt wurden, die gesamte Menge des zu untersuchenden Proteins enthielt und nicht durch partielle Lyse der Zellen und Mitochondrien ein Artefakt vorlag, wurde die Effizienz der Zellyse überprüft. Nach Fraktionierung der Zellen konnte mittels Western Blot die Verteilung des mitochondrialen Matrixproteins Hsp60 im Pellet beziehungsweise dem löslichen Überstand bestimmt werden (Abbildung 11). Ohne Hinzugabe eines chemischen Detergenz zeigte sich nahezu die gesamte Hsp60-Menge in der Pelletfraktion. Durch Hinzugabe von steigenden Mengen an Digitonin, einem Detergenz, welches konzentrationsabhängig verschiedene biologische Membranen lysiert, nahm die relative Menge von Hsp60 in der löslichen Fraktion zu. Die Lyse mit 10 % Digitonin konnte Hsp60 nahezu vollständig in die lösliche Fraktion überführen. Verglichen hierzu war Hsp60 in einem Ansatz, bei dem Zellen mit 1 % (v/v) Triton X-100 lysiert wurden, ausschließlich in der löslichen Fraktion vorhanden. Dies zeigt, dass Triton X-100 die Zelle samt mitochondrialen Membranen vollständig lysierte. In allen Experimenten erfolgte die Zellyse, sofern nicht anders beschrieben, mittels 1 % (v/v) Triton X-100.

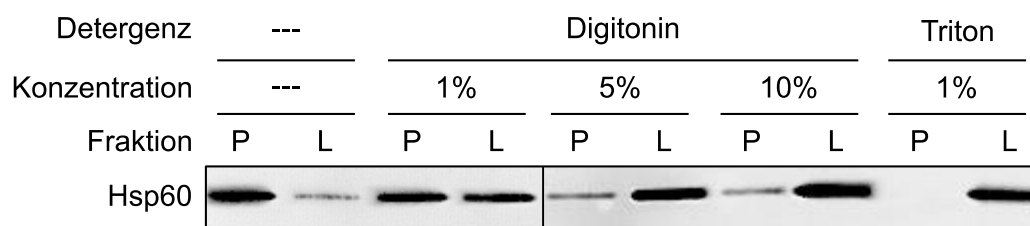


Abbildung 11: Lyse von Mitochondrien aus COS-7-Zellen mittels Digitonin und Triton X-100. COS-7-Zellen wurden mit angegebenen Konzentrationen (v/v) des entsprechenden Detergenz inkubiert und die Menge des Hsp60 in der Pelletfraktion (P) beziehungsweise im löslichen Überstand (L) bestimmt. Es zeigte sich eine vollständige Lyse der Zellen durch 1 % Triton X-100, da die gesamte Menge des Hsp60 in der löslichen Fraktion detektiert werden konnte.

In einem nächsten Schritt wurde die Expressionskapazität von COS-7-Zellen nach Transfektion einer proteinkodierenden cDNA überprüft. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen an Plasmid-cDNA transfiziert und die resultierende Proteinmenge im Dot Blot bestimmt. Eine Erhöhung der transfizierten GCDH-cDNA-Menge führte zu einer Erhöhung der immunoreaktiven Proteinmenge der GCDH im Dot Blot (Abbildung 12). Das Regressionsmodell konnte als Hyperbel ausgedrückt werden. Ab einer cDNA-Menge von 0,8 µg wurde eine Sättigung der Proteinexpression der GCDH erreicht. Zwischen einer relativen Proteinmenge von 0,05 – 0,6 lag eine lineare Korrelation von cDNA-Menge und Proteinmenge vor ($r = 0,92$; $r^2 = 0,86$; $p = 0,003$; $n = 2$). In diesem Bereich befand sich die für die in den folgenden Experimenten verwendete cDNA-Menge von 0,15 µg (gestrichelte Linie).

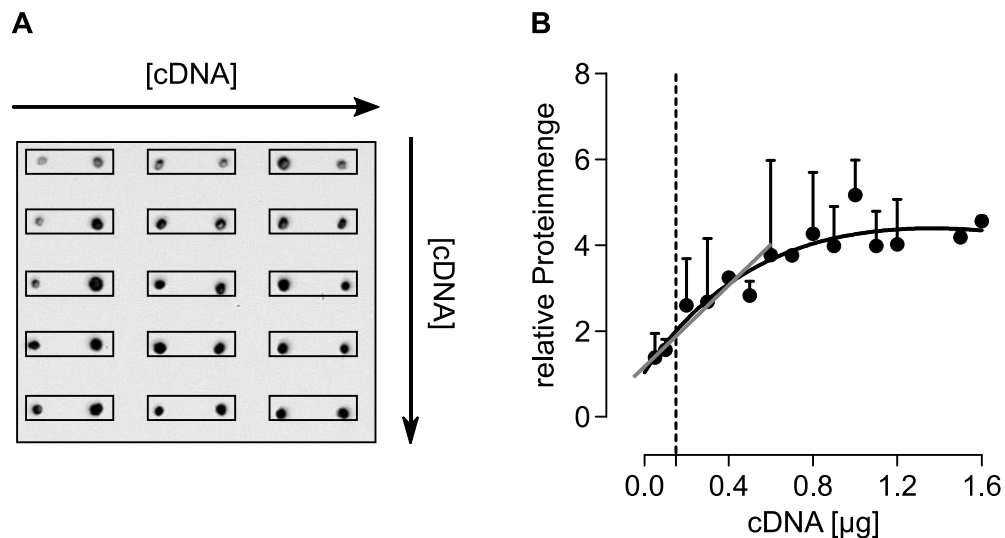


Abbildung 12: GCDH-Proteinmenge in Abhängigkeit der transfizierten cDNA-Menge. **A**, Gesamtproteinmenge der GCDH im Zelllysate nach Transfektion steigender Menge cDNA (Umrandung: Duplikate). **B**, Mit zunehmender cDNA-Menge stieg die Proteinmenge des GCDH Wildtyps an und erreichte ein Plateau. Es lag ein linearer Zusammenhang im Bereich zwischen einer relativen Proteinmenge von 0,05 und 0,6 vor (Mittelwerte \pm SEM; $r = 0,92$; $r^2 = 0,86$; $p = 0,003$; $n = 2$; gestrichelte Linie: cDNA-Menge von 0,15 μ g).

Um nicht nur die Gesamtproteinmenge zu evaluieren, sondern auch das Verhältnis zwischen pGCDH und mGCDH für verschiedene GCDH-Gesamtproteinmengen zu testen, wurde ein transfektionsbasierter *competition assay* durchgeführt. Hierbei diente Phenylalaninhydroxylase (PAH) als Kontrollprotein, das die Proteinmenge der GCDH beeinflussen sollte. Mit steigender PAH-cDNA-Menge nahm die Menge an immunoreaktiver PAH bis zu einer cDNA-Menge von 1,4 μ g zu (Abbildung 13). Gleichzeitig zeigte sich eine Abnahme der Gesamtproteinmenge der GCDH. mGCDH und pGCDH blieben über den angewandten PAH-Gradienten durchgehend nachweisbar. Auch bei höheren Mengen PAH zeigte sich eine Erhöhung des p/m-Quotienten für F71S-GCDH verglichen zum Wildtyp. Dies zeigte, dass der Effekt des variantenspezifischen p/m-Quotienten auch bei niedrigeren Proteinmengen zu beobachten war. Ein Artefakt durch Überexpression konnte somit ausgeschlossen werden.

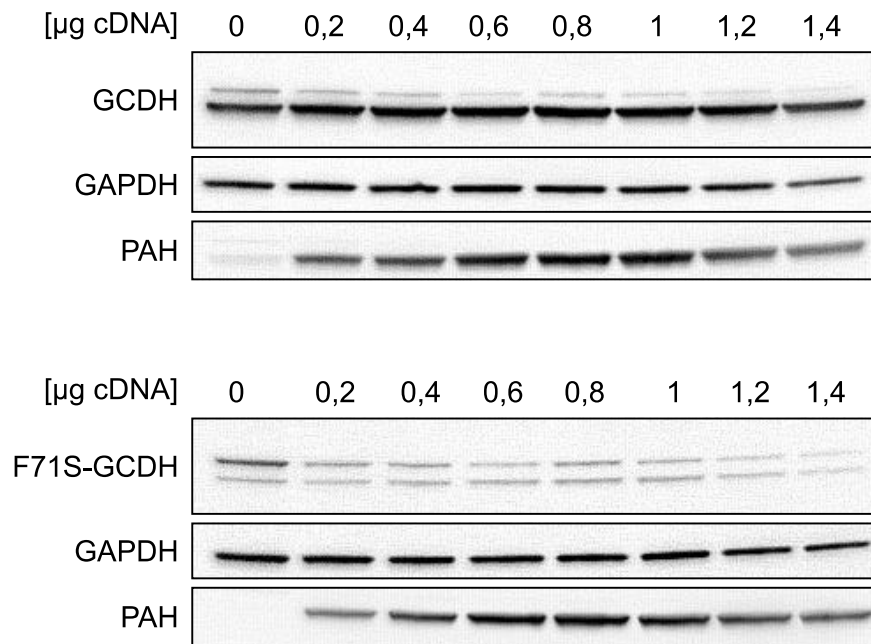


Abbildung 13: Transfektionsbasierter *competition assay* zur Bestimmung des p/m-Quotienten der GCDH-Proteinmenge abhängig vom Expressionsniveau. GCDH und Phenylalaninhydroxylase (PAH) wurden mit variablen Mengen der PAH-cDNA und konstanter GCDH-cDNA-Menge (0,15 µg) ko-transfiziert. Mit zunehmender PAH-cDNA-Menge nahm die PAH-Proteinmenge zu und die GCDH-Proteinmenge ab. Sowohl pGCDH als auch mGCDH waren über den PAH-cDNA-Gradienten (variantenspezifisch) nachweisbar.

3.1.2 Korrelation zwischen Gesamtproteinmenge, p/m-Quotient und Position des Aminosäureaustausches varianter GCDH

Im Folgenden wurde die Korrelation zwischen den Parametern Gesamtproteinmenge, p/m-Quotient und Position des Aminosäureaustausches der Mutationen innerhalb der Primärsequenz und Tertiärstruktur der GCDH untersucht. 25 Varianten der GCDH wurden eukaryot exprimiert und mittels Western Blot die Zelllysate analysiert. Die transfizierte cDNA kodierte für Mutationen, deren Aminosäuresubstitutionen sich über die Primärsequenz und Tertiärstruktur verteilten (vgl. Kapitel 2.2.9 und Abbildung 14).

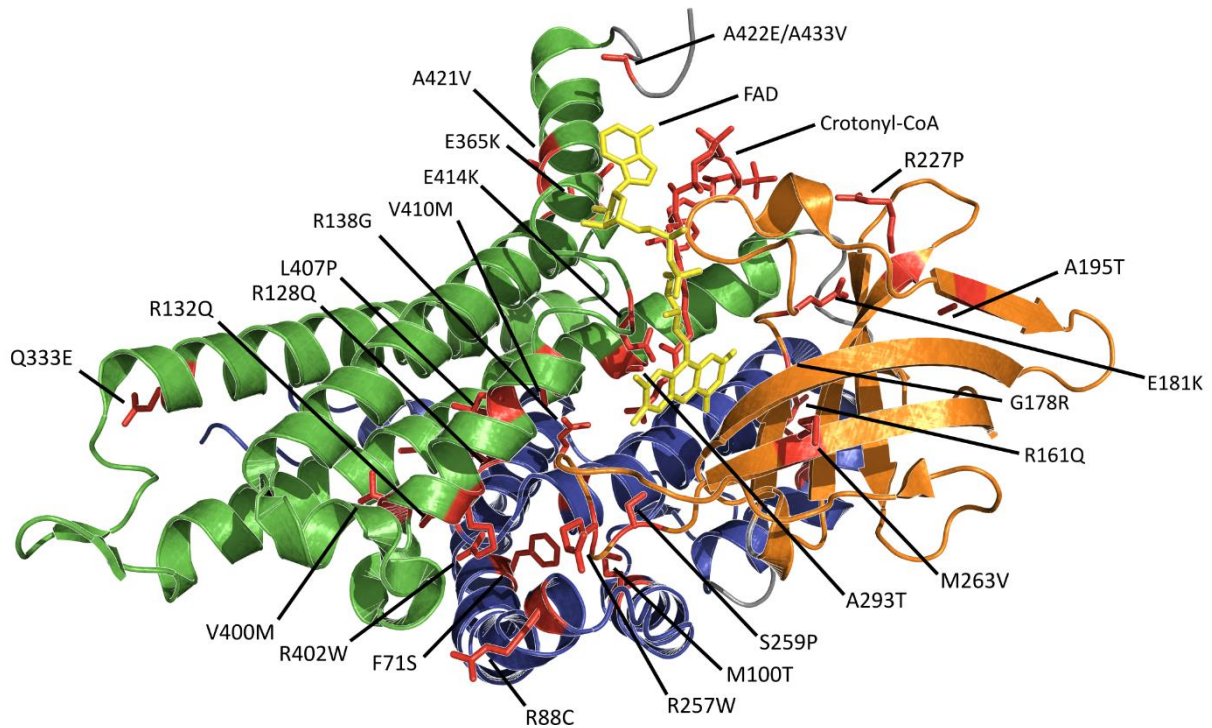


Abbildung 14: Lokalisation der GCDH-Mutationen in der Tertiärstruktur. GCDH-Mutationen sind in rot mit der jeweiligen Seitenkette der ausgetauschten Aminosäure dargestellt (blau: N-terminale α -Helix, orange: β -Faltblatt, grün: C-terminale α -Helix, FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid, gerendert nach PDB ID: 1SIQ).

Verglichen zum Wildtyp war die Gesamtproteinmenge varianter GCDH vermindert (Abbildung 15, **A** und **B**). Alle Varianten zeigten einen erhöhten p/m-Quotienten verglichen zum Wildtyp. Die Position der Aminosäuresubstitution in der Primärsequenz korrelierte nicht mit dem p/m-Quotienten ($\rho = -0,318$; $p = 0,100$ für H0: $\rho = 0$). Es zeigte sich eine schwache negative Korrelation zwischen der Aminosäureposition und der Gesamtproteinmenge ($\rho = -0,386$; $p = 0,043$; Abbildung 15, **B**). Es wurde des Weiteren untersucht, ob der (logarithmierte) p/m-Quotient mit der Lokalisation des Aminosäureaustausches in der Tertiärstruktur zusammenhängt. Alle analysierten Varianten wurden hinsichtlich ihres p/m-Quotienten farblich kodiert und die ausgetauschte Aminosäure in der Tertiärstruktur der GCDH markiert (Abbildung 16). Aminosäuresubstitutionen, die mit einem hohen p/m-Quotienten assoziiert waren (rot), befanden sich vorwiegend im Kern der Tertiärstruktur. M100T, R128Q, R132Q, E365K, R402W und L407P lagen trotz der Zugehörigkeit zu verschiedenen Domänen (N- und C-terminale α -Helix) in einem Radius von zirka 20 Å zueinander.

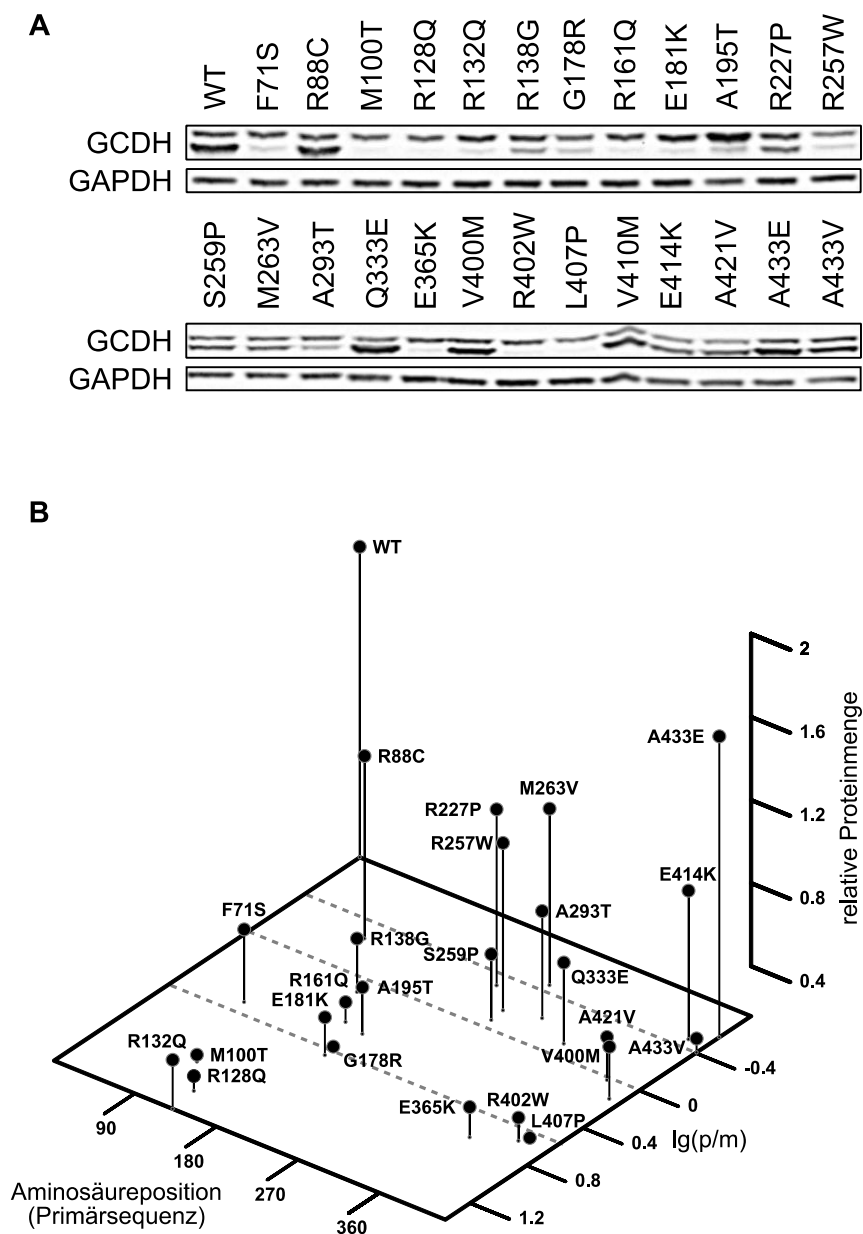


Abbildung 15: Expression varianter GCDH-Proteine. Expression von GCDH Wildtyp und Varianten und Bestimmung der Gesamtproteinmenge und p/m-Quotienten (A). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Gesamtproteinmenge, dem p/m-Quotienten und der Position des Aminosäureaustausches (B, Mittelwerte, $n = 3$).

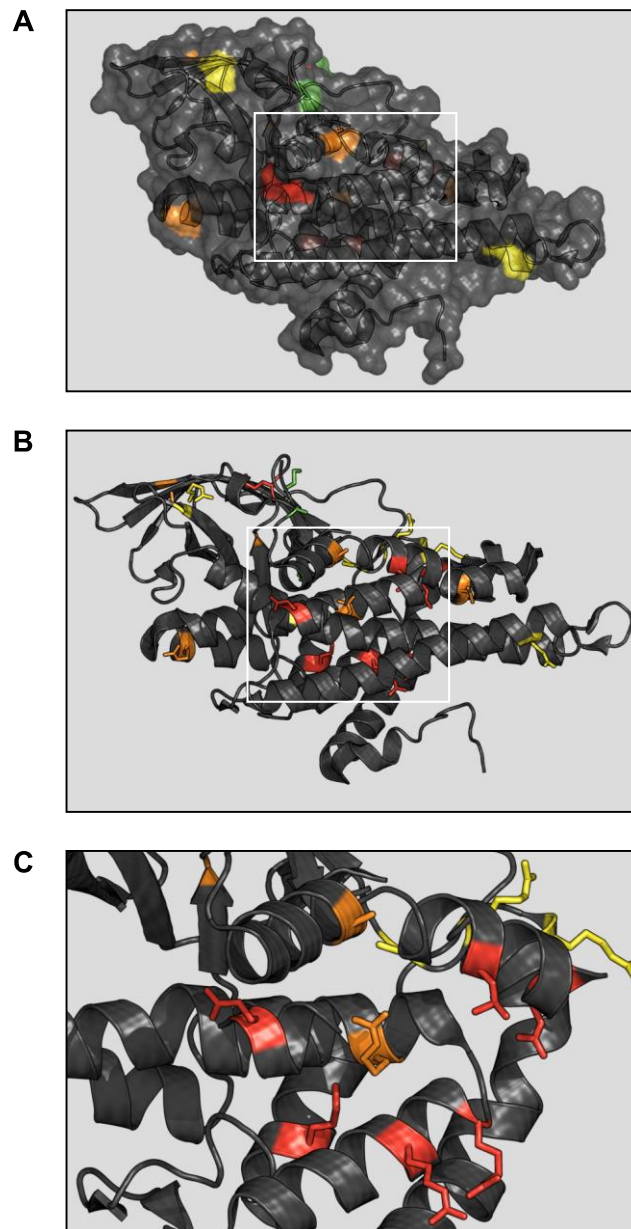


Abbildung 16: Lokalisation der Mutationen in der Tertiärstruktur der GCDH. Mutationen wurden anhand des p/m -Quotienten farblich kodiert in die Tertiärstruktur der GCDH eingefügt ($\lg\left(\frac{p}{m}\right) < -0,4$ in grün, $\lg\left(\frac{p}{m}\right) < 0$ in gelb, $0 < \lg\left(\frac{p}{m}\right) < 0,6$ in orange und $\lg\left(\frac{p}{m}\right) > 0,6$ in rot). Die Ausschnitte in **B** und **C** entsprechen den weißen Markierungen in **A** und **B**. Mutationen mit dem höchsten p/m -Quotienten (rot) befanden sich in räumlicher Nähe zueinander an der Grenze zwischen C- und N-terminaler α -helikalen Domäne (gerendert nach PDB ID: 1SIQ).

3.1.3 Bestimmung der subzellulären Lokalisation des *precursors* sowie maturer GCDH

Um die variantenspezifische Prozessierung der GCDH im Detail zu untersuchen, wurde im Folgenden die Lokalisation des *precursors* und der maturen GCDH mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. Mitochondrien wurden mittels MitoTracker rot gefärbt (Abbildung 17). Als Kontrolle diente Phenylalaninhydroxylase (PAH), die cytosolisch lokalisiert ist. Als Hintergrundkontrolle diente ein nicht transfizierter Ansatz (NT-Kontrolle)

sowie ein Ansatz mit GCDH-exprimierenden Zellen, jedoch ohne primären Antikörper (AK-Kontrolle). GCDH Wildtyp und alle untersuchten Varianten zeigten in der Superposition eine ausschließlich mitochondriale Lokalisation. PAH hingegen war cytosolisch lokalisiert. Des Weiteren zeigten sich bei Expression der Varianten R88C und A433E dysmorphe Mitochondrien.

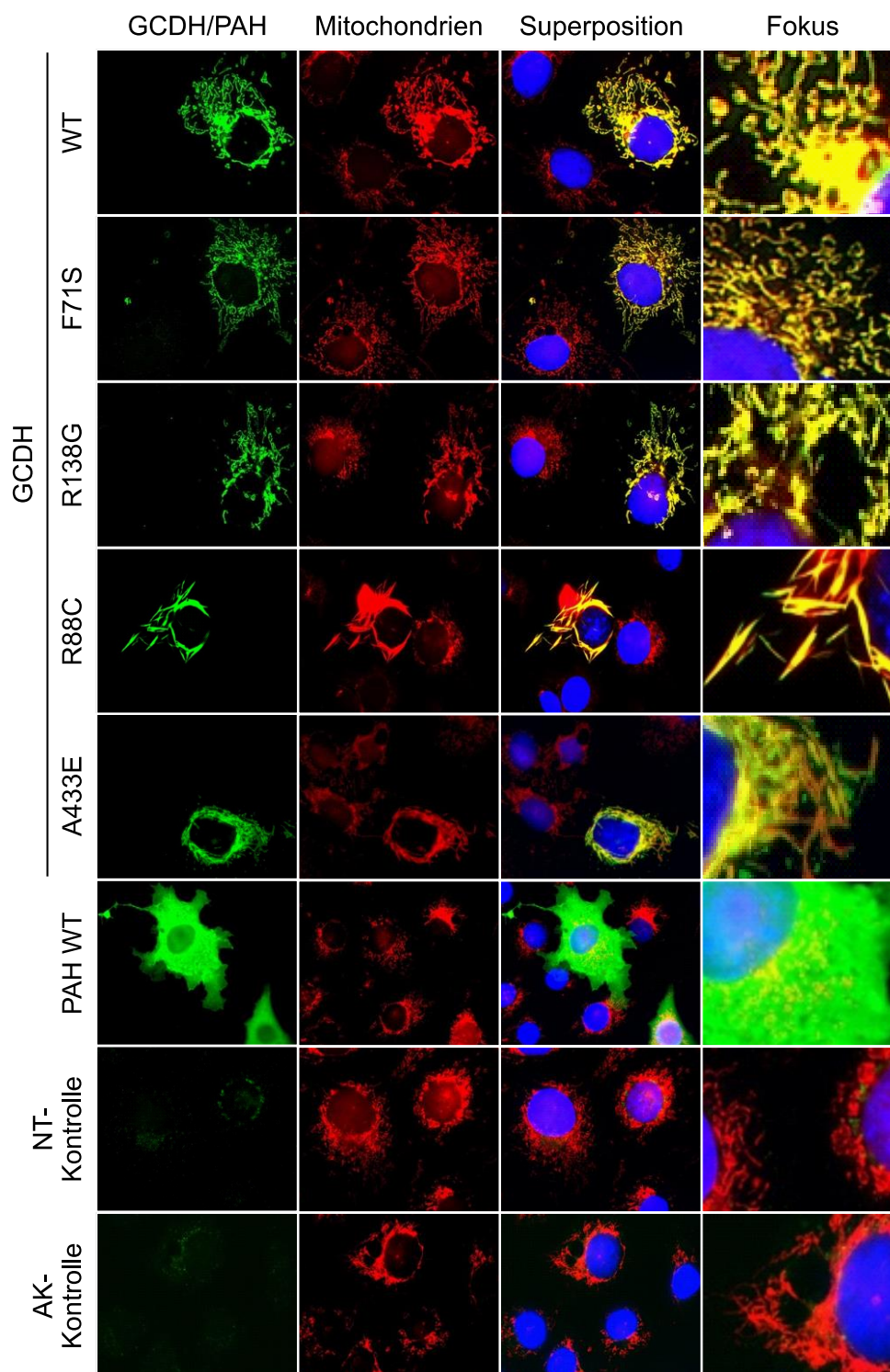


Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopie GCDH-exprimierender COS-7-Zellen. GCDH wurde mittels AlexaFluor488 fluoreszenzmarkiert (grün), Mitochondrien mittels MitoTracker (rot) und Nuclei mit DAPI (blau). In

der Superposition zeigte sich eine deutliche mitochondriale Lokalisation des Wildtyps und aller untersuchten Varianten. Wildtyp PAH diente als cytosolische Kontrolle. Bei Zellen, die die Variante R88C exprimierten, erschienen die Mitochondrien komplett, bei jenen, die A433E exprimierten, partiell dysmorph. In der nicht transfizierten Kontrolle (NT) sowie der Kontrolle ohne primären Antikörper (AK-Kontrolle) zeigte sich ein geringes Hintergrundsignal.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie konnte nicht zwischen den Reifungszuständen der GCDH diskriminieren. Um zu verifizieren, dass sowohl pGCDH als auch mGCDH mitochondrial lokalisiert sind, wurde eine zentrifugationsbasierte Fraktionsanalyse des Zelllysates durchgeführt. Die cytosolische und mitochondriale Zellfraktionen wurden mittels Western Blot auf deren Verteilung von *precursor* und murer GCDH sowie den Markerproteinen GAPDH (Cytosol) und Hsp60 (Mitochondrien) untersucht. Wildtyp und F71S pGCDH und mGCDH befanden sich nahezu exklusiv in der mitochondrialen Fraktion (M, Abbildung 18), wie auch Hsp60. Im Cytosol (C) zeigte sich nur wenig GCDH bei einer starken Anreicherung des Kontrollproteins GAPDH. Es lässt sich aus Ergebnissen der Immunfluoreszenzmikroskopie und Fraktionsanalyse folgern, dass pGCDH und mGCDH mitochondrial lokalisiert waren.



Abbildung 18: Fraktionierung GCDH-exprimierender COS-7-Zellen. Wildtyp und F71S pGCDH und mGCDH konnten stark angereichert in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden (C: cytosolische Fraktion, M: mitochondriale Fraktion). Hsp60 diente als mitochondriales, GAPDH als cytosolisches Kontrollprotein.

Im Folgenden wurde analysiert, ob sich pGCDH und mGCDH innerhalb oder außerhalb der äußeren Mitochondrienmembran befanden. Um diese Fragestellung zu eruieren, wurde ein *protection assay* durchgeführt. Nach Präparation einer cytosolischen und mitochondrialen Fraktion wurde die mitochondriale Fraktion mit Proteinase K inkubiert. Mit zunehmender Proteinase-K-Konzentration nahm die pGCDH-Menge ab (Abbildung 19). Die mGCDH-Menge blieb hingegen unverändert. Als Kontrolle diente der Nachweis von Hsp60, das in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Die Menge an Hsp60 war nicht abhängig von der Proteinase-K-Konzentration. Es zeigte sich kein Unterschied in der konzentrationsabhängigen Reduktion der pGCDH-Menge zwischen Wildtyp und F71S-GCDH. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem zuvor die Mitochondrienmembranen mit 1 % Triton X-100 permeabilisiert wurden (Abbildung 20). Bereits nach Inkubation für 1 min mit 50 µg/ml Proteinase K war mGCDH nicht mehr zu detektieren. Die Menge an pGCDH nahm sukzessive ab. Dies zeigt, dass der proteolytische Abbau von Proteinen abhängig von (intakten) Membranen ist. Es schließt die Stabilität der mGCDH als Artefakt aus. Es wird gefolgert, dass pGCDH an der

Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert war. mGCDH war nicht zugänglich für den proteolytischen Verdau. Dies ist ein Hinweis, dass sich mGCDH entweder im Intermembranraum oder in der mitochondrialen Matrix befindet.

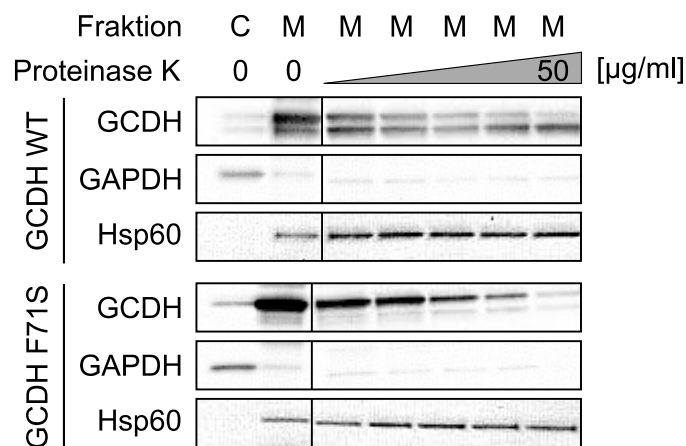


Abbildung 19: Protection assay (GCDH WT und F71S). Die mitochondriale Fraktion wurde mit Proteinase K in zunehmenden Konzentrationen versetzt (2,5 – 50 µg/ml). Es zeigte sich eine Reduktion der Menge an pGCDH und gleichbleibende GCDH- und Hsp60-Mengen mit Zunahme der Proteinase-K-Konzentration. Die Sensitivität gegenüber Proteinase K zeigt die Lokalisation der pGCDH an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran.

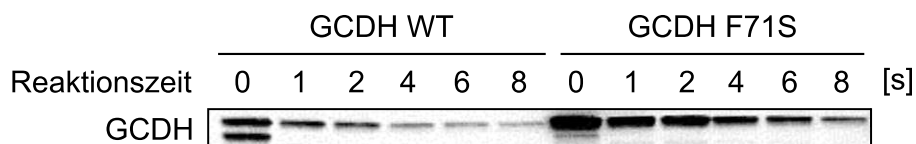


Abbildung 20: Protection assay mit permeabilisierten Membranen. Vor Inkubation mit Proteinase K (50 µg/ml) wurden die mitochondrialen Fraktionen GCDH Wildtyp- und F71S-exprimierender Zellen mit 1 % Triton X-100 (v/v) versetzt. Nach entsprechender Reaktionszeit wurde die Proteolyse mittels PMSF inhibiert. Bereits nach 1 min war mGCDH nicht mehr nachweisbar im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 min). Die Menge an pGCDH nahm mit zunehmender Reaktionszeit ab.

Im Folgenden wurde der Einfluss genetischer Variationen im muren Anteil der GCDH und MCAD auf die subzelluläre Lokalisation untersucht. Hierfür wurden die Lokalisationen des *precursors* und muren Proteins von vierzehn GCDH- und fünf MCAD-Varianten, die alle Genprodukt pathogener Mutationen sind, mittels Fraktionsanalyse und *protection assay* untersucht. Abbildung 21 zeigt die im Western Blot analysierten immunreaktiven Proteinmengen des Wildtyps und der Varianten für GCDH (A) und MCAD (B). Es wurden jeweils die cytosolische Fraktion (C) und die mitochondriale Fraktion (M) aufgetragen. Letztere wurde ohne (-) und mit (+) 50 µg/ml Proteinase K inkubiert. Diese Kondition sollte im Falle einer räumlichen Zugänglichkeit der Protease zum Protein das Protein nahezu vollständig verdauen (vgl. Abbildung 19). Die Hinzugabe von Proteinase K zeigte eine Verminderung der Menge des *precursors* bei nahezu gleichbleibender Menge des muren Proteins (für GCDH

und MCAD). Demzufolge sind auch variante *precursors* Der GCDH und MCAD an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert.

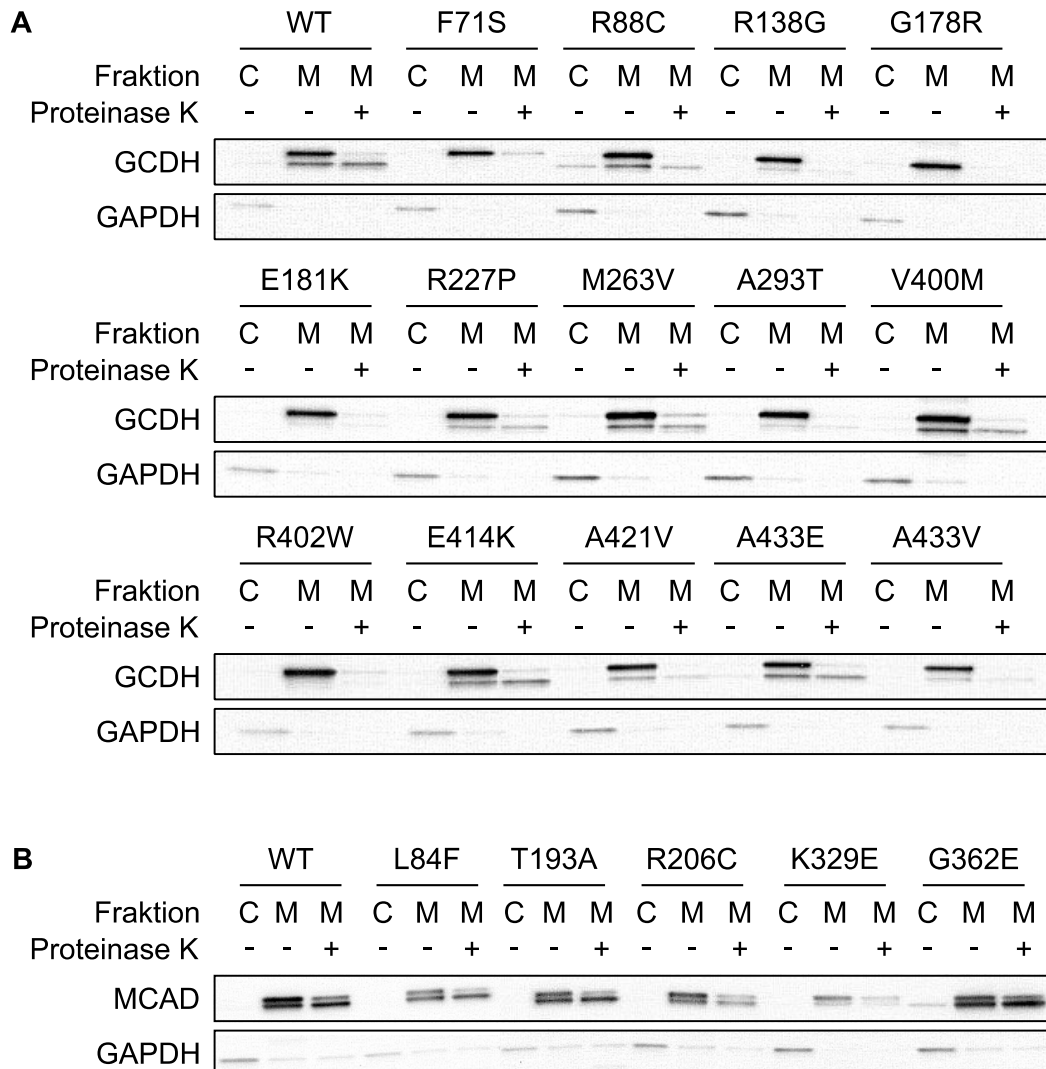


Abbildung 21: Protection assay (GCDH- und MCAD-Varianten). Mitochondriale Fraktionen GCDH- (A) und MCAD-exprimierender (B) *COS-7*-Zellen wurden mit 50 µg/ml Proteinase K inkubiert (+). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Proteinase K (-) zeigte sich eine Reduktion der Menge des *precursors*. In der cytosolischen Fraktion (C) konnte kein Protein nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass auch *precursors* varianter GCDH und MCAD an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind.

3.1.4 Bestimmung des Zusammenhangs von Expressionszeit und p/m-Quotient

Es wurde der Einfluss der Expressionszeit auf die Höhe des p/m-Quotienten analysiert. Hierzu wurden *COS-7*-Zellen mit GCDH-cDNA transfiziert und die pGCDH- und mGCDH-Mengen von Wildtyp und F71S zeitabhängig während der eukaryoten Expression bestimmt. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Expressionszeit die Gesamtmenge der GCDH zunahm (Abbildung 22). Verglichen zum Wildtyp zeigte sich eine verminderte Zunahme der

Proteinmenge der F71S-Variante. Die GAPDH-Mengen waren konstant, sodass der Effekt der Zunahme der GCDH-Menge auf eine vermehrte intrazelluläre Synthese und nicht auf eine verstärkte Zellproliferation zurückzuführen war.

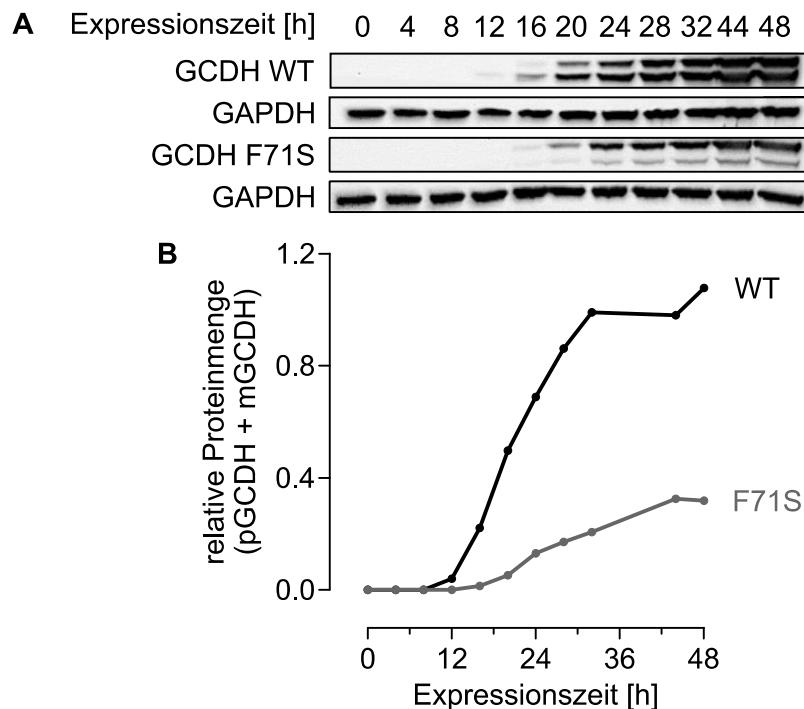


Abbildung 22: Expression der GCDH im Zeitverlauf. Nach Transfektion mit GCDH-cDNA wurden COS-7-Zellen nach entsprechender Expressionszeit lysiert und die Gesamtzellfraktion mittels Western Blot hinsichtlich der Proteinmenge analysiert (**A**). Nach Quantifikation des immunoreaktiven Proteins zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Proteinmenge und der Expressionszeit (**B**). Verglichen zum Wildtyp ist die Zunahme der Gesamtproteinmenge in Bezug auf die Expressionszeit bei F71S schwächer.

Es wurde getestet, ob die Zunahme der Gesamtproteinmenge eine simultane Zunahme der pGCDH- und mGCDH-Menge zugrunde liegt. Hierzu wurden Wildtyp und variante GCDH für 24 h und 48 h exprimiert und die pGCDH- sowie mGCDH-Mengen im Western Blot quantifiziert (Abbildung 23). Nach 24 h Expression zeigte sich keine signifikante Differenz in der pGCDH-Menge des Wildtyps und F71S. F71S mGCDH war hingegen gegenüber Wildtyp mGCDH nach 24 h Expression signifikant reduziert ($\Delta\mu = -1,014$, 95 % CI = [0,876;1,52] $p < 0,0001$; $n = 3$). Eine Zunahme der Expressionszeit auf 48 h zeigte keinen Effekt auf die relative Proteinmenge des Wildtyp pGCDH ($\Delta\mu = 0,007$; 95 % CI = [-0,376;0,133]; $p = 0,967$; $n = 3$) oder der mGCDH ($\Delta\mu = 0,105$; 95 % CI = [-0,283;0,073]; $p = 0,176$; $n = 3$). Sowohl die F71S pGCDH-Menge ($\Delta\mu = 0,470$; 95 % CI = [0,746;0,193]; $p = 0,0092$; $n = 3$) als auch die F71S mGCDH-Menge ($\Delta\mu = 0,290$; 95 % CI = [0,472;0,103]; $p = 0,012$; $n = 3$) waren im Vergleich zum Wildtyp nach 48 h erhöht. Es zeigte sich zudem, dass nach 48 h mehr F71S pGCDH als Wildtyp pGCDH vorhanden war ($\Delta\mu = 0,341$; 95 % CI = [0,658;0,024]; $p = 0,040$; $n = 3$). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine verlängerte Expressionszeit die Proteinmenge der F71S-GCDH erhöht. Dabei war die Zunahme der pGCDH-Menge größer

(47 %, relativ zur GCDH-Menge des Wildtyps) als die Zunahme der mGCDH-Menge (29 %). Wildtyp pGCDH zeigte keine Veränderung in der Menge der pGCDH.

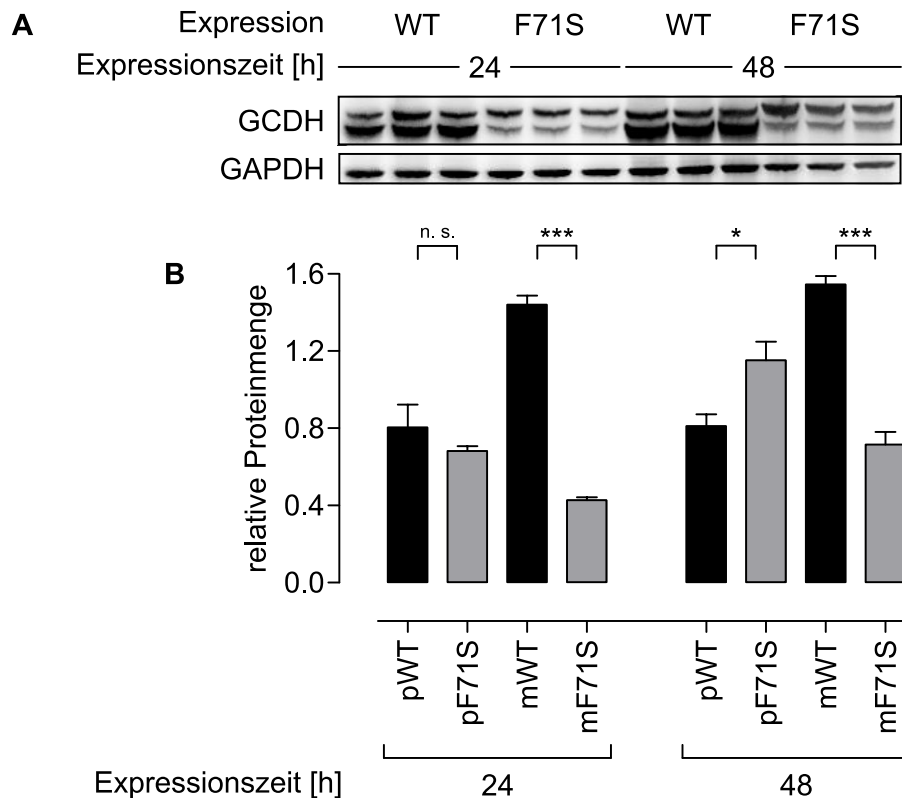


Abbildung 23: Akkumulation des precursors der GCDH. Wildtyp-GCDH und F71S wurden für 24 h und 48 h exprimiert und mittels Western Blot detektiert (A). Nach 48 h Expression zeigte sich gegenüber 24 h Expression eine signifikante Zunahme der Menge an varianter pGCDH bei einer verminderten der mGCDH-Menge der Variante (B, Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,01$ (*), $p < 0,0001$ (***), $n = 3$, n. s.: nicht signifikant).

3.1.5 Vergleich der Stabilität der pGCDH zwischen Wildtyp und Variante

Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob variante pGCDH eine reduzierte Proteinstabilität im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Hierzu wurde die Sensitivität der Proteine gegenüber proteolytischem Verdau durch Proteinase K getestet. Die Affinität varianter Proteine zu beschleunigtem Proteinase-K-Verdau ist ein Indikator für eine verminderte strukturelle Stabilität des Proteins [238]. Mitochondrien wurden aus Zellen, die GCDH exprimierten, isoliert und mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K 0 – 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde nach entsprechender Zeit mit 5 mM PMSF inhibiert und danach die pGCDH-Menge mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 24). Mit zunehmender Reaktionszeit nahmen die pGCDH-Mengen des Wildtyps und der Varianten F71S und R138G ab. Die Reduktion der mGCDH-Mengen war geringer. Die relative Abnahme der Proteinmengen der varianter pGCDH nach $t = 16$ min unterschied sich signifikant vom Wildtyp (Abbildung 24, pGCDH-Mengen angegeben als relative Proteinmengen zu $t = 0$; F71S: $\Delta\mu = 0,253$; 95 % CI = [0,006;0,500];

$p < 0,05$; $n = 3$; R138G: $\Delta\mu = 0,309$; 95 % CI = [0,062;0,556]; $p < 0,05$; $n = 3$). Zwischen F71S und R138G bestand kein signifikanter Unterschied in der pGCDH-Menge ($\Delta\mu = 0,056$; 95 % CI = [-0,191;0,303]; $p > 0,05$; $n = 3$). Demnach wird geschlossen, dass die Stabilität varianter pGCDH im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist.

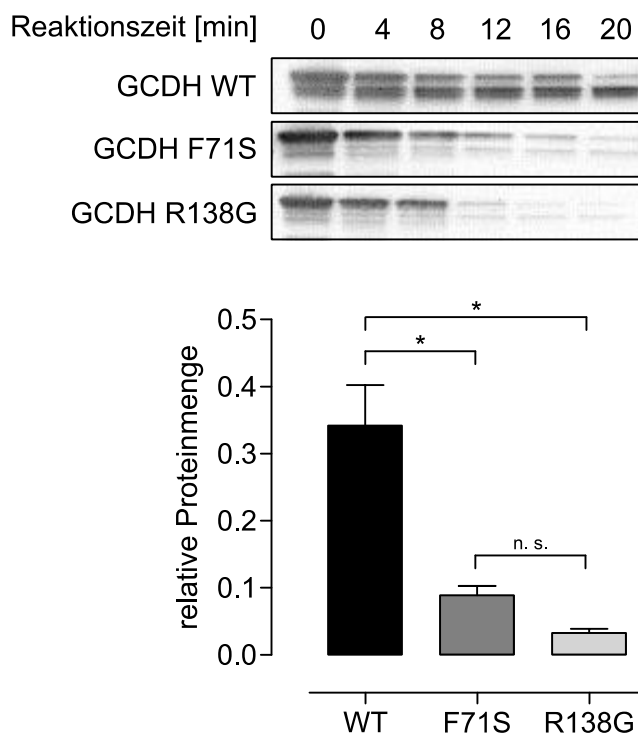


Abbildung 24: Zeitabhängige Proteinase-K-Proteolyse der pGCDH. Mitochondriale Fraktionen GCDH-exprimierender Zellen wurden mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K für angegebene Zeiten inkubiert, bevor eine Inhibition der Proteolyse mit PMSF erfolgte. Die Mengenbestimmung der Proteine erfolgte im Western Blot. Die graphische Darstellung der Proteinmenge (pGCDH) wurde für Werte bei $t = 16$ min angegeben. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der pGCDH-Menge der untersuchten Varianten verglichen zum Wildtyp (Mittelwerte \pm SEM; $p < 0,01$ (*); $n = 3$; n. s.: nicht signifikant).

3.1.6 Identifikation von Proteinen eines 90-kDa-Proteinkomplexes

Neben pGCDH und mGCDH konnte eine Bande der ungefähren Masse von 90 kDa im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 25). Es bestand eine Korrelation zwischen den Intensitäten der 90-kDa-Bande und der Intensität der Bande der mGCDH ($r = 0,98$; $r^2 = 0,97$; $p < 0,001$; $n = 1$), jedoch nicht mit der Intensität der Bande der pGCDH ($r = -0,25$; $r^2 = 0,06$; $p > 0,05$; $n = 1$). Die Zusammensetzung dieser Bande wurde massenspektrometrisch untersucht.

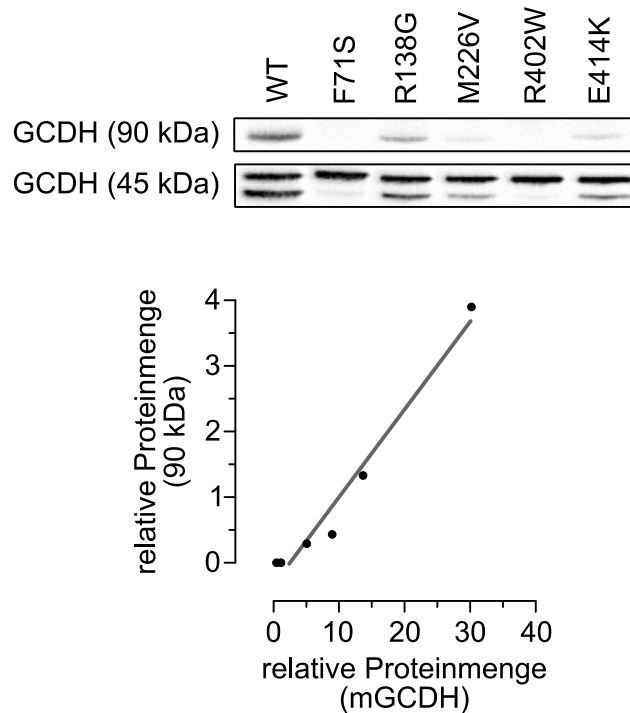


Abbildung 25: Identifikation der 90-kDa-Bande. GCDH Wildtyp und Varianten wurden eukaryot exprimiert. Eine Bande ungefähre Masse von 90 kDa konnte identifiziert werden. Die Menge des immunreaktiven Proteins auf der Höhe 90 kDa korrelierte mit der Menge an mGCDH (grau, $r = 0,98$; $r^2 = 0,97$; $p = 0,0004$; $n = 1$).

Um die Menge an Kontaminanten zu reduzieren, die auf gleicher Höhe in der Gelelektrophorese migrierten, wurde GCDH mittels Affinitätsaufreinigung angereichert. mGCDH und pGCDH konnten mittels Immunpräzipitation aus dem Gesamtzelllysat angereichert werden (Abbildung 26, **A**). In der Gesamtzellfraktion (PN, post-nukleär), die durch chemische Lyse GCDH-exprimierender *COS-7*-Zellen mittels Triton X-100 gewonnen wurde, konnten pGCDH und mGCDH für den Wildtyp nachgewiesen werden. F71S konnte lediglich als pGCDH detektiert werden. Nach dreimaligem Waschen der Säule, konnte GCDH angereichert und schließlich eluiert werden (E). mGCDH konnte im Eluat der F71S-Variante nachgewiesen werden, jedoch in geringerer Menge verglichen zum Wildtyp. F71S-pGCDH war im Vergleich zum Wildtyp angereichert. In der nicht transfizierten Kontrolle (NT) wurde kein Protein nachgewiesen. Neben den Banden, deren Migration mit der Masse der GCDH übereinstimmen, konnte darüber hinaus in der Immunopräzipitation eine Bande mit einer Masse von zirka 90 kDa beim Wildtyp in der post-nukleären Fraktion und im Eluat nachgewiesen werden. Um die Zusammensetzung dieser Bande zu untersuchen, wurden je ein Gelfragment der Wildtyp-Probe und der Kontrolle extrahiert und für die massenspektrometrische Analyse präpariert. Abbildung 26, **B** zeigt die exakte Lage der Bande relativ zum Marker auf einer mit Chemilumineszenz-Substrat inkubierten Nitrozellulosemembran. Eine Silberfärbung des Polyacrylamidgels zeigte zwar pGCDH und mGCDH (weiße Pfeile) in der GCDH-Probe (Abbildung 26, **C**), die 90-kDa-Bande war hier jedoch nur schwach sichtbar. Fragmente auf Höhe der vermuteten Position der 90-kDa-Bande (verglichen mit Western Blot und Nitrozellulosemembran) wurden für beide Ansätze

ausgeschnitten (Abbildung 26, **C**, rechte Seite). Es folgte ein tryptischer Verdau der Proteine im Polyacrylamidgel und anschließend die massenspektrometrische Analyse der Peptide.

Insgesamt konnten 138 Proteine identifiziert werden. Um einen Hinweis auf die Zusammensetzung der 90-kDa-Bande zu erlangen, wurde nach Proteinen gesucht, die in der Wildtyp-Probe angereichert waren, sich jedoch nicht in der Kontrollprobe fanden. Mit diesen Prämissen konnten zwei Proteine identifiziert werden: *Ubiquitin-60S ribosomal protein L40* und GCDH. Zusammenfassend bleiben zwei Hypothesen: Die GCDH liegt komplexiert im Homodimer vor (dies entspräche der Masse von zirka 90 kDa unter Berücksichtigung der Masse des Monomers). Es ist jedoch unklar, warum trotz denaturierenden Milieus im SDS-PAGE die GCDH nicht dissoziiert. Zweitens könnte die GCDH ubiquitiniert vorliegen. Eine Identifikation ubiquitinerter mitochondrialer Proteine mittels Massenspektrometrie ist vorbeschrieben [239]. Grundlage hierfür ist das Zusammenspiel von mitochondrialem und cytosolischem Proteinabbau [240]. Anhand einer Masse des Ubiquitins von 8,5 kDa ist eine Polyubiquitinierung als Erklärung für die Migration der GCDH auf der beobachteten Höhe möglich. Auch wenn die Identität dieser Bande nicht abschließend bestimmt werden konnte, so lässt die Korrelation mit der Menge an maturer GCDH auf eine intramitochondriale Genese schließen.

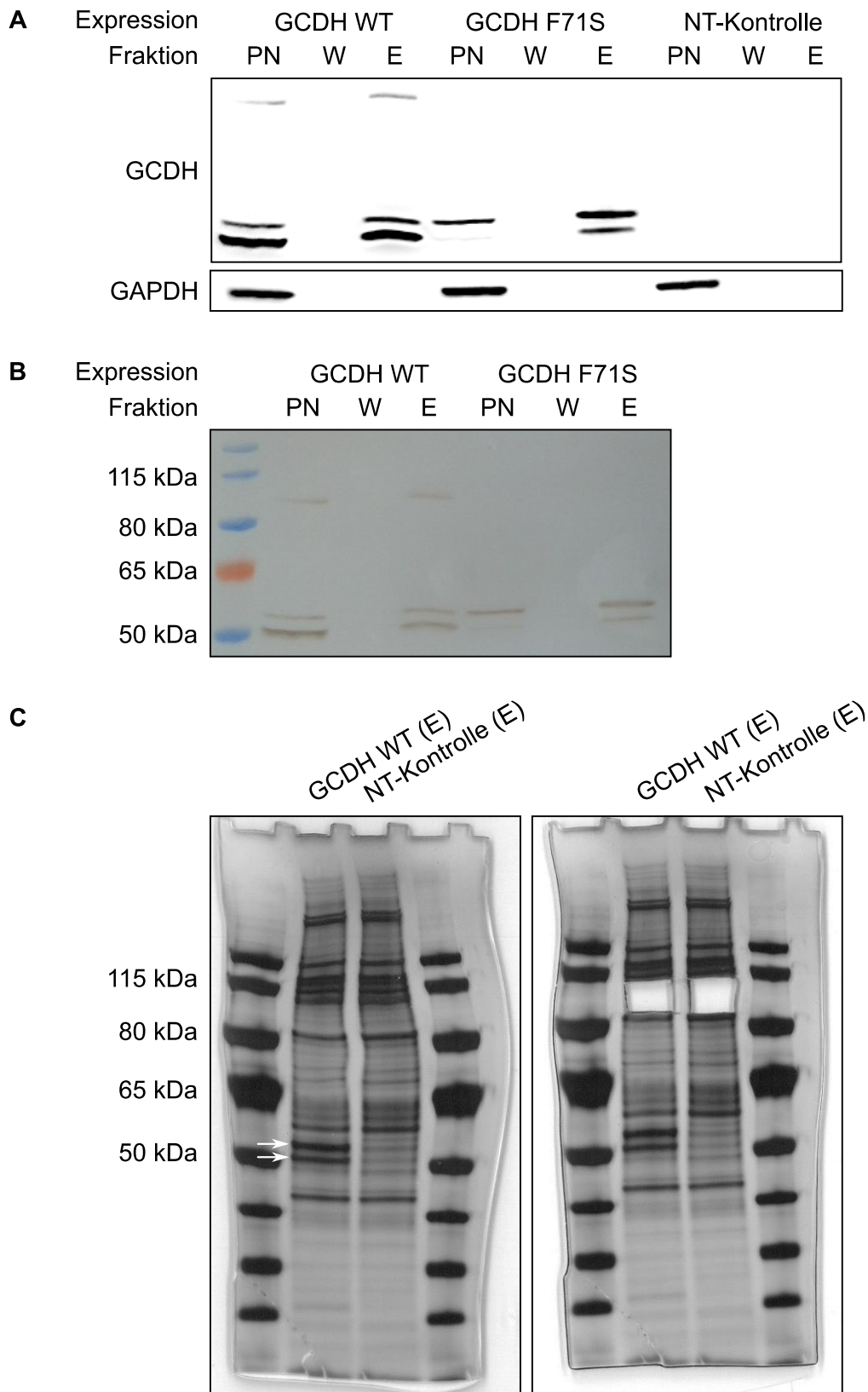


Abbildung 26: Immunopräzipitation der GCDH. Wildtyp und F71S-GCDH konnten mittels Affinitätsaufreinigung aufgereinigt und im Western Blot der einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden (A, PN: post-nukleäre Fraktion, W: Waschfraktion, E: Elution). Eine Proteinbande der Masse 90 kDa konnte in der Wildtyp-Probe, jedoch nicht bei der F71S-Variante detektiert werden. Um die exakte Lage dieser Bande zu identifizieren, wurde die Membran mit ECL überbelichtet und fotografiert (B). In der Silberfärbung des entsprechenden SDS-Gels zeigte sich die charakteristische Verteilung von pGCDH und mGCDH (Pfeile), die in der NT-Kontrolle nicht nachgewiesen werden

konnten. Eine für den Wildtyp spezifische Bande zwischen dem 80 kDa- und 115 kDa-Marker konnte hier nicht identifiziert werden. Es wurden respektive der Lage dieser Bande in (B) zwei Gelfragmente extrahiert und massenspektrometrisch analysiert (C).

3.2 Die Bindung der GCDH an die äußere Mitochondrienmembran ist unabhängig von der *mitochondrial targeting sequence*

3.2.1 Bestimmung der subzellulären Lokalisation MTS-deletierter GCDH-Varianten

Die untersuchten pathogenen Mutationen der GCDH befinden sich ausschließlich in der Sequenz des maturen Proteins. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss der mature Anteil der GCDH auf die Lokalisation varianter Proteine zeigt. Hierzu wurde die Lokalisation der MTS-deletierten Variante der GCDH ($GCDH_{\Delta MTS}$) im Vergleich zum Wildtyp ($GCDH_{MTS}$) in der cytosolischen und mitochondrialen Fraktion bestimmt. Abbildung 27 zeigt die Proteinmengen von Wildtyp und F71S in den entsprechenden Fraktionen. Als Markerproteine wurden Hsp60 (Mitochondrien) sowie GAPDH (Cytosol) nachgewiesen. Wildtyp-GCDH_{MTS} wurde als pGCDH und mGCDH detektiert. F71S-GCDH_{MTS} zeigte eine geringe Menge des maturen Proteins bei zum Wildtyp vergleichbaren Mengen des *precursors*. Sowohl pGCDH als auch mGCDH des Wildtyps und der Variante F71S wurden in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen. Wildtyp und F71S-GCDH _{Δ MTS} zeigten ausschließlich jeweils eine Bande auf Höhe der mGCDH. Es konnte gezeigt werden, dass MTS-deletierte Varianten vollständig in der mitochondrialen Fraktion lokalisiert waren. Folglich war die mitochondriale Lokalisation der GCDH unabhängig von der MTS.

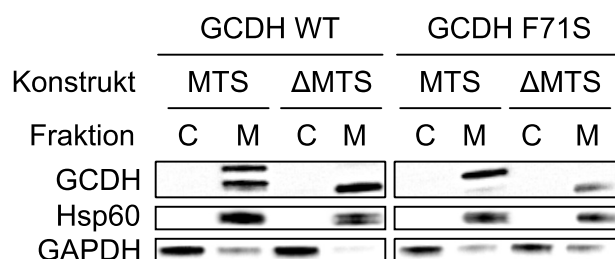


Abbildung 27: Bestimmung der Lokalisation der $GCDH_{\Delta MTS}$. Expression von Wildtyp und varianter $GCDH_{MTS}$ und MTS-deletierter GCDH ($GCDH_{\Delta MTS}$) und Auftrennung in cytosolische (C) und mitochondriale (M) Fraktion. Sowohl Wildtyp als auch variante GCDH zeigten eine vollständige mitochondriale Lokalisation aller Reifungszustände, unabhängig von der MTS.

Um auszuschließen, dass es sich bei der in der mitochondrialen Fraktion befindlichen GCDH um aggregierte Proteinpräzipitate handelte, die in der Zentrifugation gemeinsam mit den Mitochondrien angereichert wurden, wurden Mitochondrien aus GCDH-exprimierenden COS-7-Zellen mittels Mikrokügelchen, an die ein anti-Tom22-Antikörper gekoppelt war, aufgereinigt. Im post-nukleären Zelllysat waren geringe Mengen GCDH nachweisbar

(Abbildung 28). GAPDH und Hsp60 dienten als cytosolische bzw. mitochondriale Kontrollproteine. GAPDH war in den post-nukleären Fraktionen nachweisbar. Nach dem Durchfließen der Probe und zweimaligem Waschen der Säule konnte kein GCDH-Protein mehr nachgewiesen werden. In der Elution zeigte sich eine Doppelbande im Ansatz der GCDH_{ΔMTS} und eine Band im Ansatz mit GCDH_{MTS}. GAPDH konnte nicht mehr nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine Anreicherung des Hsp60. Dies zeigt, dass sowohl GCDH_{MTS} als auch GCDH_{ΔMTS} mitochondrial lokalisiert sind.

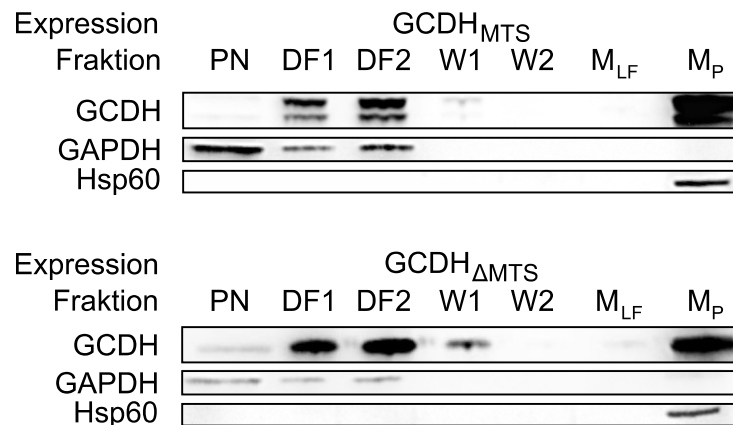


Abbildung 28: Mitochondrienaufräumung mit Mikrokügelchen mit anti-Tom22-Antikörpern. Nach Proteinexpression und Lyse wurde die post-nukleäre Gesamtzellfraktion (PN) mit Mikrokügelchen mit anti-Tom22-Antikörper inkubiert und die Mitochondrien über eine Säule aufgereinigt. GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} waren in der mitochondrialen Fraktion angereichert (DF: Durchflussfraktion, W: Waschfraktion, M_{LF} und M_P: lösliche und Pelletfraktion der Mitochondrienpräzipitation).

Im Folgenden wurde getestet, ob GCDH_{ΔMTS} außerhalb oder innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert war. Es wurde, wie vorausgehend beschrieben, ein *protection assay* durchgeführt. Abbildung 29 zeigt die Proteinmengen von Wildtyp- und F71S-GCDH_{ΔMTS} und des Markerproteins der mitochondrialen Matrix Hsp60 (Kontrolle). Eine Zunahme der Proteinase-K-Konzentration führte zu einer Abnahme der Proteinmenge der GCDH_{ΔMTS}. Die Sensitivität gegenüber Proteinase K zeigt, dass GCDH_{ΔMTS}, wie auch GCDH_{MTS}, an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert war.

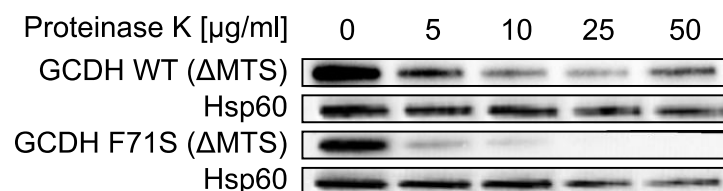


Abbildung 29: Protection assay des Wildtyps und varianter GCDH_{ΔMTS}. Mitochondriale Fraktionen GCDH_{ΔMTS}-exprimierender COS-7-Zellen wurden unterschiedlichen Konzentrationen Proteinase K ausgesetzt. Es zeigte sich eine Reduktion der GCDH-Menge in Abhängigkeit der Proteinase-K-Konzentration. Demzufolge war GCDH_{ΔMTS} an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert.

3.2.2 Analyse der Bindung nukleär kodierter mitochondrialer Proteine an Mitochondrien *in vitro*

Im Folgenden wurde überprüft, ob GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} posttranslational an die äußere Mitochondrienmembran binden können. Wildtyp und F71S-GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} wurden im zellfreien Retikulozytenlysat exprimiert und anschließend mit gereinigten Hefemitochondrien aus *S. cerevisiae* inkubiert. Die Mitochondrien wurden erneut aufgereinigt und mit dem Überstand hinsichtlich der GCDH-Menge analysiert. Abbildung 30 zeigt die Proteinmengen der GCDH, PAH und Hsp60 in den Fraktionen mit und ohne Mitochondrien. In der Gesamtfraktion konnten alle Proteine, die zellfrei synthetisiert wurden, sowie das Kontrollprotein Hsp60 detektiert werden. Nach Inkubation mit Mitochondrien und Fraktionierung der Probe wurden GCDH und GCDH_{ΔMTS} vermehrt in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen. Das cytosolische Kontrollprotein PAH wurde im löslichen Überstand detektiert, nicht jedoch in der mitochondrialen Fraktion. In der Kontrolle ohne Mitochondrien war im Vergleich zur löslichen Fraktion weniger GCDH im Pellet nachweisbar. Hierbei handelt es sich vermutlich um nicht lösliches, präzipitiertes Protein.

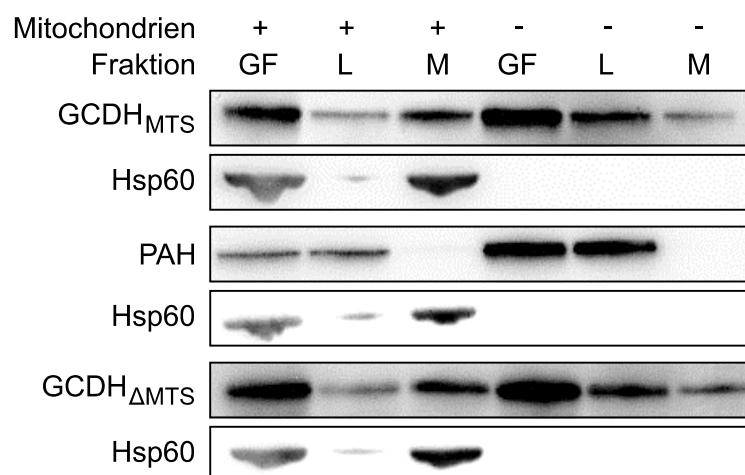


Abbildung 30: Posttranslationale Bindung der Wildtyp-GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} an Mitochondrien. *In vitro* synthetisierte Proteine wurden mit isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* inkubiert (GF: Gesamtfraktion, +: Mitochondrien wurden dem Ansatz zugegeben, -: Im Ansatz fehlten Mitochondrien). Mitochondrien wurden erneut gereinigt. Wildtyp-GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} konnten in der mitochondrialen Fraktion (M) nachgewiesen werden. PAH war ausschließlich in der löslichen Fraktion (L) lokalisiert.

Es wurde überprüft, ob auch F71S-GCDH_{MTS} und F71S-GCDH_{ΔMTS} *in vitro* an Mitochondrien binden konnten (Abbildung 31). Verglichen zum Ansatz ohne Mitochondrien zeigte sich auch hier, wie auch für den Wildtyp, eine Anreicherung der F71S-GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} in der mitochondrialen Fraktion nach Inkubation der Proteine mit Mitochondrien und erneuter Reinigung.

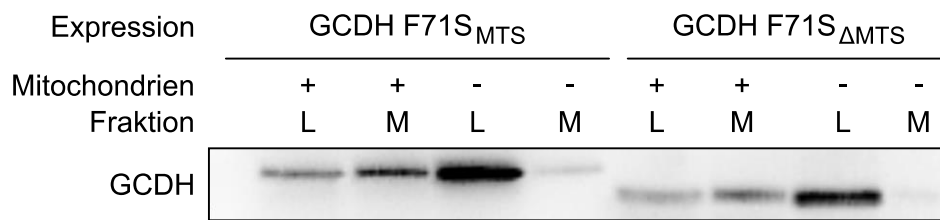


Abbildung 31: Posttranslationale Bindung der F71S-GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} an Mitochondrien. Nach Inkubation und erneuter Mitochondrienreinigung zeigte sich eine Anreicherung der F71S-GCDH_{MTS} und GCDH_{ΔMTS} in der mitochondrialen Fraktion (L: lösliche Fraktion, M: Mitochondrienfraktion).

Es wurde getestet, ob auch andere nukleär-kodierte mitochondriale Matrixproteine ohne MTS an Mitochondrien *in vitro* binden können. Ornithin-Transcarbamoylase (OTC) und die alpha-Untereinheit der 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase (BCKDHA) wurden *in vitro* synthetisiert und mit Mitochondrien inkubiert. Alle vier untersuchten Proteine (OTC und BCKDHA, jeweils mit und ohne MTS) konnten (im Vergleich zum Ansatz ohne Mitochondrien) nach erneutem Reinigen der Mitochondrien in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 32).

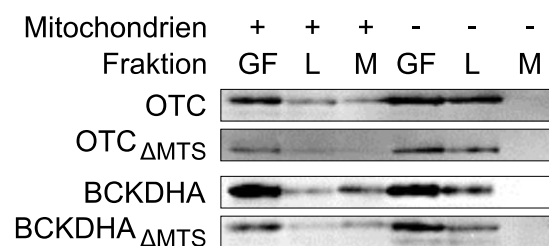


Abbildung 32: Posttranslationale Bindung der OTC_{MTS}, OTC_{ΔMTS} sowie BCKDHA_{MTS} und BCKDHA_{ΔMTS} an Mitochondrien. Nach Inkubation der Proteine mit Mitochondrien (GF: Gesamtfraktion) wurden die Mitochondrien erneut gereinigt und die Proteine konnten (im Vergleich zur Kontrolle ohne Mitochondrien) mitochondrialen (M) Fraktion nachgewiesen werden (L: lösliche Fraktion).

Es wird gefolgert, dass Strukturen innerhalb des muren Anteils nukleär kodierter mitochondrialer Proteine eine Bindung an die Mitochondrien vermitteln können. Es zeigte sich zudem, dass diese Eigenschaft spezifisch für mitochondriale Proteine ist, da das cytosolische Kontrollprotein PAH nicht mit Mitochondrien präzipitiert werden konnte.

3.3 Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern der mGCDH

Vorausgehend konnte gezeigt werden, dass GCDH variantenspezifisch prozessiert wird und pGCDH einiger Varianten vermehrt an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Die zugrundeliegenden Mutationen dieser Varianten liegen alle im Genabschnitt, der für den muren Anteil der Proteine kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass der mure Anteil nukleär kodierter mitochondrialer Proteine die Bindung an

Mitochondrien vermitteln können. Es wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass die veränderte Bindung varianter GCDH mit cytosolischen molekularen Chaperonen die Proteintranslokation ins Mitochondrium beeinflusst.

Zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen der GCDH wurde in einem ersten hypothesenfreien Ansatz Interaktionspartner der GCDH durch eine Affinitätsaufreinigung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der bindenden Proteine (*affinity purification coupled mass spectrometry*, AP-MS/MS) identifiziert [184, 218]. In einem zweiten Schritt wurde eine Auswahl der mittels AP-MS/MS identifizierten Proteine durch Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) hinsichtlich deren Interaktion mit GCDH überprüft. In diesem Schritt wurde zudem das Spektrum der möglichen Interaktoren hypothesenbasiert erweitert [230]. Zudem sollten weitere nukleär kodierte mitochondriale Proteine hinsichtlich ihrer Protein-Protein-Interaktionen zu cytosolischen molekularen Chaperonen getestet werden. In einem letzten Schritt wurde der Einfluss genetischer Variationen der GCDH auf die Protein-Protein-Interaktion zwischen GCDH und den charakterisierten Protein-Protein-Interaktionspartnern quantitativ mittels *luminescence-based mammalian interactome (LUMIER) assay* untersucht [241].

3.3.1 Hypothesenfreie Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern der mGCDH mittels *affinity purification coupled mass spectrometry* (AP-MS/MS)

Mittels *affinity-purification coupled mass spectrometry* (AP-MS/MS) wurden Protein-Protein-Interaktionspartner der Wildtyp-MBP-GCDH_{ΔMTS} und R138G-MBP-GCDH_{ΔMTS} identifiziert. Rekombinante MBP-GCDH_{ΔMTS} wurde mit isotopenmarkierten Lysaten (SILAC) inkubiert und anschließend aufgereinigt. Wildtyp-MBP-GCDH_{ΔMTS} wurde dabei mit Proteinen mit leichten Isotopen inkubiert, R138G-MBP-GCDH_{ΔMTS} mit schweren (Kombination 1). In einem Replikat wurde die Isotopenmarkierung vertauscht (Kombination 2). Nach tryptischem Verdau der auf der Säule präzipitierten Proteine wurden die Peptide massenspektrometrisch analysiert. Insgesamt konnten 443 Proteine identifiziert werden. Für jedes Protein wurde ein SILAC-Wert berechnet, indem die relativen Mengen der leichten Peptide durch die relativen Mengen der schweren Peptide dividiert wurden. Bindet ein Protein verglichen zur Negativkontrolle verstärkt an MBP-GCDH_{ΔMTS}, so ist dies durch einen SILAC-Wert > 1 gekennzeichnet. Die Anzahl der identifizierten Proteine hing von dem SILAC-Wert ab (Abbildung 33, dargestellt für Wildtyp-MBP-GCDH_{ΔMTS}).

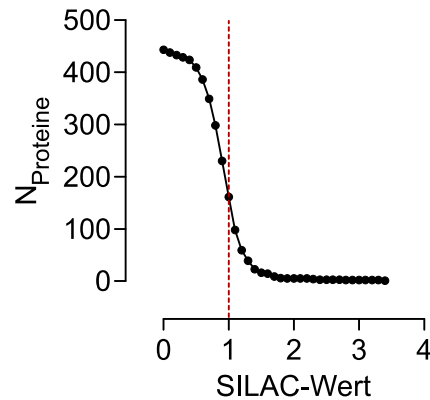


Abbildung 33: Zusammenhang zwischen Anzahl der identifizierten Proteine und SILAC-Wert. 216 Proteine mit einem SILAC-Wert > 1 waren in der Probe mit Wild-Typ MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS angereichert (rote Linie). Mit Zunahme des SILAC-Wertes nahm die Anzahl der identifizierten Proteine ab.

Unter der Prämisse SILAC-Wert ≥ 1 in beiden Replikaten (Kombination 1 und 2) konnten 216 Proteine mit Wildtyp-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS und 203 mit R138G-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS präzipitiert werden (Abbildung 34, **A**, jeweils rechte, obere Quadranten). Um den Einfluss des Faltungszustandes der MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS auf die Protein-Protein-Interaktionen zu testen, wurde MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS mit Urea denaturiert und anschließend aufgereinigt und die bindenden Proteine detektiert. Verglichen zum Ansatz mit nicht denaturierter MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS wurden weniger Proteine präzipitiert (69 für Wildtyp-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS: 69, und R138G-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS: 44). Um zu analysieren, welche Proteine signifikant in der Probe (MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS) gegenüber der Kontrolle (MBP) angereichert waren, wurde getestet, ob sich der Mittelwert der logarithmierten SILAC-Werte aus beiden Experimenten (Kombination 1 und 2) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ von 0 unterschied. Somit konnten 19 (aus 216) Proteine im Präzipitat mit Wildtyp-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS und 21 (aus 203) mit R138G-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS identifiziert werden (Abbildung 34, **B**, Werte mit $\log_2(\text{SILAC-Wert}) \geq 0$ und $-\log_2(p\text{-Wert}) \geq 4,322$ sind im rechten oberen Quadranten rot dargestellt). Im Präzipitat mit denaturierter MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS waren erneut weniger Proteine detektierbar (3 für Wildtyp-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS und 7 für R138G-MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS).

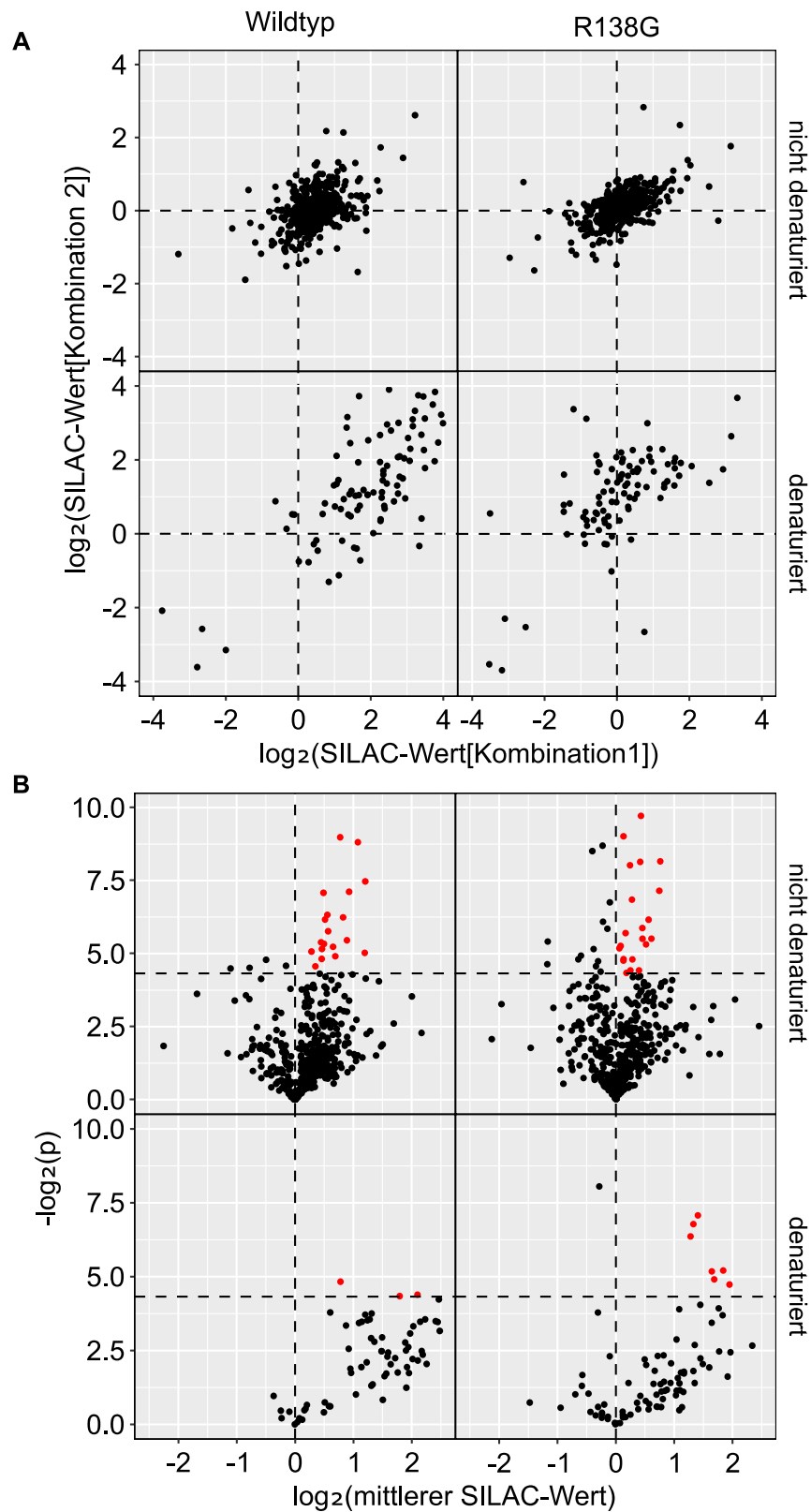


Abbildung 34: Mit Wildtyp und R138G MBP-GCDH_{ΔMTS} präzipitierte Proteine. **A**, Logarithmierte SILAC-Werte aller identifizierten Proteine aus beiden Experimenten (Kombination 1 und Kombination 2) wurden gegeneinander aufgetragen. Proteine mit positivem SILAC-Wert (aus beiden Experimenten) befinden sich im rechten oberen Quadranten. **B**, Mittlerer logarithmierter SILAC-Wert aus beiden Experimenten und p-Wert (für $H_0: \log_2(\text{mittlerer SILAC-Wert}) = 0$). Die horizontale Linie markiert das Signifikanzniveau von 5 % ($\log_2(0,05) = 4,322$).

In einem nächsten Schritt wurden die identifizierten Proteine hinsichtlich ihrer bekannten Funktion evaluiert. Es zeigte sich, dass sowohl cytosolische als auch mitochondriale Chaperone an MBP-GCDH Δ MTS gebunden waren (Tabelle 19), doch nur Hsc70 war gegenüber der Kontrolle signifikant angereichert. Alle anderen (in Tabelle 19 gelisteten) Proteine waren durch einen SILAC-Wert > 1 charakterisiert. Im Vergleich zwischen Wildtyp-MBP-GCDH Δ MTS und R138G-MBP-GCDH Δ MTS zeigten sich keine signifikant erhöhten Anreicherungen der Proteine.

Protein	SILAC-Wert	p-Wert	SILAC-Wert (p-Wert), WT versus R138G
TCP-1-theta	1,6	0,530	1,2 (0,90)
Hsc70	2,3	0,006	1,2 (0,67)
mtHsp70	1,7	0,380	1,2 (0,48)
Hsp60	1,6	0,350	1,1 (0,87)
Hsp70	1,5	0,310	1,2 (0,36)
Hsp90	1,5	0,290	1,1 (0,56)
GRP-78	1,4	0,220	1,1 (0,06)

Tabelle 19: Identifizierte molekulare Chaperone im Präzipitat der nicht denaturierten Wildtyp und R138G MBP-GCDH Δ MTS. Die gelisteten Proteine wurden aufgrund funktioneller Aspekte ausgewählt und mit deren SILAC-Wert als Maß der relativen Anreicherung des Proteins an Wildtyp MBP-GCDH Δ MTS versus MBP (Kontrolle) gelistet. p-Werte sind angegeben für $H_0: \log_2(\text{mittlerer SILAC-Wert}) = 0$.

Mit denaturierter MBP-GCDH Δ MTS konnten im Vergleich zu gefalteter GCDH weniger Proteine präzipitiert werden. Von den in Tabelle 19 extrahierten molekularen Chaperonen konnten noch vier Proteine identifiziert werden (Tabelle 20). Verglichen zu nicht denaturierter MBP-GCDH Δ MTS zeigten diese eine vermehrte Präzipitation mit MBP-GCDH Δ MTS, charakterisiert durch einen höheren SILAC-Wert. Im Vergleich zwischen Wildtyp und R138G-MBP-GCDH Δ MTS zeigte Hsc70 als einziges identifiziertes Protein eine signifikant erhöhte Anreicherung in der Präzipitation mit R136G-MBP-GCDH Δ MTS.

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass Hsc70 als einziges identifiziertes molekulares Chaperon an Wildtyp MBP-GCDH Δ MTS band. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anreicherung dieser Proteine zwischen nicht denaturierter Wildtyp und R138-MBP-GCDH Δ MTS. Im Ansatz mit denaturierter MBP-GCDH Δ MTS waren wenige Proteine präzipitiert worden. Hsc70 war im Vergleich zu denaturiertem Wildtyp-MBP-GCDH Δ MTS signifikant vermehrt angereichert im Präzipitat der denaturierten R138G-MBP-GCDH Δ MTS.

Protein	SILAC-Wert	p-Wert	SILAC-Wert (p-Wert), WT versus R138G
Hsc70	2,5	0,07	1,5 (0,02)
mtHsp70	3,4	0,33	1,1 (0,42)
Hsp60	4,8	0,09	0,9 (0,32)
Hsp90	2,2	0,09	1,1 (0,36)

Tabelle 20: Identifizierte molekulare Chaperone im Präzipitat der denaturierten Wildtyp und R138G MBP-GCDH Δ MTS. Vier der molekularen Chaperone, die in der Präzipitation mit nicht denaturierter Wildtyp MBP-GCDH Δ MTS identifiziert werden konnten, zeigten eine stärkere Anreicherung im Präzipitat der denaturierten Wildtyp MBP-GCDH Δ MTS.

3.3.2 Hypothesenbasierte Bestimmung cytosolischer Protein-Protein-Interaktionen nukleär kodierter mitochondrialer Proteine mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)

Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) ermöglichte die weitere Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Im Wesentlichen konnten damit drei weitere Aspekte beleuchtet werden: Die Arbeit mit dem rekombinanten Protein war auf das mature Protein beschränkt, da eine Expression und Reinigung des *full-length* Proteins in *E. coli* nicht möglich war. Mittels BRET wurden *precursors* nukleär kodierter mitochondrialer Proteine untersucht (i). Protein-Protein-Interaktionen konnten mittels BRET in der lebenden Zelle gemessen werden (ii). Im Gegensatz zur Affinitätsaufreinigung mit Massenspektrometrie (AP-MS/MS, Ko-Komplex-Methode) ist BRET hypothesenbasiert (binäre Methode) und erlaubte damit die Untersuchung weiterer molekularer Chaperone [225]. Die Auswahl der zu untersuchenden Proteine orientierte sich einerseits an den in der AP-MS/MS identifizierten Proteinen, andererseits an dem in der Literatur beschriebenen Translokationskomplex nukleär kodierter mitochondrialer Proteine (iii).

Zuerst wurde die Protein-Protein-Interaktion zwischen GCDH und den cytosolischen Chaperonen Hsc70, Hsp90 und Tom34 gemessen. Hsc70 wurde zuvor mit AP-MS/MS als Protein-Protein-Interaktionspartner der GCDH identifiziert. Hsp90 wurde ebenfalls in der AP-MS/MS identifiziert, war jedoch gegenüber der Kontrolle nicht signifikant mit GCDH angereichert. Es ist bekannt, dass Hsc70 und Hsp90, zusammen mit Tom34, an der mitochondrialen Proteintranslokation auf der cytosolischen Seite beteiligt sind [49]. Deswegen wurde in einem ersten Schritt die Interaktion dieser drei Proteine mit GCDH gemessen.

Zunächst wurde die zelluläre Lokalisation der Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Venus-Fusionsproteine wurden bei $\lambda = 515$ nm fluoreszenzmikroskopiert. hRluc-Fusionsproteine wurden mit primärem Antikörper (anti-GCDH- und anti-PAH-Antikörper) inkubiert und mittels AlexaFluor488-gekoppeltem sekundärem Antikörper markiert und anschließend mikroskopiert (Abbildung 35). Als Kontrolle diente eine nicht transfizierte Probe. Mitochondrien wurden mittels MitoTracker rot, Zellkerne

mittels DAPI blau gefärbt. Es wurden alle möglichen Fusionsproteine in *COS-7*-Zellen exprimiert (C- und N-terminale hRluc oder Venus) und mikroskopiert. Die in Abbildung 35 dargestellten Fusionsproteine zeigten das stärkste Fluoreszenzsignal und die korrekte Lokalisation des Proteins unter allen möglichen Kombinationen. hRluc-GCDH war trotz N-terminaler Fusion der Luziferase und damit der Maskierung der MTS mitochondrial lokalisiert. Hsc70, Tom34 und Hsp90 zeigten, wie die Kontrolle PAH, eine cytosolische Lokalisation. Die Negativkontrollen zeigten ein geringes Hintergrundsignal.

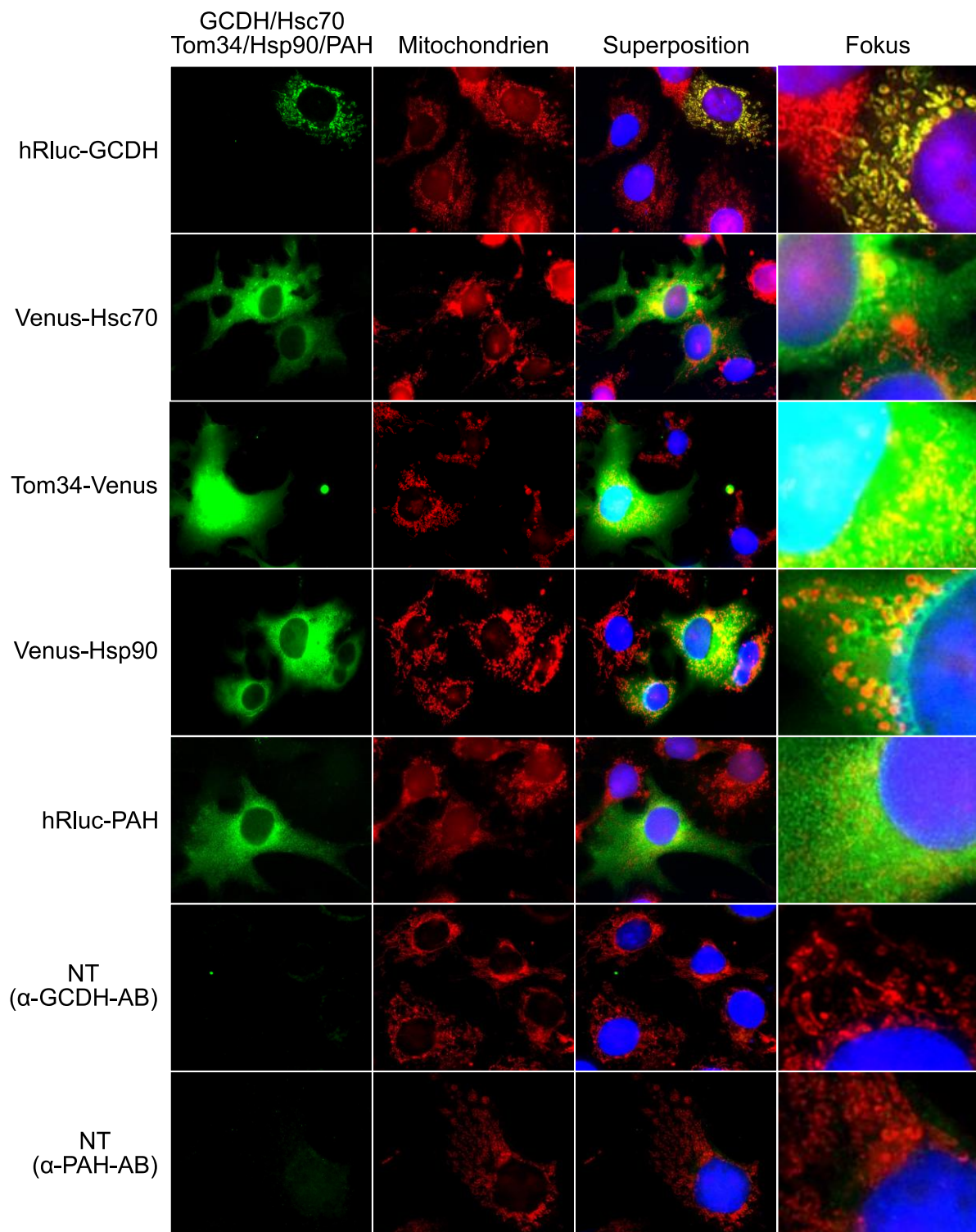


Abbildung 35: Zelluläre Lokalisation der Venus- und hRluc-Fusionsproteine. Mit Venus fusionierte Konstrukte wurden direkt fluoreszenzmikroskopiert, hRluc-Fusionsproteine wurden mit primärem (anti-GCDH- und anti-PAH-) Antikörper und sekundärem AlexaFluor488-gekoppeltem Antikörper gefärbt und anschließend mikroskopiert. hRluc-GCDH war mitochondrial, alle anderen Konstrukte cytosolisch exprimiert (NT: nicht transfiziert).

Da die Immunfluoreszenzmikroskopie nicht zwischen der Lokalisation an der äußeren Mitochondrienmembran, dem Intermembranraum oder der mitochondrialen Matrix unterscheiden konnte, wurde ein *protection assay* durchgeführt (vgl. 2.4.14). Mit dieser

Methode konnte die submitochondriale Lokalisation der hRluc-GCDH bestimmt werden. Nach Fraktionierung hRluc-GCDH-exprimierender *COS-7*-Zellen zeigte sich das Fusionsprotein vorwiegend in der mitochondrialen Fraktion. Nach Inkubation der Mitochondrienfraktion mit 50 µg/ml Proteinase K zeigte sich eine reduzierte hRluc-GCDH-Menge, wobei die Hsp60-Menge nahezu unverändert blieb. Daraus wurde gefolgert, dass sich hRluc-GCDH an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran befand.

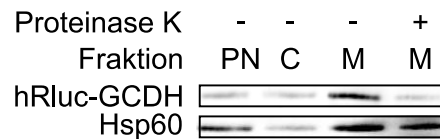


Abbildung 36: Submitochondriale Lokalisation der hRluc-GCDH. hRluc-GCDH wurde in der mitochondrialen Fraktion detektiert. Nach Exposition gegenüber Proteinase K zeigte sich eine Reduktion der hRluc-GCDH-Menge bei gleichbleibender Hsp60-Menge. Dies implizierte, dass hRluc-GCDH an der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert war (PN: post-nukleäre Fraktion, C: cytosolische Fraktion, M: mitochondriale Fraktion).

Die Protein-Protein-Interaktionsmessung mittels BRET erforderte die Ko-Transfektion von cDNA, die für den Energiedonor kodiert, mit cDNA, die für den Energieakzeptor kodiert. Um zu testen, ob beide cDNA als Fusionsproteine ko-exprimiert werden, wurden die Proteinmengen von Venus-Hsc70 und hRluc-GCDH nach eukaryoter Expression in *COS-7*-Zellen überprüft. Das Verhältnis von Energieakzeptor-cDNA (Venus-Hsc70) zu Energiedonor-cDNA (hRluc-GCDH), das Akzeptor-Donor-Verhältnis (A/D-Verhältnis), betrug 1:3. Beide Fusionsproteine konnten auf entsprechender Höhe im Western Blot nachgewiesen werden. hRluc-GCDH migrierte mit seiner größeren Masse (83 kDa) kürzer als Venus-Hsc70 (76 kDa). Die Intensitäten der Banden entsprachen nicht dem Verhältnis der transfizierten cDNA-Menge. In der Mono-Transfektion zeigten sich die gleichen Proteinmengen von Venus-Hsc70 und hRluc-GCDH wie in der Ko-Transfektion. Die Mono-Transfektion mit Venus-Hsc70 beziehungsweise hRluc-GCDH zeigte ein Signal auf Höhe der jeweilig errechneten Molekülmasse.

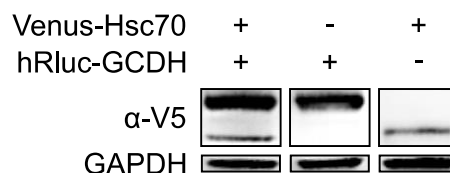


Abbildung 37: Ko-Expression hRluc- und Venus-fusionierter Proteine. Nach Venus-Hsc70-V5 und hRluc-GCDH-V5 Ko-Transfektion konnten die Fusionsproteine im Western Blot detektiert werden. Die Detektion erfolgte mit anti-V5-Antikörper.

Um Protein-Protein-Interaktionen mittels BRET zu identifizieren, wurden sowohl die Lumineszenz bei $\lambda = 475$ nm als auch die Fluoreszenz bei $\lambda = 528$ nm einer Probe gemessen.

Besteht eine Protein-Protein-Interaktion, so nimmt das Verhältnis der RLI (relative Lichtintensität) des Venus-Signals zu jener des Luziferase-Signals zu. Als Negativkontrolle diente die Messung einer Probe nach Mono-Transfektion der cDNA eines Energiedonors (hRluc-GCDH oder Pex19-hRluc) mit Messung des Venus-Signals (unspezifisches Hintergrundsignal). Ein Messergebnis zeigte eine Protein-Protein-Interaktion, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Die Expression des Energiedonors war ausreichend hoch ($RLI > 18.358,5$),
- Der BRET-Wert war $> 0,0091$,
- Das Verhältnis $\frac{RLI_{Venus}}{RLI_{Luziferase}}$ der Probe unterschied sich von jenem der Negativkontrolle mit einem Signifikanzniveau $\alpha < 0,05$.

Die Ko-Expression von hRluc-GCDH und Venus-Hsc70 zeigte einen positiven BRET-Wert, der sich signifikant von der Negativkontrolle (hRluc-GCDH) unterschied (Abbildung 38). Die Ko-Expression von hRluc-GCDH und Venus-PAH, die als funktionelle Negativkontrolle diente, zeigte keinen erhöhten BRET-Wert im Vergleich zum Hintergrundsignal (hRluc-GCDH). Als Positivkontrollen dienten sowohl die GCDH-Homooligomerisierung (hRluc-GCDH mit Venus-GCDH) als auch die vorbeschriebene Heterodimerisierung zwischen bJun und bFos [242, 243] und das Fusionsprotein Venus-hRluc.

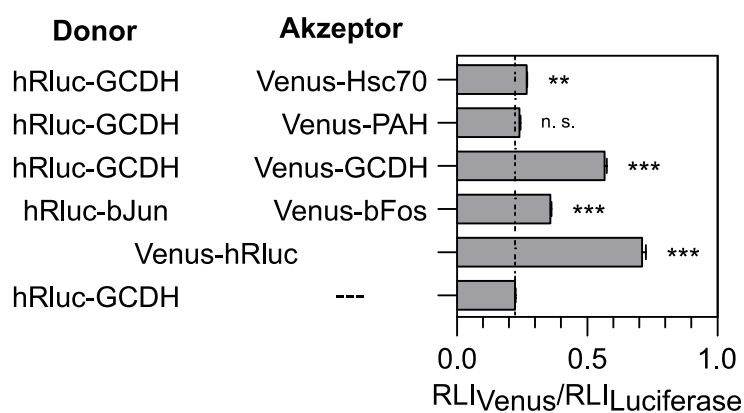


Abbildung 38: Protein-Protein-Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Venus-PAH (BRET). Der Quotient RLI_{Venus}/RLI_{hRluc} wurde für die Ko-Expression von hRluc-GCDH mit Venus-Hsc70 und Kontrollen berechnet (Mittelwerte \pm SEM, für $H_0: \mu(RLI_{Venus}/RLI_{hRluc}) = \mu(RLI_{Kontrolle})$: $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***), n. s.: nicht signifikant, $n = 4$, RLI: relative Lichtintensität).

Nach Expression aller acht Kombinationsmöglichkeiten von mit Venus und hRluc fusionierter GCDH und Hsc70 und Bestimmung des BRET-Wertes zeigte sich eine signifikante Erhöhung der BRET-Werte für die Kombination hRluc-GCDH mit Venus-Hsc70 gegenüber der Kontrolle (hRluc-GCDH, Abbildung 39). Die anderen Kombinationen zeigten einen geringeren BRET-Wert. Die Protein-Protein-Interaktion zwischen GCDH und Hsc70 konnte somit auch *in vivo* verifiziert werden.

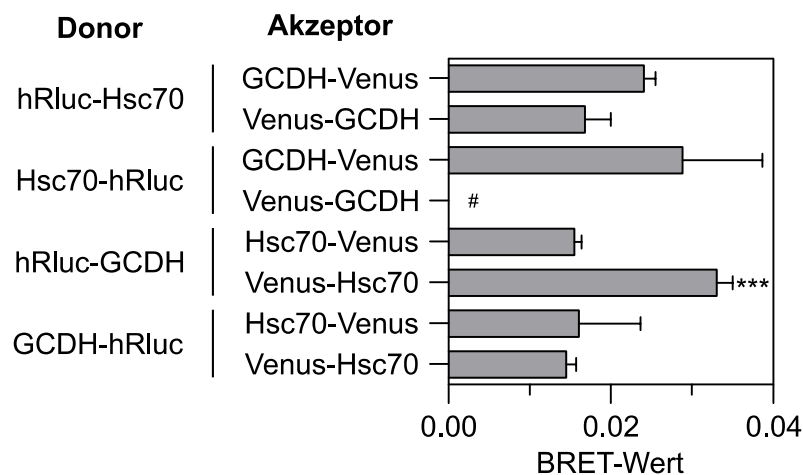


Abbildung 39: Protein-Protein-Interaktionsmessung von GCDH- und Hsc70-Fusionsproteinen. GCDH und Hsc70 wurden N- und C-terminal mit hRluc und Venus in allen acht möglichen Kombinationen ko-exprimiert und die BRET-Werte bestimmt (Mittelwerte \pm SEM, für $H_0: \mu(\text{BRET-Wert}_{\text{Probe}}) = \mu(\text{BRET-Wert}_{\text{Kontrolle}})$: $p < 0,0001$ (***) , #: BRET-Werte < 0 , $n = 4$).

Im Folgenden sollten hypothesenbasiert Protein-Protein-Interaktionen der GCDH mit weiteren cytosolischen molekularen Chaperonen untersucht werden. Hierzu wurden alle vier Fusionsproteine der GCDH (hRluc-GCDH, GCDH-hRluc, Venus-GCDH und GCDH-Venus) mit den jeweiligen Fusionsproteinen der zu untersuchenden Protein-Protein-Interaktionspartner ko-exprimiert und der BRET-Wert bestimmt. Als Kontrolle diente die Mono-Expression des Energie-Donors (hRluc-Fusionsprotein). Die Auswahl der zu testenden Protein-Protein-Interaktionspartner der GCDH umfasste Hsc70, Hsp70 sowie Hsp90, die in der AP-MS/MS identifiziert wurden. Des Weiteren wurden die Protein-Protein-Interaktionen zu folgenden molekularen Chaperone getestet: Clusterin (CLU, auch Apolipoprotein J, ApoJ) ist ein primär extrazelluläres molekulares Chaperon, das bei Hitze- oder Proteinfehlfaltungsstress jedoch auch intrazellulär als Teil der *unfolded protein response* agieren kann [244-246]. Das mitochondriale Chaperon *Caseinolytic peptidase B protein homolog* (ClpB) zählt zu den sogenannten *disaggregatases*, einer Subfamilie molekularer Chaperone, die an der Erkennung von fehlgefalteten und aggregierten Proteinen beteiligt ist. Das Protein ist im Mitochondrium lokalisiert [247]. Die Hsp70/Hsc70-Ko-Chaperone BAG1, BAG3, BAG4, BAG5, DnajC2 und Hsp40 modulieren die Hsp70- und Hsc70-Aktivität und haben teilweise eine intrinsische Chaperon-Aktivität sowie Funktionen bei der Signaltransduktion zur Erkennung fehlgefalteter Proteine [248-251]. Die Proteine der BAG-Familie (*Bcl-2 associated athanogene*) zeichnet eine konservierte C-terminale Domäne, die BAG-Domäne, aus, die die ATPase-Domänen des Hsp70 und Hsc70 binden kann [252]. Protein-Protein-Interaktionen der Ko-Chaperone mit Hsp70 und Hsc70 wurden vorbeschrieben. Die hier untersuchten BAG-Ko-Chaperone sind cytosolisch lokalisiert [253]. DnaJC2 (alternativ: MPP11) fungiert als Teil eines am Ribosom agierenden Chaperon-Komplexes mit Hsp70 [254]. Hsp40 interagiert mit Hsc70/Hsp70 und Hsp90 [255]. Die Rolle der *translocase of the outer membrane* Tom34 und Tom20 sowie des *valosin-containing proteins* (VCP) wurden eingehend beschrieben (Kapitel 1.1).

Die gemessenen BRET-Werte aus der Ko-Expression der GCDH mit molekularen Chaperonen wurden auf der Abszisse respektive ihres logarithmierten p-Wertes (für $H_0: \mu(\text{BRET-Wert}_{\text{Probe}}) = \mu(\text{BRET-Wert}_{\text{Kontrolle}})$, zweiseitiger, ungepaarter t-Test) auf der Ordinate dargestellt (Abbildung 40, **A**). Um Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren, wurde (nach interner Evaluierung) eine Toleranzuntergrenze des BRET-Werts von 0,0091 und im Intervall $\text{BRET-Wert} = [0,0091; 0,0263]$ ein Graubereich definiert. Des Weiteren wurde das Signifikanzniveau für Interaktionen $\alpha < 0,05$ und für den Graubereich $0,05 < \alpha < 0,1$ definiert. Kombinationen mit hohen BRET-Werten mit $p < 0,05$ befinden sich dementsprechend im rechten oberen Quadranten. Um Protein-Protein-Interaktionen molekularer Chaperone untereinander zu testen, wurden Hsc70 (**B**), Hsp70 (**C**) und Hsp90 (**D**) jeweils gegen alle weiteren molekularen Chaperone getestet. GCDH interagiert mit den untersuchten molekularen Chaperonen Hsp70, Hsc70, Hsp90, mtHsp70, DnaJC2, Tom20, Tom34 und VCP. Die Interaktion mit CLU war im Graubereich. Hsc70 interagiert mit den Co-Chaperonen DnaJC2, BAG3, BAG5 und Hsp40, die Interaktion mit BAG1 war im Graubereich. Des Weiteren zeigte sich eine Interaktion mit Hsp90 und Tom34. Hsp70 interagiert mit den gleichen Chaperonen. Zusätzlich zeigte sich eine Interaktion mit BAG3 und BAG4. Die Interaktion mit BAG1 war, im Gegensatz zu Hsc70, nicht im Graubereich. Hsp90 interagiert mit Hsc70 und Hsp70, die Interaktion zu Tom34 war im Graubereich.

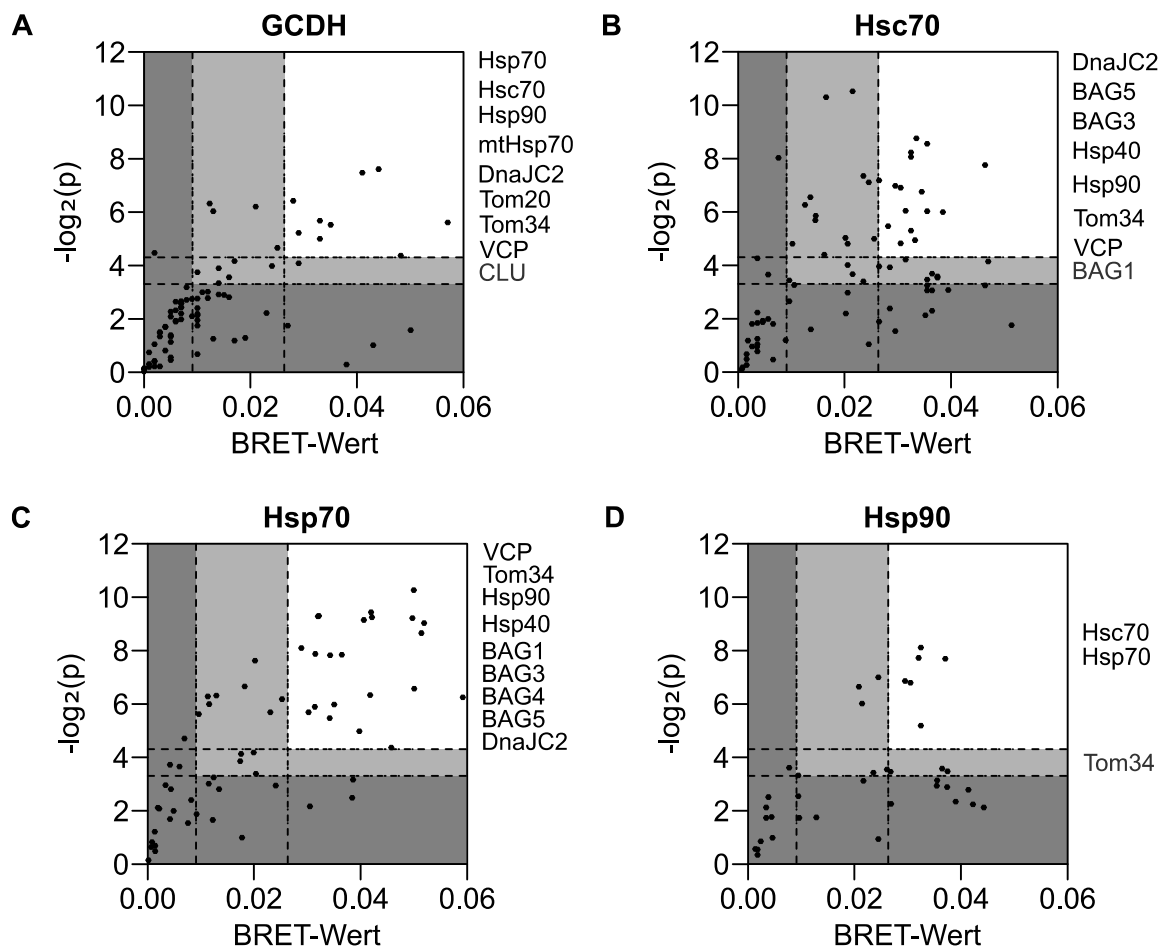


Abbildung 40: Protein-Protein-Interaktionsmessung von GCDH- und Chaperon-Fusionsproteinen. Venus- und hRluc-GCDH wurden mit cytosolischen Chaperonen ko-exprimiert und die BRET-Werte gemessen (A). Protein-Protein-Interaktionen zwischen molekularen Chaperonen wurden separat gemessen (B, C und D). Identifizierte Interaktionspartner wurden neben dem Graphen gelistet. Mehrfachbestimmungen wurden dabei nicht berücksichtigt (gestrichelte Linien definieren den Graubereich für BRET- und p-Wert, $n=2$ pro Protein-Protein-Interaktionsmessung).

Die Interaktionen zwischen GCDH und Hsc70, Hsp70 und Hsp90 wurden mittels BRET-Sättigungsexperimenten verifiziert. Hierbei wurde das Verhältnis zwischen Energie-Akzeptor- und Energie-Donor-Menge (AD-Quotient) als Funktion des gemessenen BRET-Wertes bestimmt. Interagieren zwei (Fusions-) Proteine, so liegt ein hyperboler Zusammenhang zwischen AD-Quotient und BRET-Wert vor. Da der AD-Quotient durch Transfektion von variierenden cDNA-Mengen definiert wird, wurde in einem ersten Schritt der Zusammenhang zwischen transfizierter cDNA-Menge und Fluoreszenz- und Lumineszenzsignal getestet. Es wurde die Fluoreszenz und Lumineszenz von rekombinantem Venus und hRluc in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration bestimmt (Abbildung 41, A). Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Proteinkonzentration und der Signalstärke (RLI) für beide Proteine und Messverfahren. Es wurde des Weiteren untersucht, wie die transfizierten Mengen respektive des AD-Quotienten mit den gemessenen AD-Quotienten korrelierten. Es zeigte sich auch hier ein linearer Zusammenhang (Abbildung 41, B). Somit konnte in den folgenden Sättigungsexperimenten durch eine Variation der transfizierten cDNA-Mengen das Verhältnis von Energie-Akzeptor und Energie-Donor kontrolliert werden.

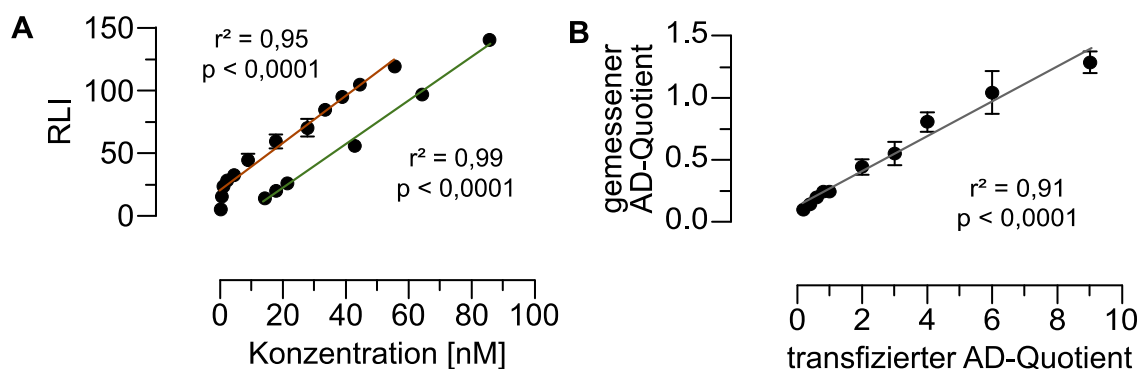


Abbildung 41: Verhältnis zwischen transfizierter cDNA-Menge und Proteinmenge. **A**, Zunehmende Mengen rekombinanter hRluc- und Venus-Proteine zeigten eine lineare Zunahme der Signalstärke (rot: hRluc, grün: Venus). **B**, Linearer Zusammenhang zwischen cDNA-Menge, die im Verhältnis des AD-Quotienten transfiziert wurde, und dem gemessenen AD-Quotienten aus den Fluoreszenz- und Lumineszenz-Signalen (Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$, für H_0 : Steigung $m = 0$: $p < 0,0001$, zweiseitiger, unabhängiger t-Test)

Für das BRET-Sättigungsexperiment wurden zunehmende Mengen der Akzeptor-cDNA (Venus-Fusionsproteine) relativ zur Menge der Donor-cDNA (hRluc-GCDH) in zehn Quotienten transfiziert. Nach 24 h Expression wurden BRET-Werte für jeden Quotienten bestimmt. hRluc-GCDH zeigte mit Venus-Tom34, Venus-Hsp90 und Venus-Hsc70 mit zunehmendem AD-Quotienten eine Zunahme des BRET-Werts (Abbildung 42). Ab einem AD-Quotienten = 2 stellte sich eine Sättigung ein. Der Zusammenhang konnte als hyperbole Regression ausgedrückt werden. Die Determinationskoeffizienten für alle drei Protein-Protein-Interaktionen war $r^2 > 0,8$. Ein hyperboler Zusammenhang zwischen AD-Quotienten und BRET-Werten zeigt eine Protein-Protein-Interaktion an, da es zu einer Sättigung der Energie-Akzeptoren kommt [256, 257]. Dieser Zusammenhang konnte bei der Ko-Transfektion von hRluc-GCDH und Venus-ClpB nicht beobachtet werden. Interagieren Venus- und hRluc-fusionierte Proteine nicht, so kommt es zu einem linearen Funktionsverlauf [230]. Es konnten somit Tom34, Hsp90 und Hsc70 als Protein-Protein-Interaktionspartner der GCDH bestätigt werden. Die Hypothese, dass ClpB nicht mit GCDH interagiert (Negativkontrolle), konnte mit den Sättigungsexperimenten verifiziert werden.

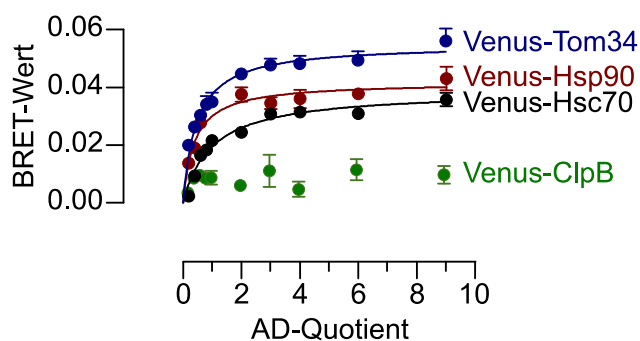


Abbildung 42: BRET-Sättigungsexperiment. Zunehmende Mengen der Akzeptor-cDNA (Venus-Tom34, Venus-Hsp90 und Venus-Hsc70) relativ zur Donor-cDNA-Menge (hRluc-GCDH) zeigten einen hyperbolen Zusammenhang mit den BRET-Werte (Mittelwerte \pm SEM; $n = 4$; hyperbole Regression: $r^2 > 0,8$). Der Zusammenhang zwischen

dem AD-Quotienten und dem BRET-Wert für die Messung der Ko-Expression von Venus-ClpB mit hRluc-GCDH zeigte keinen hyperbolischen Zusammenhang.

Im Folgenden wurde untersucht, ob zusätzlich zu den Acyl-CoA-Dehydrogenasen weitere Proteinfamilien nukleär kodierter mitochondrialer Proteine mit Hsp70, Hsc70, Hsp90, ClpB, Tom34 und VCP interagierten. Die Proteine Ornithin-Transcarbamylase (OTC), die alpha-Untereinheit der 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase (BCKDHA), Carbamoylphosphat-Synthetase 1 (CPS1) waren die zu testenden mitochondrialen Interaktionspartner. Des Weiteren wurden *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD) und *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase* (MCAD) als zwei weitere Vertreter der Familie der Acyl-CoA-Dehydrogenasen analysiert. Alle im Folgenden untersuchten Proteine sind mit angeborenen Stoffwechseldefekten assoziiert [157, 258-261]. Alle untersuchten nukleär kodierten mitochondriale Proteine interagierten mit Hsp70, Hsc70, Hsp90 und Tom34 (Abbildung 43). Die Interaktion zwischen VCP und BCKDHA war im Graubereich ($0,05 < p < 0,1$). Alle anderen getesteten Proteine zeigten eine Interaktion mit VCP. BCKDHA interagierte als einziges getestetes mitochondriales Protein mit ClpB.

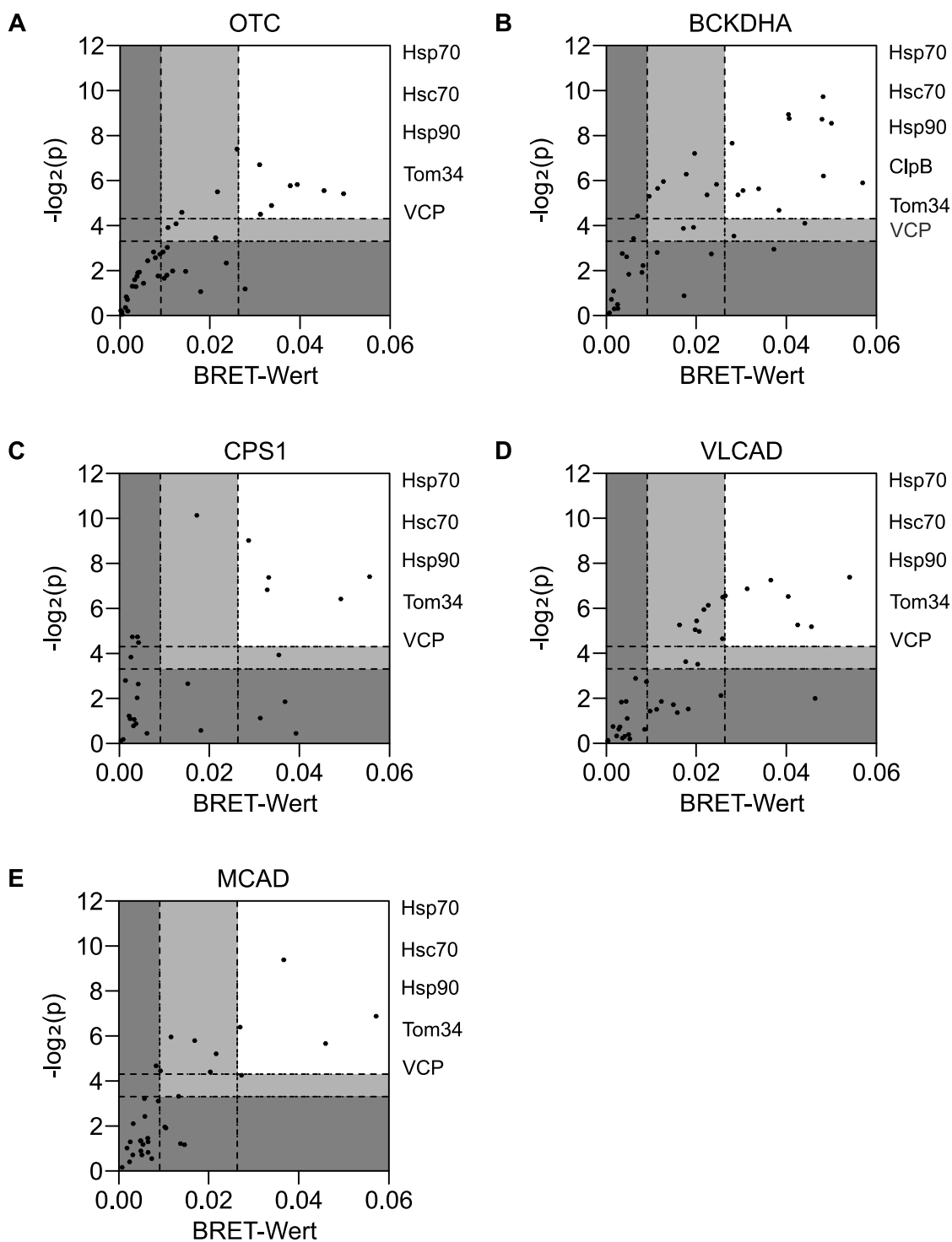


Abbildung 43: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen nukleär kodierter mitochondrialer Proteine mit molekularen Chaperonen. Die Interaktionen zwischen nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen und den molekularen Chaperonen Hsc70, Hsp70, Hsp90, ClpB sowie Tom34 und VCP wurden analysiert. Identifizierte Interaktionspartner wurden neben dem Graphen gelistet. Mehrfachbestimmungen wurden dabei nicht berücksichtigt (gestrichelte Linien definieren den Graubereich für BRET- und p-Wert, $n=2$ pro Protein-Protein-Interaktionsmessung).

3.4 Variante GCDH zeigten veränderte Protein-Protein-Interaktionen mit dem Netzwerk cytosolischer molekularer Chaperone

Im Folgenden wurde getestet, ob variante GCDH eine veränderte Affinität zu den durch AP-MS/MS und BRET identifizierten molekularen Chaperone zeigt.

3.4.1 Ko-Immunopräzipitation der GCDH mit Hsc70

Um die Interaktion zwischen GCDH und Hsc70 zu verifizieren wurde untersucht, ob endogen exprimiertes Hsc70 GCDH *in vivo* bindet. Hierzu wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Wildtyp und F71S-GCDH-V5 wurden jeweils eukaryot exprimiert. In der post-nukleären Fraktion nach Zellyse konnten GCDH-V5 und Hsc70 detektiert werden (Abbildung 44). Nach Inkubation der post-nukleären Fraktion mit anti-V5-Antikörper und mit Protein-G-gebundenen magnetischen Mikrokügelchen konnte GCDH-V5 über eine Säule gereinigt werden bis im letzten Waschschrift (W4) kein Protein mehr nachweisbar war. Im Eluat war neben GCDH-V5 auch Hsc70 nachweisbar, sowohl für Wildtyp-GCDH als auch für F71S. Im Eluat der Negativkontrollen konnte kein Hsc70 detektiert werden. Im Eluat in den anti-ABCD3-Antikörper- und nicht transfizierten Kontrolle zeigte sich eine Bande auf Höher der pGCDH. Diese wurde jedoch in der Kontrolle, bei der kein Antikörper zugegeben wurde, nicht detektiert. Es wird gefolgert, dass es sich hierbei um den (denaturierten) Antikörper aus der Immunopräzipitation handelt. Dieses Ergebnis verifiziert Hsc70 als Protein-Protein-Interaktionspartner der GCDH. Zudem zeigte das Experiment, dass Hsc70 nicht nur posttranslational *in vitro*, sondern auch *in vivo* an GCDH bindet.

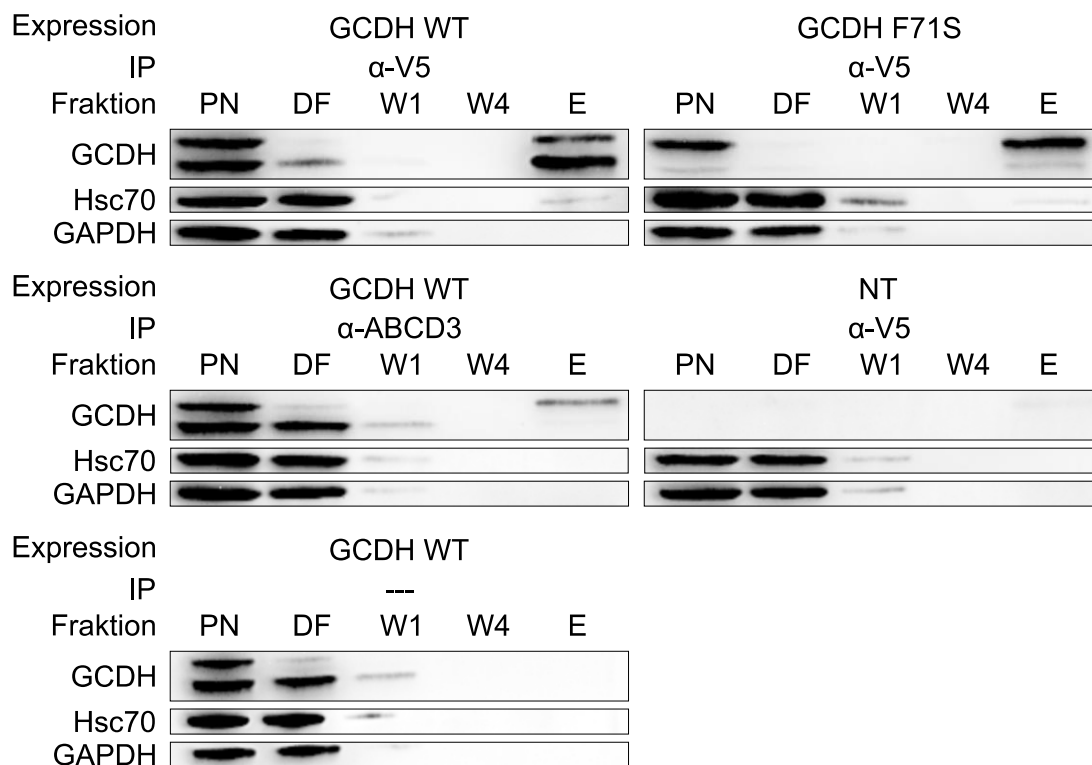


Abbildung 44: Ko-Immunopräzipitation von GCDH-V5 und Hsc70. Wildtyp-GCDH Wildtyp und F71S wurden als Fusionsprotein mit C-terminalem V5-Epitop exprimiert und immunopräzipitiert. Es zeigte sich Hsc70 im Eluat der Probe mit Wildtyp und F71S-GCDH-V5. In den Negativkontrollen war Hsc70 nicht nachweisbar (PN: post-nukleäre Fraktion, DF: Durchfluss, W: Waschfraktion, E: Elution, NT: nicht transfiziert).

3.4.2 Quantitative Analyse der Chaperon-Klient-Interaktion mittels *luminescence-based mammalian interactome assay* (LUMIER assay)

Um die identifizierten Protein-Protein-Interaktionen quantitativ zu bestimmen, wurde ein *luminescence-based mammalian interactome assay* (LUMIER-Experiment) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die durch BRET validierten Positiv- und Negativkontrollen mittels LUMIER-Experiment überprüft. Die Analyse der GCDH-Homooligomerisierung (hRluc-GCDH + GCDH-His) zeigte eine zirka fünffache Erhöhung des Lumineszenzquotienten gegenüber der Hintergrundkontrolle (hRluc-GCDH, Abbildung 45). Der Quotient für die Ko-Expression hRluc-GCDH mit His-PAH unterschied sich hingegen nicht von der Hintergrundkontrolle.

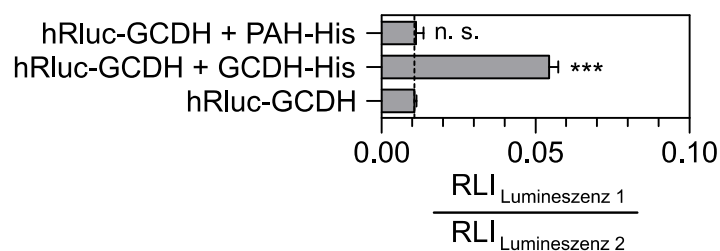


Abbildung 45: Kontrollen im LUMIER-Experiment. Relativ zur Hintergrundkontrolle (hRluc-GCDH) zeigte die Ko-Expression von hRluc-GCDH mit GCDH-His (Homooligomerisierung) eine Erhöhung des Lumineszenzquotienten. Die Negativkontrolle (hRluc-GCDH + PAH-His) zeigte keinen Unterschied zur Hintergrundkontrolle. Die Ko-Expression von hRluc-GCDH mit PAH-His resultierte in einem unveränderten Quotienten (Mittelwerte \pm SEM; zweiseitiger, ungepaarter t-Test für $H_0: \mu_{\text{Probe}} = \mu_{\text{Hintergrundkontrolle}}$; $p < 0,0001$ (***) ; n. s.: nicht signifikant, $n = 4$).

Zunächst wurden die Interaktionen zwischen Wildtyp-GCDH und den molekularen Chaperonen Hsc70, Hsp90 und Tom34 gemessen. Dies setzte voraus, dass GCDH mit den molekularen Chaperonen ko-exprimiert wird. Es wurden die Proteinmengen im Zelllysate nach Ko-Expression der Proteine mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 46). In der Kontrolle (GCDH-Mono-Expression) wurde GCDH als pGCDH und mGCDH nachgewiesen. Zudem zeigte sich eine Bande bei zirka 90 kDa. In den vier Proben mit der jeweiligen Ko-Expression der molekularen Chaperone konnten zusätzlich Hsc70, Hsp90 und Tom34 detektiert werden.

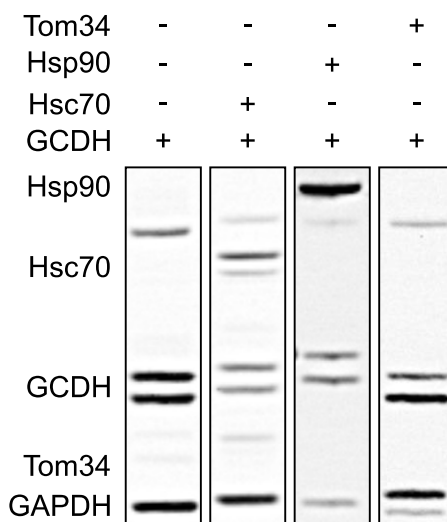


Abbildung 46: Ko-Expression der GCDH mit Hsc70, Hsp90 und Tom34. Mittels Western Blot wurden die Proteinmengen in den Gesamtzellfraktionen bestimmt.

Es wurde als nächstes überprüft, ob hRluc-GCDH nach der Ko-Expression mit Hsc70-His, Hsp90-His und Tom34-His interagiert. Als (Hintergrund-) Kontrolle diente die Mono-Expression von hRluc-GCDH. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Lumineszenzquotienten für die Ko-Expressionen aller drei Proteine verglichen zur Kontrolle (Abbildung 47). Somit konnten die Protein-Protein-Interaktionen, die mittels AP-MS/MS und BRET identifiziert wurden, durch LUMIER bestätigt werden.

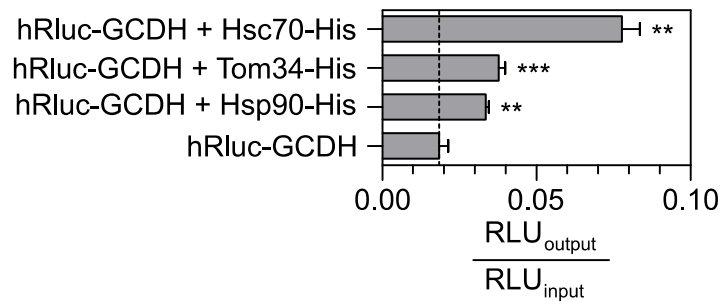


Abbildung 47: Protein-Protein-Interaktionen zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His, Hsp90-His und Tom34-His. Verglichen zur Kontrolle (hRluc-GCDH) zeigte die Ko-Expression mit allen drei Proteinen eine Erhöhung des Lumineszenzquotienten (Mittelwerte \pm SEM; zweiseitiger, ungepaarter t-Test für $H_0: \mu_{\text{Probe}} = \mu_{\text{Hintergrundkontrolle}}$; $p < 0,0001$ (***), $p < 0,001$ (**); $n = 4$).

Es konnte vorausgehend gezeigt werden, dass GCDH $_{\Delta\text{MTS}}$ mitochondrial lokalisiert war und *in vitro* an Mitochondrien binden konnten. Es wurde deshalb überprüft, ob die Bindung von GCDH zu Hsc70, Hsp90 und Tom34 über Strukturen innerhalb des muren Anteils der GCDH vermittelt wird. Hierzu wurde die Interaktion zwischen den molekularen Chaperonen und hRluc-GCDH $_{\Delta\text{MTS}}$ mit der Interaktion zwischen den molekularen Chaperonen und hRluc-GCDH $_{\text{MTS}}$ verglichen. Sowohl hRluc-GCDH $_{\text{MTS}}$ als auch hRluc-GCDH $_{\Delta\text{MTS}}$ interagierte mit Hsc70-His, Hsp90-His und Tom34-His (Abbildung 48). Verglichen zu hRluc-GCDH $_{\text{MTS}}$ war die relative Interaktionsstärke von hRluc-GCDH $_{\Delta\text{MTS}}$ jedoch mit allen drei Proteinen um zirka ein Viertel signifikant schwächer. Es wird gefolgert, dass die Interaktion zwischen GCDH und Hsc70, Hsp90 und Tom34 sowohl über mure Anteile als auch die MTS vermittelt wird.

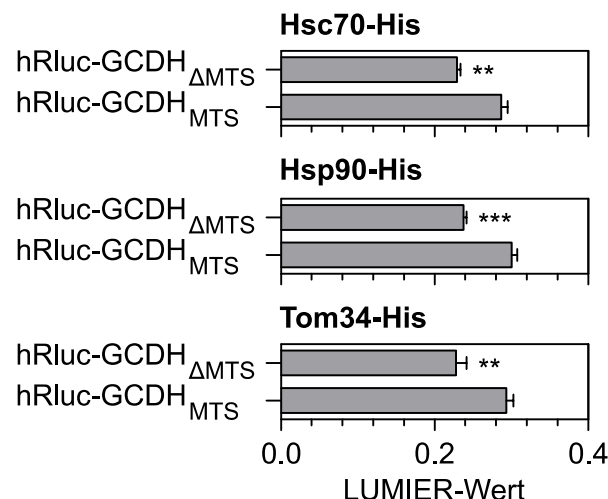


Abbildung 48: Einfluss der MTS auf die Bindung der GCDH zu molekularen Chaperonen. hRluc-GCDH und hRluc-GCDH $_{\Delta\text{MTS}}$ wurden mit His-markierten Chaperonen exprimiert und der LUMIER-Wert. Die Bindung zu Hsc70, Hsp90 und Tom34 war schwächer ohne MTS, dennoch signifikant höher als die Negativkontrolle (nicht dargestellt, Mittelwerte \pm SEM; zweiseitiger, ungepaarter t-Test für $H_0: \mu_{\text{hRluc-GCDH(MTS)}} = \mu_{\text{hRluc-GCDH(\Delta\text{MTS})}}$; $p < 0,0001$ (***), $p < 0,001$ (**); $n = 4$).

Im Folgenden wurde getestet, welchen Einfluss Aminosäuresubstitutionen im maturen Anteil der GCDH auf die Stärke der Interaktion zu Hsc70, Hsp90 und Tom34 haben. Hierfür wurden Varianten der GCDH ausgewählt mit einem Mutationsspektrum über alle drei Domänen des Proteins. Verglichen zum Wildtyp zeigte sich eine abgeschwächte Interaktion zwischen varianter hRluc-GCDH und Hsc70-His (Abbildung 49). Die Interaktion zu Hsp90-His war für variante GCDH aufgehoben. Tom34-His zeigte keine Interaktion (R138G) oder eine abgeschwächte (F71S und A421V) Interaktionsstärke. Die absoluten LUMIER-Werte der Interaktionen zwischen Hsc70-His und (varianter) hRluc-GCDH waren verglichen zur Interaktion zu Hsp90-His und Tom34-His am höchsten. Es konnte somit gezeigt werden, dass Aminosäuresubstitutionen im maturen Anteil der GCDH zu einer reduzierten Interaktionsstärke zu den untersuchten molekularen Chaperonen führten.

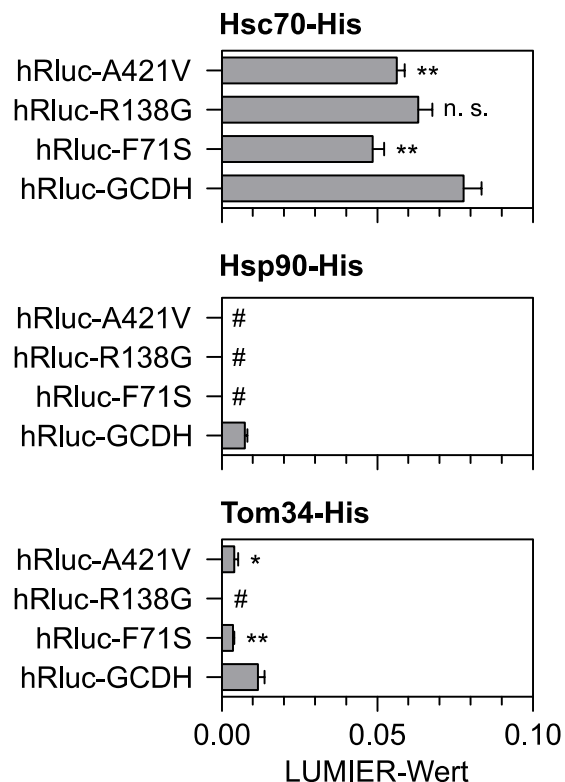


Abbildung 49: Protein-Protein-Interaktion zwischen varianter hRluc-GCDH und Hsc70-His, Hsp90-His und Tom34-His. Die Interaktion zwischen varianter hRluc-GCDH zu allen drei Chaperonen war schwächer oder aufgehoben verglichen zu Wildtyp hRluc-GCDH (Mittelwerte \pm SEM; zweiseitiger, ungepaarter t-Test für $H_0: \mu_{\text{Wildtyp}} = \mu_{\text{Variante}}$: $p < 0,001$ (**), $p < 0,05$ (*); $n = 4$); #: LUMIER-Wert < 0).

3.5 Die Stärke der Interaktion zwischen varianter GCDH und Hsc70 korreliert mit der Prozessierung der GCDH

3.5.1 Korrelation der Interaktionsstärke zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His und der Prozessierung der GCDH

Um einen Zusammenhang zwischen der variantenspezifischen Prozessierung der GCDH und der Interaktionsstärke mit cytosolischen Chaperonen herzustellen, wurde der LUMIER-Wert von (varianter) hRluc-GCDH und Hsc70-His mit dem logarithmiertem p/m-Quotienten der GCDH korreliert. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen beiden Parametern für den Wildtyp und die Varianten F71S, R138G und A421V (Abbildung 50). Je schwächer die Bindung an Hsc70 war, desto größer war der p/m-Quotient.

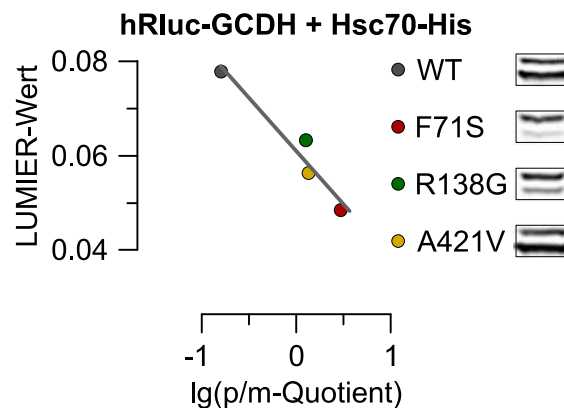


Abbildung 50: Korrelation zwischen LUMIER-Wert und p/m-Quotient. Die mittleren LUMIER-Werte der Interaktionen zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His sind gegen den mittleren logarithmierten p/m-Quotienten aufgetragen. Es besteht eine negative Korrelation (Pearsons $r = -0,98$; $r^2 = 0,97$; für H_0 : Steigung $m = 0$: $p = 0,03$).

3.5.2 p/m-Quotienten und LUMIER-Werte für die Protein-Protein-Interaktion zwischen Hsc70 und GCDH in Abhängigkeit der Hsc70-Aktivität

Die Interaktion zwischen GCDH und Hsc70 konnte durch drei unabhängige Methoden verifiziert werden. Mittels LUMIER konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Interaktionsstärke mit der Effizienz der GCDH-Prozessierung (respektive des p/m-Quotienten) korreliert. Dieser Mechanismus sollte im Folgenden durch die Inhibition der Hsc70-Aktivität geprüft werden. Für die Inhibition der Hsc70-Aktivität wurden vier Substanzen eingesetzt: Natriumphenylbutyrat, VER-155008, Pifithrin- μ und Spergualin. Natriumphenylbutyrat konnte in vorausgehenden Studien die Expression von Hsc70 reduzieren und somit fehlgefaltete (CFTR-) Proteinkomplexe lösen, was in einer Erhöhung der Funktionalität des Klienten resultierte [262]. VER-155008 und Pifithrin- μ (alternativ: 2-Phenylethynesulfonamid, PES) wurden als zwei Substanzen mit antineoplastischem Effekt identifiziert. VER-155008 agiert

dabei als Nukleotidanalogen und richtet sich gegen die *nucleotide binding domain* (NBD) des Chaperons. Die Bindestelle des Pifithrin- μ am Hsc70 ist nicht eindeutig identifiziert, es werden sowohl die NBD als auch die *substrate binding domain* (SBD) diskutiert. Beide Substanzen reduzieren die Hsc70-Aktivität [263-265]. Bei den Untersuchungen wurde nicht zwischen dem stressinduzierten Hsp70 und der konstitutiven Form Hsc70 unterschieden [266]. Spergualin bindet an eine regulatorische Domäne, die die ATPase-Aktivität des Chaperons vermittelt, wenngleich der genaue Mechanismus nicht bekannt ist [267, 268]. Die Substanz inhibiert dadurch die Hsc70-Aktivität [269].

Um den Effekt der Hsc70-Aktivität auf die GCDH-Prozessierung zu untersuchen, wurden die p/m-Quotienten von GCDH Wildtyp und Varianten in Abhängigkeit der vier Substanzen bestimmt. GCDH Wildtyp wurde hierzu in COS-7-Zellen in Anwesenheit der Substanzen in steigenden Konzentrationen exprimiert. Der p/m-Quotient der GCDH-Expression mit Natriumphenylbutyrat, VER-155008 und Pifithrin- μ unterschied sich nicht signifikant von dem p/m-Quotienten der Kontrolle (Expression ohne Substanz, Abbildung 51). Höhere Konzentrationen der Substanzen waren mit einer Toxizität assoziiert (gemessen an der Lichtmikroskopie der Zellen oder der Gesamtproteinmenge der Kontrolle GAPDH im Western Blot, angezeigt durch das Nummernzeichen, #). Spergualin zeigte eine dosisabhängige Zunahme des p/m-Quotienten, wobei sich die p/m-Quotient-Mittelwerte bei $c = 300 \mu\text{M}$ und $c = 400 \mu\text{M}$ signifikant von der Kontrolle ($c = 0 \mu\text{M}$) unterschieden.

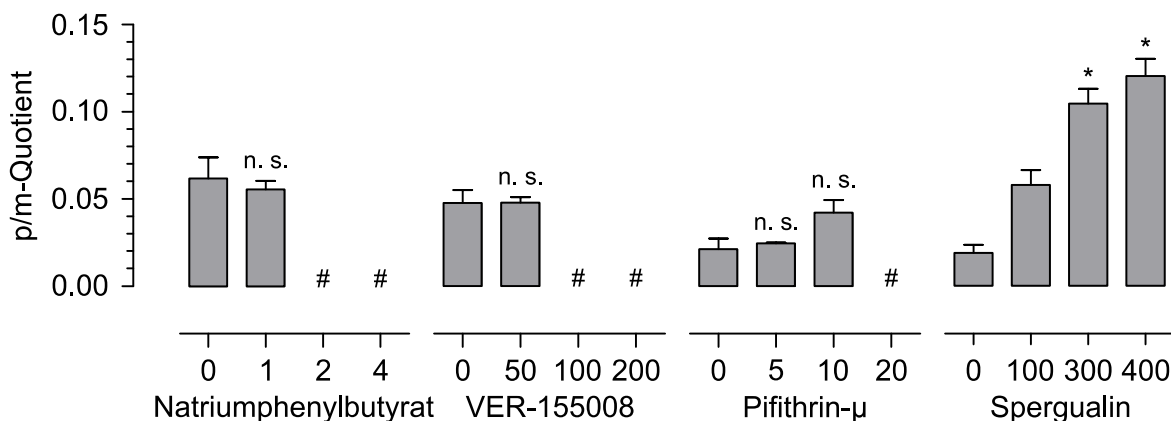


Abbildung 51: Einfluss von Hsc70-Modulatoren auf den p/m-Quotienten der GCDH. Natriumphenylbutyrat, VER-155008 und Pifithrin- μ beeinflussten nicht den p/m-Quotienten der GCDH. Höheren Konzentrationen der Substanzen waren toxisch (#). Spergualin zeigte eine dosisabhängige Zunahme des p/m-Quotienten (Mittelwerte \pm SEM; zweiseitiger, ungepaarter t-Test für $H_0: \mu_c = 0 = \mu_c \neq 0$; $p < 0,05$ (*); n. s.: nicht signifikant; $n = 3$)

Es wurde überprüft, ob die Zunahme des p/m-Quotienten durch Spergualin auf eine Erhöhung der pGCDH-Menge oder Reduktion der mGCDH-Menge zurückzuführen war. Hierzu wurden die Intensitäten der pGCDH- und mGCDH-Banden im Western Blot verglichen. Mit zunehmender Spergualinkonzentration nahm die pGCDH-Menge zu (Abbildung 52). Die Hsc70- und GAPDH-Mengen blieben konstant.

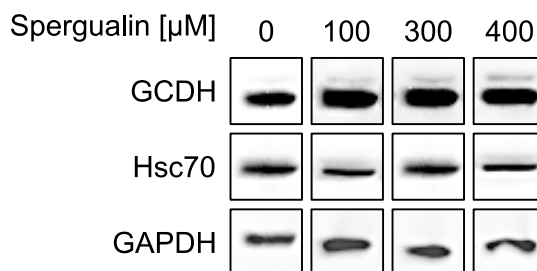


Abbildung 52: Dosisabhängiger Einfluss von Spergualin auf die pGCDH-, mGCDH-, Hsc70- und GAPDH-Mengen. Repräsentativer Western Blot aus Triplikaten der Proben für die Berechnung des p/m-Quotienten. Mit Zunahme der Spergualinkonzentration nahm die pGCDH-Menge zu.

Vorausgehende Experimente zeigten einen Zusammenhang zwischen dem p/m-Quotienten der GCDH mit der Interaktionsstärke zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His. Es wurde im Folgenden getestet, ob Spergualin die Interaktionsstärke zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His beeinflusst. Hierzu wurde ein LUMIER-Experiment durchgeführt. Die Zellen wurden unter verschiedenen Spergualinkonzentrationen kultiviert und beide Proteine exprimiert. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Interaktionsstärke zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His (Abbildung 53, **A**).

100 μM Spergualin führte zu einer signifikanten Erhöhung der Interaktionsstärke um 339 % verglichen zur Kontrolle ohne Spergualin. Der Effekt konnte nur für die Protein-Protein-Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His und nicht für die Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Tom34-His oder hRluc-Hsc70 und Tom34-His beobachtet werden (Abbildung 53, **B**). Der Einfluss von Spergualin auf die Protein-Protein-Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His zeigte sich ebenso für die untersuchten GCDH-Varianten (Abbildung 53, **C**). Wie zuvor beobachtet war der absolute LUMIER-Wert varianter hRluc-GCDH vermindert. Unter Spergualin konnte diese jedoch, ebenso wie für den Wildtyp, erhöht werden. Die Differenz zwischen den LUMIER-Mittelwerten mit und ohne Spergualin war zwischen den Varianten nicht signifikant (Einweg-Varianzanalyse mit $p > 0,05$). Somit ist davon auszugehen, dass Aminosäuresubstitutionen im maturen Anteil des Klienten zwar auf die Bindung mit Hsc70 *per se* einen Einfluss zeigen, die Interaktion wurde jedoch nicht durch die Modulation der ATPase-Funktion des Hsc70, die durch Spergualin verändert wurde, beeinträchtigt, da sich keine variantenspezifischen Effekte unter Spergualin zeigten, sondern alle untersuchten Varianten eine Erhöhung der Interaktionsstärke mit Hsc70 zeigten.

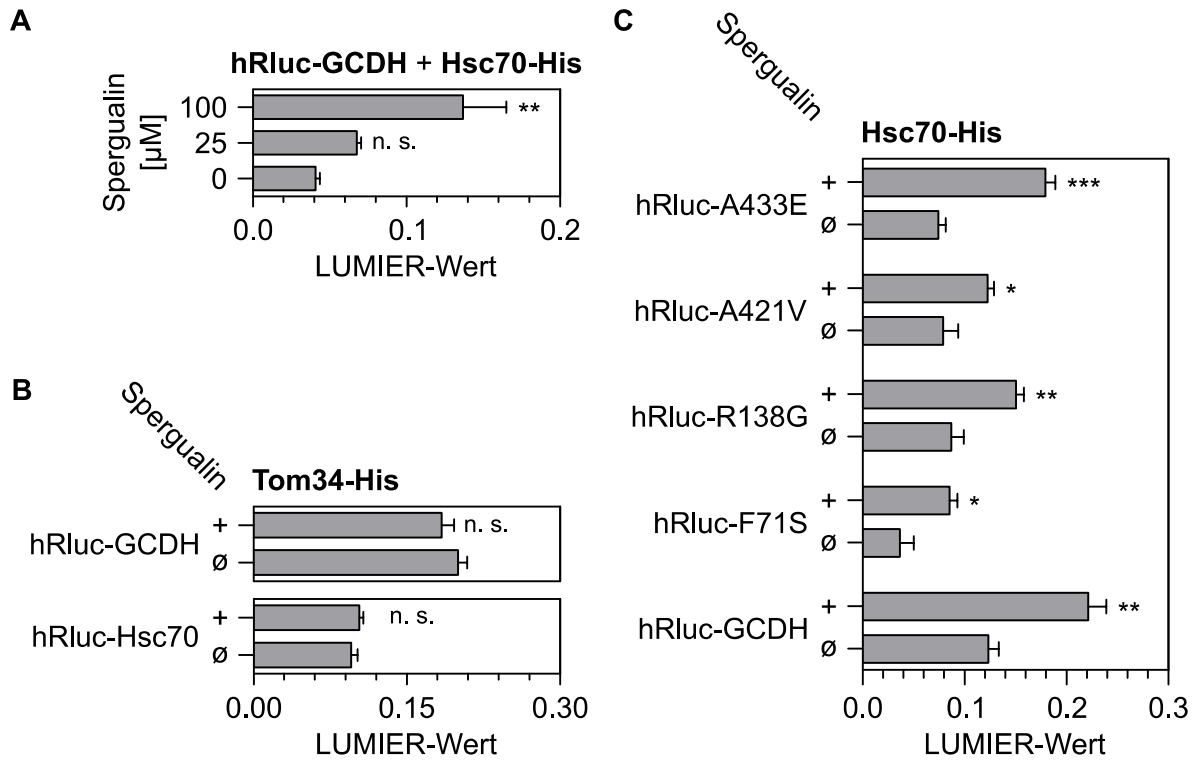


Abbildung 53: Quantitative Messung der Protein-Protein-Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His unter Spargualin. **A**, Mit zunehmenden Konzentrationen nahm der LUMIER-Wert zu. **B**, Die Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Tom34-His sowie hRluc-Hsc70 und Tom34-His war durch Spargualin nicht beeinflusst. **C**, Wie der Wildtyp zeigten auch variante Proteine der GCDH eine Zunahme des LUMIER-Wertes der Interaktion mit Hsc70 unter Spargualin (Mittelwerte \pm SEM; zweiseitiger, ungepaarter t-Test für $H_0: \mu_+ = \mu_\emptyset$: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**); n. s.: nicht signifikant; $n = 4$; +/ \emptyset : mit/ohne 100 μ M Spargualin)

4 Diskussion

Das Mitochondrium beherbergt zirka 1.200 Proteine [270, 271]. Lediglich 13 davon sind auf der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert und werden im Mitochondrium synthetisiert [272, 273]. Neben diesen Proteinen kodiert die mtDNA zusätzlich 2 ribosomale RNAs und 22 Transfer-RNAs [274, 275]. 99 % des mitochondrialen Proteoms sind nukleär kodiert [276]. Somit sind Mutationen in Bereichen der genomischen DNA, die für mitochondriale Proteine kodieren, mit einer weitaus größeren Anzahl an Erkrankungen assoziiert als Mutationen in der mtDNA (Abbildung 54) [8, 9]. Diese Mutationen betreffen am häufigsten mitochondriale Matrixproteine, da sich in diesem Kompartiment die meisten Proteine des Mitochondriums befinden (Abbildung 54). Derzeit sind rund 270.000 genetische Variationen des Menschen beschrieben [113]. Es ist jedoch nur wenig bekannt, welche klinische Auswirkungen diese genetischen Variationen haben, an welchen Prozessen der Pathogenese sie beteiligt sind und welche Rolle das Auftreten mehrerer verschiedener Variationen auf die Ausprägung des Phänotyps haben [12, 277].

Vorausgehende Arbeiten haben gezeigt, dass sich ein Drittel der krankheitsassoziierten Mutationen über eine Veränderung des Protein-Protein-Netzwerkes ausprägt [12]. Dabei zeigen letale Mutationen häufig eine schwerwiegende Veränderung der Protein-Protein-Interaktion [278]. Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke spielen eine zentrale Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen [279-282]. Die Kenntnis der Protein-Protein-Interaktion und der Veränderung jener kann klinische stumme Polymorphismen von krankheitsausprägenden Mutationen unterscheiden sowie die phänotypische Ausprägung eines Schweregrades erklären [283, 284]. Protein-Protein-Interaktionen können durch *nodes*, die jeweiligen Proteine, und *edges*, das jeweilige Verhältnis zwischen den beiden Proteinen, beschrieben werden. Demzufolge kann ein *edgotype*, die Kenntnis über die Veränderung eines Interaktionsnetzwerkes, ein wichtiger Schlüssel zum Verständnis der Genotyp-Phänotyp-Beziehung sein [12, 283, 285, 286].

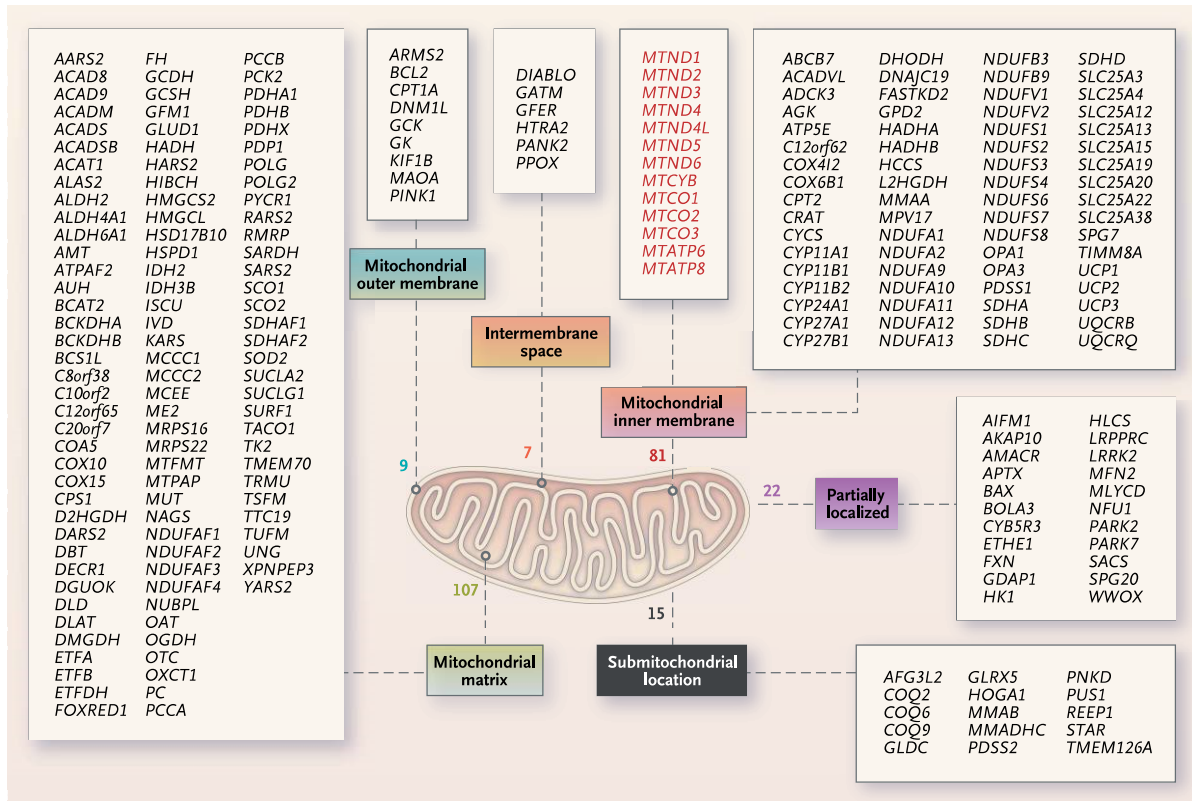


Abbildung 54: Monogenetische mitochondriale Erkrankungen. Gene, deren Mutationen zu monogenetischen mitochondrialen Erkrankungen führen können. Die Einteilung erfolgte nach Lokalisation des jeweiligen Proteins. Nukleär kodierte Gene sind schwarz, Gene der mtDNA rot (aus [8]).

Um Erkenntnisse über den Einfluss genetischer Variation auf den mitochondrialen Import und die Protein-Protein-Interaktionsnetzwerke zu gewinnen, wurden vorwiegend das nukleär kodierte mitochondriale Matrixprotein Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (GCDH), sowie ferner die *medium-chain-acyl-CoA dehydrogenase* (MCAD), Ornithin-Transcarbamoylase (OTC), *very-long-chain-acyl-CoA dehydrogenase* (VLCAD), Carbamoylphosphat-Synthetase I (CPS1) sowie die alpha-Untereinheit der 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase (BCKDHA) untersucht. Mutationen in Genen, die diese Proteine kodieren, können zu angeborenen Stoffwechseldefekten führen [72, 260, 261, 287-289].

4.1 Der mitochondriale Proteinimport

Es wurde die Hypothese überprüft, ob variante nukleär kodierte mitochondriale Matrixproteine einen veränderten Import verglichen zum Wildtyp aufweisen. Eukaryot exprimierte GCDH und MCAD zeigten ein variantenspezifisches Verhältnis der Mengen von *precursor* und maturem Protein. Beide Prozessierungsformen waren in der mitochondrialen Fraktion lokalisiert. *Precursor* waren sensitiv gegenüber proteolytischem Verdau und akkumulierten nach längerer Expressionszeit. Daraus wurde gefolgert, dass sich *precursor* an der äußeren Mitochondrienmembran befanden. Mature Proteine hingegen waren unempfindlich gegenüber proteolytischem Verdau. Es ist somit anzunehmen, dass sich diese

Proteine innerhalb des Mitochondriums, entweder im Intermembranraum oder der mitochondrialen Matrix, befanden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Effizienz des mitochondrialen Imports varianter nukleär kodierter mitochondrialer Proteine verringert ist. Da die Aminosäuresubstitutionen der untersuchten varianten Proteine nicht in der MTS lokalisiert waren, lässt sich des Weiteren annehmen, dass Strukturen neben der MTS für den mitochondrialen Import notwendig sind. Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen genetischer Variation und mitochondrialem Import zeigten Takakubo *et al.*, dass beim Pyruvat-Dehydrogenase-Mangel pathogene Mutationen innerhalb der N-terminalen MTS zu einem reduzierten mitochondrialen Proteinimport als Krankheitsursache führen können [290]. Bei der primären Hyperoxalurie Typ 1 führen Mutationen in der N-terminalen Sequenz des Enzyms L-Alanin:Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) zu einer Demaskierung einer in der Sequenz des Wildtyp-Proteins nicht aktiven MTS und damit zur Fehllokalisierung vom Peroxisom zum Mitochondrium [291]. Nicht nur organellspezifische Proteine, sondern auch cytosolische Proteine können hinsichtlich ihrer Lokalisation im Falle eines Aminosäureaustausches beeinträchtigt sein. DJ-1, das Produkt des *PARK7*-Gens, das häufig in Patienten mit familiärem Morbus Parkinson mutiert ist, ist im Cytosol lokalisiert. *PARK7*-Mutationen führen zu einer mitochondrialen Lokalisation des Proteins DJ-1, wobei hier eine eindeutige Abgrenzung, ob das Protein intra- oder extramitochondrial lokalisiert ist, fehlt [292]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mutationen in den membranständigen Importproteinen (TIM23) oder löslichen Chaperonen (Hsp60, DnaJC19) zu einer Reduktion der Leistung des mitochondrialen Imports führen können. Da letztere nicht einzelne zu importierende Proteine betrifft, sondern zu einem globalen Funktionsverlust führt, handelt es sich hierbei um Multisystemerkrankungen (dilatative Kardiomyopathie mit Ataxie, spastische Paraplegie 13, Mohr-Tranebjaerg-Syndrom, atypische Mitochondriopathie) [293-297]. Eine dritte Kategorie bilden Erkrankungen, bei denen der mitochondriale Import durch proteotoxische Mechanismen inhibiert ist. So ist variantes Huntingtin, als Wildtyp ein cytosolisches Protein, im Mitochondrium lokalisiert und an TIM23 gebunden, wodurch der mitochondriale Proteinimport (für andere Proteine) gestört wird [298]. Ähnliche Mechanismen sind für α -Synuklein beschrieben. α -Synuklein kann durch eine Bindung an Tom20 den mitochondrialen Import für unspezifische *precursors* inhibieren [299]. Yano *et al.* diskutieren, dass weitere neurodegenerative Erkrankungen mit einem Organellenimportdefekt assoziiert sein könnten [298]. Denn auch Erkrankungen, denen variante zu importierende Proteine zugrunde liegen, wie beispielsweise der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, Ornithin-Transcarbamoylase-Mangel oder MCAD-Mangel, zeigen klinisch häufig neurologische Defizite [66]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt varianter nukleär kodierter mitochondrialer Proteine auf den Import anderer Proteine nicht analysiert. Es wurde jedoch mittels Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtet, dass die Expression zweier Varianten der GCDH, GCDH-R88C und GCDH-A433E, mit einer veränderten mitochondrialen Struktur assoziiert war. Es ist denkbar, dass diese Varianten nicht nur zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels führen, sondern die Funktion des gesamten Mitochondriums einschränken. Somit bestünde eine Analogie zur Pathogenese der Mitochondriopathien [300]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass der mitochondriale Import als ein pathogenetisches Element von monogenetischen

Erkrankungen in Betracht gezogen werden kann, bei denen die Mutation weder in der Sequenz der MTS eines nukleär kodierten mitochondrialen Proteins noch mitochondrialer Importrezeptoren lokalisiert ist.

Was ist die Ursache des reduzierten mitochondrialen Imports varianter GCDH? Es konnte gezeigt werden, dass die Stabilität varianter *precursor* im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist und sich deshalb möglicherweise der Faltungszustand zwischen Wildtyp und Variante an der mitochondrialen Oberfläche unterscheidet. Des Weiteren konnte ein Bereich in der Tertiärstruktur der GCDH identifiziert werden, in dem sich Aminosäuresubstitutionen finden, die zu einem schwereren Importdefekt führen. David *et al.* haben gezeigt, dass Aminosäuresubstitutionen, die im hydrophoben Kern des Proteins liegen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit pathogen sind [301]. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten sowie den Beobachtungen von David *et al.* wird vermutet, dass neben der MTS weitere Strukturen des (teilgefalteten) Proteins notwendig sind, um erfolgreich von den mitochondrialen Importrezeptoren erkannt zu werden. Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass auch rekombinante GCDH ohne MTS an die Mitochondrienoberfläche band. Die *binding chain hypothesis* liefert ein Konzept zur Erklärung der Erkennung von *precursor* durch mitochondriale Translokasen [302]. Nach der *binding chain hypothesis* benötigen *precursor* drei physikalische Eigenschaften zur Initiierung des mitochondrialen Imports: Eine positiv geladene MTS (i), amphiphatische α -Helices (ii) sowie eine Flexibilität der Konformation, um einen Wechsel von gefalteter α -helikaler Struktur der MTS zur entfalteten Konformation, die für die eigentliche Translokation notwendig ist, zu gewährleisten (iii). Die ersten beiden Aspekte sind durch die Primärsequenz definiert: Die positive Ladung wird über die Ladungen der Seitenketten der Aminosäuren definiert, aus der die MTS aufgebaut ist. Ebenso ist die Ausbildung einer Sekundärstruktur wie der α -Helix abhängig von der Aminosäureabfolge der Primärsequenz bzw. lässt sich durch diese vorhersagen [303]. Es sind jedoch derzeit keine pathogenen GCDH-Varianten beschrieben, deren Aminosäuresubstitution in der MTS liegen [113]. Deshalb kann kein direkter Zusammenhang zwischen der *binding chain hypothesis* und des verringerten mitochondrialen Importes varianter Proteine bestehen. Es kann spekuliert werden, dass Mutationen in der Sequenz der MTS der GCDH, sofern diese auftreten, pränatal letal oder klinisch stumm sind. Treten Mutationen hingegen in der Sequenz der MTS nukleär kodierter mitochondrialer Proteine auf, so können sie durchaus den mitochondrialen Import beeinflussen. Bedwell *et al.* und Isaya *et al.* zeigten, dass Mutationen in der MTS der OTC und beta-Untereinheit der F1-ATPase, die beide wie die GCDH nukleär kodiert und mitochondrial lokalisiert sind, zu einem reduzierten oder aufgehobenen Import führen können [304, 305]. Die geforderte Faltungsdynamik, der dritte Punkt der von Pfanner *et al.* beschriebenen *binding chain hypothesis*, kann jedoch im Wechselspiel mit Anteilen des maturen Teils der GCDH geschehen [302]. Dies würde bedeuten, dass zwar die Sequenz der MTS nicht beeinträchtigt ist, jedoch deren Funktion durch die Interaktion mit Strukturen des Proteins außerhalb der MTS verändert werden kann. Es ist bekannt, dass *precursor* einen bestimmten Faltungszustand, entweder entfaltet oder partiell gefaltet, einhalten müssen, um die Importkompetenz aufrecht zu halten [306, 307]. Busquets *et al.* zeigten *in silico*, wie die Fehlfaltung der F71S-Variante der GCDH durch intramolekulare Wechselwirkungen bedingt sein kann. Der Austausch des

hydrophoben Phenylalanins durch das hydrophile Serin kann zu einer Destruktion der Salzbindung zwischen F71 und R72 sowie zwischen F71 und E129 führen. Dies könnte sich auf die globale Faltungsstruktur der GCDH auswirken [72]. Mutationsinduzierte Proteinfehlfaltung wurde des Weiteren für variante MCAD und SCAD beobachtet, die eine Strukturähnlichkeit zur GCDH aufweisen [158, 308, 309]. Daraus lässt sich ableiten, dass Strukturen, die in der Primärsequenz eines Proteins entfernt voneinander lokalisiert sind, durch intramolekulare Wechselwirkungen miteinander in Kontakt treten und somit an der Faltung des gesamten Proteins beteiligt sein können. Da der Faltungszustand der MTS eine wichtige Rolle beim mitochondrialen Proteinimport spielt, kann dieser durch die intramolekularen Wechselwirkungen möglicherweise moduliert werden. Im Falle der GCDH bedeutet das, dass Aminosäuresubstitutionen, die fern der MTS liegen, auch einen Einfluss auf die Struktur und damit auf die Funktion der MTS haben können. Dies kann eine Ursache sein für den in dieser Arbeit beobachteten reduzierten Import von *precursor*, deren Mutation in der Sequenz des muren Proteins liegt.

Die Rolle des Faltungszustandes von mitochondrialen *precursors* ist wenig untersucht. Einige Aspekte sprechen jedoch gegen eine vollständige Entfaltung des *precursors* beziehungsweise für das partielle Falten von Abschnitten der Primärsequenz. *Precursors* binden an molekulare Chaperone der Hsp90- und Hsp70-Familie. Diese können strukturelle Anteile, beziehungsweise partiell gefaltete Sequenzen, eines Substrates (hier: des *precursors*) erkennen und binden [310, 311]. Der Mechanismus der Bindung der Hsp70-Chaperone an deren Substrat ist nicht vollständig aufgeschlüsselt. Es ist bekannt, dass Hsp70-Substrate über hydrophobe Oligopeptidsequenzen (beispielsweise SVFPLAP und HTFPAVL) identifizieren [312]. Weiterhin wurde beobachtet, dass *precursors* einer Deletionsvariante der OTC über eine aufgehobene Bindung zu dem mitochondrialen NEM-sensitiven Importfaktor msF nicht mehr korrekt in das Mitochondrium importiert werden können [313, 314]. Konkret werden die Struktur-Funktions-Beziehung und Zweifel an der vollständigen Entfaltung des *precursors* vor der Translokation durch neue Erkenntnisse des mitochondrialen Importes. Kalef-Ezra *et al.* haben gezeigt, dass die MTS der humanen Glutamat-Dehydrogenase (hGDH), einem nukleär kodierten mitochondrialem Protein, aus zwei α -helikalen Strukturen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) besteht [315]. Beide Strukturen wirken synergistisch auf die Leistung des mitochondrialen Imports. Zwar sind beide Helices der hGDH Teil der (im Mitochondrium prozessierten) MTS, so zeigte diese Beobachtung jedoch, dass das Zusammenspiel von Sekundärstrukturen einen wesentlichen Einfluss auf die Funktionalität des mitochondrialen Importes nimmt und dass sich benachbarte Strukturen synergistisch beeinflussen können. Der N-Terminus (nach der MTS) der GCDH besteht aus einer hohen Dichte an α -Helices (Abbildung 55). Mutationen in diesem Bereich könnten zu einer Destruktion der Faltungsstruktur führen, sodass der von Kalef-Ezra *et al.* beschriebene Mechanismus der Interaktion von Sekundärstrukturen nahe der MTS als Ursache für eine reduzierte Importkompetenz in Erwägung gezogen werden kann.

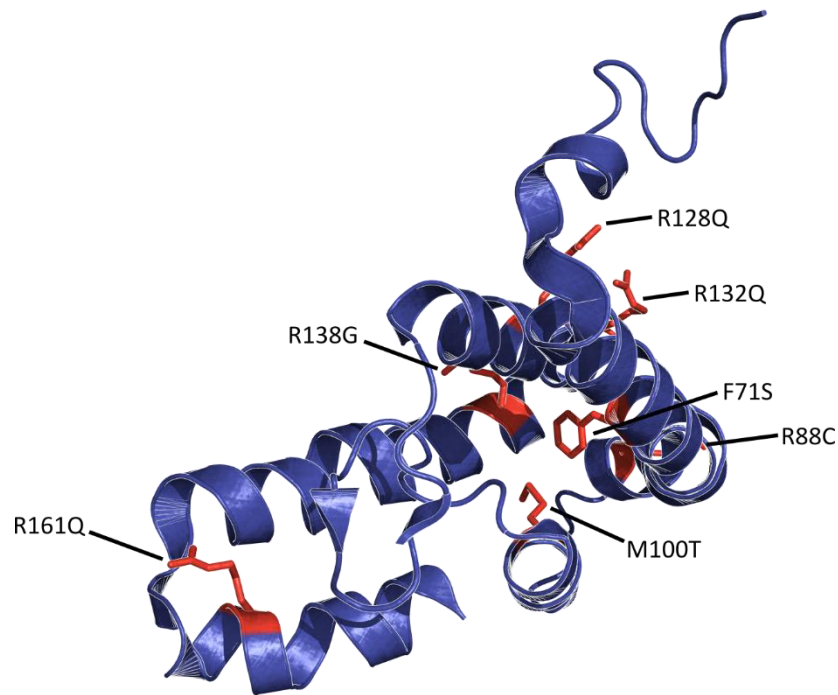


Abbildung 55: N-Terminus der GCDH. N-Terminus der GCDH. Die Aminosäuresubstitutionen pathogener Mutationen, die in dieser Arbeit analysiert wurden, wurden mit den jeweiligen Seitenketten dargestellt (aus [63], PDB ID: 1SIQ).

Andere Mutationen, die entweder in der N-terminalen α -Helix lokalisiert sind (R128Q, R132Q, R138G, R161Q) oder in der Primärstruktur fern dieser Domäne, jedoch in räumlichem Bezug über Wasserstoffbrücken stehen (R402W), zeigten im Western Blot eine vermehrte Proteinmenge des *precursors*, beziehungsweise eine Erhöhung des p/m-Quotienten. Ihnen ist gemeinsam, dass sie eine Aminosäure austauschen, die im Wildtyp auf die Tertiärstruktur stabilisierende Effekte auswirkt. Abbildung 56 zeigt exemplarisch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen R161 und Y113 eines gegenüberliegenden *loops*, E158 derselben Helix sowie *backbones* des Y153 und G156 einer gegenüberliegenden Helix. Es ist davon auszugehen, dass diese Bindungen durch den Austausch des Arginins gegen Glutamin verloren gehen, da nun zwei basische Aminogruppen des Arginins zur Bindung und transhelikalen Stabilisierung fehlen.

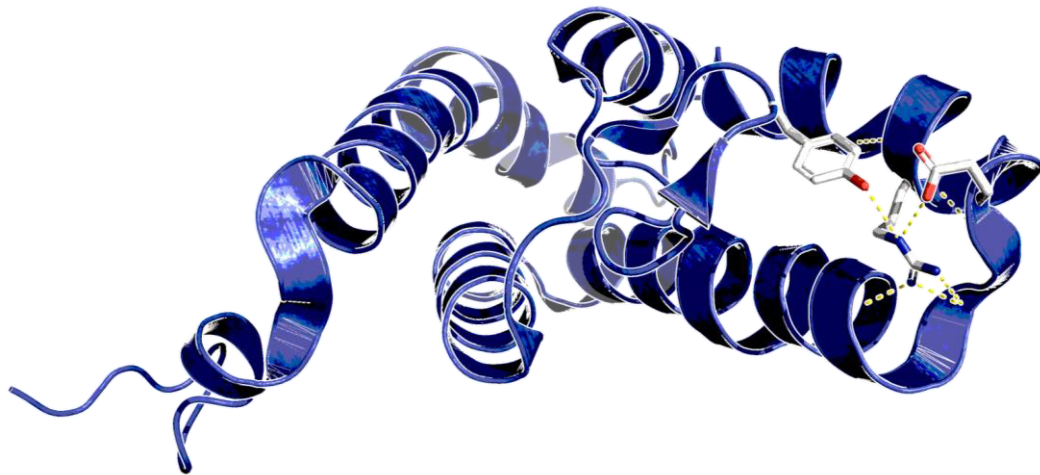


Abbildung 56: N-Terminus der GCDH mit R161. Ausschnitt aus der Kristallstruktur der GCDH. Wasserstoffbrückenbindung des Arginins an Position 161 (R161) zu benachbarten Strukturen wurde eingezeichnet (aus [63], PDB ID: 1SIQ).

Das dargelegte Konzept zeigt, wie der mitochondriale Import nukleär kodierter mitochondrialer Proteine beeinflusst werden kann. Es ist anzunehmen, dass durch MTS-ferne Mutationen die Flexibilität der MTS (wie sie in der *binding chain hypothesis* von Pfanner *et al.* vorgeschlagen wurde) verringert wird und damit der Import behindert wird. Diese Hypothese gilt es jedoch experimentell zu überprüfen.

4.2 Die Rolle des murenen Anteils nukleär kodierter mitochondrialer Proteine beim mitochondrialen Proteinimport

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, welchen Einfluss der mature Anteil der GCDH (GCDH_{MTS}) auf den mitochondrialen Import hat. Des Weiteren wurde überprüft, ob GCDH ohne MTS (GCDH_{ΔMTS}) mit cytosolischen Proteinen, die für den Import notwendig sind, interagieren kann. Sowohl GCDH_{MTS} als auch die Deletionsvariante GCDH_{ΔMTS} zeigten eine mitochondriale Lokalisation. Zudem waren die Interaktionen zwischen GCDH und den cytosolischen Proteinen Hsc70, Hsp90 und Tom34 mit und ohne MTS nachweisbar, wobei die MTS die Interaktion geringgradig verstärkte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mature Anteile in nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen den Import des Proteins beeinflussen können. Zahedi *et al.* zeigten, dass einige mitochondriale *precursors* neben Membranproteinen an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind [316]. Stan *et al.* und Yamamoto *et al.* zeigten, dass die Bindung an den TOM-Komplex *in vitro* und *in vivo* über mature Anteile der *precursors* vermittelt werden kann [317, 318]. Basierend auf den experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit wird angenommen, dass das *precursor* Protein partiell gefaltet vorliegt und mit dieser Konformation die Information für die Translokation in sich trägt [6]. Der vorgeschlagene Mechanismus zeigt, dass der mature Anteil nukleär kodierter mitochondrialer Proteine eine wesentliche Rolle beim mitochondrialen Import spielen kann und die weitere Entschlüsselung des Einflusses pathogener Mutationen in diesem Bereich auf den mitochondrialen Import

weitere Erkenntnisse zum Pathomechanismus der zugrundeliegenden genetischen Erkrankungen erlauben. Ferner öffnet diese Erkenntnis eine neue Perspektive auf das Verständnis des mitochondrialen Proteinimportes, indem sie dem Konzept widerspricht, *precursors* seien in einem löslichen Zustand im Cytosol [50, 319].

Dass Strukturen innerhalb des Proteins fern der MTS eine Rolle beim mitochondrialen Import spielen, wurde in anderem Zusammenhang berichtet. Mitochondriale Proteine des Intermembranraumes binden neben den MTS-erkennenden Rezeptoren Tom20 und Tom22 auch Tom70 [320]. Bedwell *et al.* zeigten, dass die Importkompetenz einer MTS-deletierten F₁-ATPase β erhalten bleibt. Es wurde angenommen, dass N-terminale Strukturen außerhalb der MTS und die MTS kooperativ beim Import agieren [321]. Diese Kooperation ist möglicherweise Ausdruck einer Interaktion zwischen hydrophoben Strukturen des maturen Proteins und der Membranpotentialdifferenz, die bedingende Voraussetzung für den mitochondrialen Import ist [30, 50]. Proteine der inneren Mitochondrienmembran ohne MTS zeigen ebenso einen mitochondrialen Import [322]. Dies lässt vermuten, dass neben N-terminalen Lokalisationssequenzen auch Strukturen innerhalb des Proteins dazu beitragen, dass nukleär kodierte mitochondriale Proteine von Translokasen erkannt und importiert werden. Dies ist ein relevantes Konzept für die in dieser Arbeit dargestellte Beobachtung, dass variante Proteine mit geringerer Effizienz in das Mitochondrium importiert werden. Jedoch wird diese Argumentation durch die Beobachtung, dass auch cytosolische Proteine, die eine (artifizielle) N-terminale MTS tragen, ins Mitochondrium lokalisieren, entkräftet [323-325]. Zusammenfassend wird gefolgert, dass der mature Anteil nukleär kodierter mitochondrialer Proteine den mitochondrialen Import initiieren kann, jedoch keine notwendige (strukturelle) Voraussetzung einer Translokation über die mitochondriale Doppelmembran darstellt. Es leitet sich hieraus die Hypothese ab, dass genetische Variationen im maturen Anteil nukleär kodierter mitochondrialer Proteine nicht erst beim eigentlichen mitochondrialen Import über die Kanäle des TOM- bzw. TIM-Komplexes, sondern bei der Interaktion mit cytosolischen Proteinen eine Rolle spielen.

4.3 Das cytosolische Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk nukleär kodierter mitochondrialer Proteine

Neben der dreidimensionalen Faltung eines Proteins, die ihm die (katalytische) Funktionalität verleiht, benötigt das Protein eine Quintärstruktur, die aus interagierenden Proteinen besteht. Die Quintärstruktur ermöglicht es einerseits, dass zelluläre Prozesse, an denen mehrere Proteine beteiligt sind, koordiniert ablaufen können und erhöht andererseits die Stabilität des Proteins [326]. Die interagierenden Proteine sind wesentlich daran beteiligt, die Protein-Homöostase, die sogenannte *proteostasis*, aufrecht zu erhalten. *Proteostasis* beschreibt das Wechselspiel von Klienten mit deren Chaperonen bei der Proteinsynthese und Degradation, bei der Erkennung und der Korrektur von Fehlfaltungen durch die *unfolded protein response* (UPR) sowie dem *trafficking* zum Erreichen der korrekten subzellulären Lokalisation. Das *proteostasis network* beschreibt die Gesamtheit der Protein-Protein-

Interaktionen, die gewährleisten, dass Proteinbiosynthese, Faltung, Transport und Degradation in Balance gehalten und auf individuelle zelluläre Umstände angepasst werden (Abbildung 57) [10, 327].

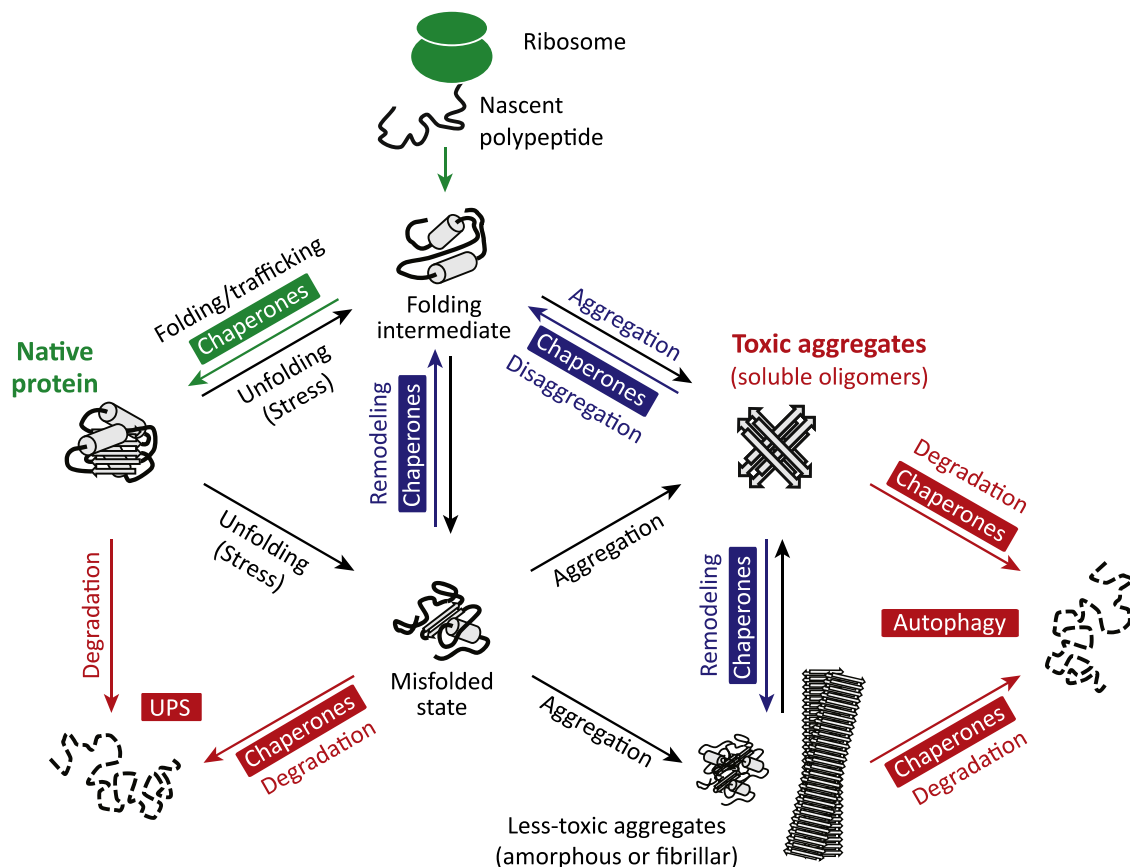


Abbildung 57: Proteostasis network. Um einen *native state* zu erreichen, muss das Protein mit molekularen Chaperonen interagieren (grün). Fehlfaltung wird ebenso von Chaperonen erkannt und korrigiert (blau). Gelingt dies nicht, wird das Protein abgebaut (rot). Das komplexe und dynamische Zusammenspiel der einzelnen Komponenten über Protein-Protein-Interaktionen definiert das *proteostasis network* (aus [328]).

Es ist bekannt, dass genetische Variationen das Protein-Interaktionsnetzwerk und damit die *proteostasis* stören können [10, 11]. Daraus leitete sich die Hypothese ab, dass Aminosäuresubstitutionen in nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen das Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk verändern und somit die Effizienz des mitochondrialen Importes beeinflussen können.

Ziel war es, durch die Identifikation der Interaktoren mitochondrialer *precursor* im Cytosol ein cytosolisches Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk nukleär kodierter mitochondrialer Proteine zu kartieren. In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob sich dieses Netzwerk zwischen varianten Proteinen und dem Wildtyp unterscheidet. Mittels SILAC-basierter *affinity purification coupled mass spectrometry* (AP-MS/MS) konnten Interaktoren der GCDH hypothesenfrei *in vitro* identifiziert werden (i). Mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) wurden die gefundenen Interaktoren bestätigt. Zudem wurde

hypothesenbasiert ein Netzwerk aus cytosolischen Chaperonen mit nukleär kodierten mitochondrialen Proteinen generiert (ii). Die Interaktionen zwischen dem Klienten und ausgewählten Interaktoren wurde quantitativ mit einem *luminescence-based mammalian interactome* (LUMIER) assay gemessen und Veränderungen durch variante Klienten sowie das Zusammenspiel von MTS mit maturen Anteilen des Proteins charakterisiert (iii). Die Methode der *affinity-purification coupled mass spectrometry* ist zur Identifikation von Interaktoren etabliert [123, 184, 222]. Zudem konnten Morgenstern *et al.* und Peikert *et al.* in einem methodisch ähnlichen Ansatz mittels quantitativer Massenspektrometrie das mitochondriale Proteom und Importom analysieren [329, 330]. Analog zu vorbeschriebener Methodik wurde das Interaktom für Wildtyp und R138G-GCDH charakterisiert. Die rekombinante Expression und Reinigung der GCDH mit MTS war nicht möglich. Anzunehmen ist, dass die MTS mitochondrialer *precursors* dem Protein Instabilität verleiht [56].

Zelluläre Mechanismen basieren in der Regel auf dem Zusammenspiel mehrerer Proteine, die mittels Protein-Protein-Interaktion Funktionen komplettieren und sogenannte molekulare Maschinen formieren [225]. Das Interaktom bezeichnet das Zusammenspiel aller Proteine [331]. Die mittels AP-MS/MS gemessenen Protein-Protein-Interaktionen müssen vom funktionellen Kontakt abgegrenzt werden. So teilen beispielsweise alle Proteine eine räumliche Nähe mit dem Ribosom, ohne dass dieses für deren Funktion notwendig sei [225]. Diese unspezifischen, scheinbaren Interaktoren der GCDH wurden durch die AP-MS/MS ko-präzipitiert und nach Identifikation der Peptide gefiltert. Um zwischen unspezifischen und spezifischen Interaktionen zu differenzieren, wurden funktionell relevante Proteine, die in der quantitativen Massenspektrometrie identifiziert wurden, in einem zweiten und dritten, methodisch unabhängigen Experiment als Interaktoren evaluiert. TCP-1, Hsc70, mtHsp70, Hsp60, Hsp70, Hsp90 und GRP-78 zeigten eine Anreicherung an den gefalteten Wildtyp der GCDH. GRP-78 ist die das molekulare Chaperon der Hsp70-Familie des endoplasmatischen Retikulums [332]. Es ist somit nicht anzunehmen, dass GCDH mit GRP-78 *in vivo* interagiert. Jedoch zeigt diese Beobachtung, dass GCDH eine Affinität zu molekularen Chaperonen der Hsp70-Familie zeigt.

Hsc70 war das einzige dieser Proteine, das signifikant angereichert wurde. R138G-GCDH zeigte für alle Chaperone geringfügig kleinere SILAC-Werte, die sich jedoch nicht signifikant von der Anreicherung am Wildtyp unterschieden. Entfaltete GCDH zeigte keine Interaktion zu TCP-1, Hsp70 und GRP-78, die anderen molekularen Chaperone waren jedoch, gemessen am SILAC-Wert, vermehrt akkumuliert. Bei der entfalteten R138G-GCDH waren die Chaperone, mit Ausnahme des Hsp60, verglichen zum Wildtyp und dem gefalteten Konformation des Proteins vermehrt angereichert. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass eine Entfaltung, beziehungsweise das kotranslationale, noch nicht gefaltete, heranwachsende Polypeptid, die Interaktion des maturen Anteil des Klienten mit molekularen Chaperonen begünstigt. Dies ist im Einklang mit der von Terada *et al.* beschriebenen Beobachtung, dass Hsc70 die Importkompetenz eines komplett gefalteten nukleär kodierten mitochondrialen Proteins nicht wiederherstellen kann [36]. Es ist naheliegend, dass die biosynthetisch frühe Bindung ein wichtiger Schritt zur Aufrechterhaltung eines Import-kompetenten Zustandes des Klienten ist und sich hier Unterschiede von Wildtyp und variantem Protein zeigen. Diese

Hypothese konnte jedoch nicht mittels AP-MS/MS und rekombinanter GCDH getestet werden. Die mittels AP-MS/MS identifizierten Proteine wurden in folgenden Experimenten mit anderen Methoden hinsichtlich ihrer Interaktion mit GCDH getestet und die Interaktion quantitativ gemessen.

Die Bindungen der GCDH mit Hsc70 und Hsp90 konnten mit BRET verifiziert werden. In einem hypothesenbasierten Ansatz wurden GCDH und weitere nukleär kodierte mitochondriale Proteine auf Interaktion mit einer Bibliothek cytosolischer molekularer Chaperone, Translokatoren sowie Ko-Chaperonen getestet, sodass ein cytosolisches Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk nukleär kodierter mitochondrialer Proteine charakterisiert werden konnte. Bei den gemessenen Interaktionen dieses Netzwerkes handelt es sich um Chaperon-Klient-Interaktionen mit dem *precursor* des mitochondrialen Proteins im Gegensatz zur vorausgehenden AP-MS/MS. Die Proteine GCDH, MCAD, VLCAD, drei Vertreter der mitochondrialen Acyl-CoA-Dehydrogenasen, sowie OTC und CPS1, die jeweils anderen Enzymfamilien angehören und sich strukturell von den Acyl-CoA-Dehydrogenasen unterscheiden, zeigten die gleiche Zusammensetzung des cytosolischen Protein-Protein-Interaktionsnetzwerkes. Lediglich BCKDHA unterschied sich geringfügig hinsichtlich der Zusammensetzung des Interaktionsnetzwerkes. Die Interaktion zu VCP konnte für BCKDHA experimentell nicht sicher bestätigt werden, dafür wurde im Gegensatz zu den anderen getesteten Proteinen eine Interaktion zu ClpB gefunden. Es ist bekannt, dass ClpB als Chaperon der Familie der AAA+ ATPasen (*ATPase associated with diverse cellular activities*) zur Erkennung von fehlgefalteten Proteinen agiert. Fehlgefaltete oder aggregierte Proteine können durch ClpB resolubilisiert werden. Somit nimmt das Chaperon eine tragende Rolle in der *protein quality control* ein [333, 334]. BCKDHA ist eine Untereinheit des Multienzymkomplexes BCKD (*branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex*) [335]. Es ist möglich, dass die Untereinheit in Monoexpression eine größere Instabilität aufweist als komplexiert, was sekundär zu einer messbaren Interaktion mit ClpB führt, die das Protein als Aggregat erkennt. Die Interaktionen zwischen den Ko-Chaperonen BAG1, BAG3, BAG4, BAG5, DnaJB1 (Hsp40) und DnaJC2 und den Chaperonen der Hsp70-Familie sind aus der Literatur bekannt und konnten mittels BRET bestätigt werden [248-255]. Es wurde in diesem experimentellen Ansatz nicht zwischen Hsc70 und Hsp70 differenziert. Bei Hsp70 handelt es sich um die durch (Hitze-) Stress induzierte, bei Hsc70 um die konstitutiv exprimierte Isoform [3]. Die Interaktion zwischen GCDH und den Ko-Chaperonen zeigte mit Ausnahme von DnaJC2 eine geringere BRET *ratio*. Dies kann Ausdruck einer indirekten, durch Hsc70- oder Hsp70-vermittelten Interaktion sein, wenngleich die Diskrimination zwischen direkter und indirekter Interaktion mit diesem Verfahren nicht möglich ist [336]. Eine andere Möglichkeit, die die geringere BRET *ratio* erklären kann, ist der Einfluss der räumlichen Anordnung des Venus- oder hRluc-Proteins, die die Höhe der BRET *ratio* oder die Protein-Protein-Interaktion selbst beeinflussen kann [230]. Das VCP ist Teil der ERAD (*endoplasmic-reticulum-associated degradation*) und führt nach cytosolischer Re-Lokalisation fehlgefaltete ER-Proteine dem Proteasom zu [337]. Zudem ist VCP in weitere zelluläre Prozesse wie Transkriptionskontrolle, ER-Golgi-Fusion, Apoptose und Ribosom- und Mitochondrien-assoziierte Proteindegradation involviert [338, 339]. Die Interaktion von VCP zu den getesteten mitochondrialen Proteinen

kann unspezifisch sein, da nur der Wildtyp als Klient geprüft wurde, oder Ausdruck einer Mitwirkung des VCP an der Proteostase der Proteine sein. Die Überexpression der Klienten könnte zu einer kontinuierlich erhöhten, VCP-vermittelten Proteindegradation führen. Das Mikronetzwerk der Interaktionen von Hsc70, Hsp90 und Tom34 mit einem mitochondrialen *precursor* ist ebenfalls vorbeschrieben und von mechanistischer Bedeutung für den Import ins Mitochondrium. Neben Hsc70, Hsp90 und Tom34 sind weitere Proteine am Import beteiligt, die jedoch in diesem Zusammenhang nicht untersucht wurden (*targeting factor*, *presequence binding factor*, *mitochondrial import stimulation factor* und Ko-Chaperone der Hsp40-Familie) [37, 314, 340-342]. Des Weiteren spielen Hsp90-Ko-Chaperone (*nucleotide exchange factor* sowie p23 und Aha1) eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Chaperon-Aktivität [3]. Im LUMIER assay wurden die Bindungen zwischen Wildtyp und varianter GCDH und Hsc70, Hsp90 und Tom34 quantitativ bestimmt. Die Methode ist geeignet, um Chaperon-Klient-Interaktionen quantitativ darzustellen und Veränderungen durch äußere oder intrinsische Effektoren zu messen [233, 235]. Es zeigte sich, dass Mutationen, die im maturen Anteil der GCDH lokalisiert sind, eine Verminderung der Interaktion mit Hsc70 und eine Auflösung der Interaktionen mit Hsp90 und Tom34 induzieren. Die Stärke des Interaktionsverlustes gegenüber Hsc70 korrelierte mit dem Ausmaß des Importdefektes (gemessen anhand des p/m-Quotienten). Dies erlaubt den Zusammenhang zwischen mutationsinduzierter Reduktion oder Verlust der Interaktion mit cytosolischen Chaperonen und dem reduzierten mitochondrialen Import.

Die Funktion des Hsc70-Hsp90-Tom34-Komplexes wird im Wesentlichen bestimmt durch ein frühes Binden an das neu synthetisierte und ungefaltete Polypeptid, um *precursor für den Tom70-vermittelten Proteinimport vorzubereiten* [3]. Analog zum Effekt des Aminosäureaustauschs im Klienten, der, wie zuvor gezeigt, zu einer veränderten Faltungskinetik und zu einem veränderten Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk führen kann, kann der Verlust der Interaktion mit dem Hsc70-Hsp90-Tom34-Komplex wiederum zwei Auswirkungen auf den mitochondrialen Import haben: Der Chaperon-Komplex beherbergt einerseits die Aufgabe, die Proteinfaltung zu verhindern und die Aggregation zu vermeiden [4, 122]. Andererseits kommuniziert er mit den Translokatoren des mitochondrialen Imports. Nach beziehungsweise während der Proteinbiosynthese an freien Ribosomen am Cytosol verharret das Polypeptid in einem partiell gefalteten oder ungefalteten Zustand [343-345]. Dies ist Voraussetzung für die mitochondriale Proteintranslokation, da aufgrund einer Porengröße von zirka 20 Å des Fassproteins Tom40 *precursors* in ungefaltetem oder partiell gefaltetem Zustand transloziert werden [302, 346-348]. Des Weiteren gewährleistet die Interaktion des Klienten mit Hsc70 die Assoziation des cytosolischen Importkomplexes an das *tetratricopeptide-repeat*-(TPR)-Motiv des Tom70 [4]. Faou *et al.* zeigten, dass Tom34 als Ko-Chaperon zu Hsc70 und Hsp90 durch seine ATPase-Funktion die beiden Chaperone regulieren und inhibieren kann. Ebenso ist eine direkte Bindung zwischen Tom34 und dem mitochondrialen *precursor* möglich [49]. Diese konnte auch in der vorliegenden Arbeit experimentell nachgewiesen werden.

Ein Zusammenhang zwischen dem in dieser Arbeit beobachteten reduzierten mitochondrialen Import und dem Verlust oder der Abschwächung der Interaktion zwischen

varianter GCDH und cytosolischen Proteinen ist möglich. Terada *et al.* zeigten, dass ohne die Bindung der molekularen Chaperone Hsp70 ein mitochondrialer Proteinimport nicht möglich ist [36]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von Hsc70 zu einer Anreicherung von *precursors* in der cytosolischen Fraktion assoziiert ist [6, 35]. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass variante pGCDH an der äußeren Mitochondrienmembran akkumuliert und gleichzeitig eine reduzierte Interaktionsstärke zu Hsc70 zeigt. Diese Ergebnisse lassen aufgrund der vorbeschriebenen Beobachtungen einen Zusammenhang vermuten. Es ist möglich, dass die MTS die Faltungskinetik der zu importierenden Proteine verlangsamt, was die Bindung an Hsp70 erlaubt [38]. Dieser Mechanismus scheint auch eine tragende Rolle bei der Diskrimination der Lokalisation bei Isoenzymen als Klienten, die sich strukturell lediglich im N-Terminus unterscheiden, zu sein [38]. Zur Unterstützung dieses entfaltenden Mechanismus finden sich Hsp70-Moleküle an der mitochondrialen Oberfläche [37, 349, 350]. Es ist demnach denkbar, dass variante GCDH durch intramolekulare Wechselwirkungen, wie sie in Kapitel 4.2 aufgezeigt wurden, die Faltungsdynamik beschleunigt und somit die Hsp70-Bindung nicht mehr möglich ist. Ebenso könnte ein biogenetisch frühes aggregieren der varianten GCDH eine Bindung von Hsp70 und somit einen mitochondrialen Import verhindern. Es ist jedoch wenig bekannt über die spezifische Funktion des Hsc70 beim mitochondrialen Proteinimport. Terada *et al.* zeigten, dass Hsc70 notwendig ist, um Ornithin-Transcarbamoylase (OTC) in isolierte Hefemitochondrien zu importieren [351]. Die Bindung und der mitochondriale Import waren mit abnehmender Länge von verschiedenen OTC-Konstrukten, die sich aus unterschiedlich langen Anteilen des maturen Proteins und einer gleichbleibend langen MTS zusammensetzten, reduziert. Dies impliziert, dass Hsc70 an hydrophobe, partiell gefaltete Strukturen bindet und nicht nur mit der MTS interagiert. Das längste Konstrukt der OTC maß 345 Aminosäuren; die GCDH hat eine Länge von 438 Aminosäuren bei einer molaren Masse von 43,3 kDa, somit sind theoretische Voraussetzungen gemessen an der aufgezeigten Beobachtung einer Interaktion aufgrund der ausreichenden Länge der GCDH gegeben. Respektive zu den vorausgehend beschriebenen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit im LUMIER assay die kooperative Funktion der MTS gezeigt werden: Die Bindung der *precursor* GCDH mit Hsc70, Hsp90 und Tom34 war stärker als zum maturen Protein ohne MTS.

Die Veränderung der Bindung zwischen Hsc70 und GCDH kann räumlich und zeitlich beeinflusst sein. Durch Mutationen in maturen Anteilen der GCDH, wie F71S oder R138G, kann die Tertiärstruktur direkt oder indirekt verändert werden, die für die Bindung an Hsc70 notwendig ist. Der Mechanismus der Substraterkennung eines Chaperons ist nicht abschließend verstanden [352]. Die Untersuchung varianter Substratproteine, wie hier am Beispiel der GCDH, kann demnach wertvolle Einblicke in diesen Mechanismus liefern. *In silico* Analysen von Busquets *et al.* haben gezeigt, dass Mutationen im N-Terminus maßgeblich die Bildung der helikalen Strukturen der GCDH stören können [72]. Durch die ausgetauschten Aminosäuren werden Ladungen verändert und durch eine potentielle Strukturveränderung der Proteinoberfläche können die Bindungen zu anderen Proteinen gestört werden. Interessanterweise zeigte sich in der quantitativen Massenspektrometrie eine verstärkte Interaktion zwischen Hsc70 und entfalteter GCDH verglichen zur Interaktion mit gefaltetem

Substrat. Daraus wird gefolgert, dass Substraterkennungssequenzen exponiert werden müssen, um eine Erkennung durch molekulare Chaperone zu gewährleisten. Diese Strukturen können durch Aminosäureaustausche derart verändert sein, dass die Erkennung aufgrund einer veränderten Sequenz nicht mehr möglich ist oder die Faltungsdynamik zu Ungunsten der Exposition der Erkennungsdomäne modifiziert ist. Neben diesem räumlichen Aspekt der Verhinderung der Bindung von Hsp70 zu varianter GCDH ist ebenso denkbar, dass variante GCDH durch rasche Spontanfaltung, Fehlfaltung oder Aggregation schneller einen energetisch günstigeren Zustand erreicht. Dies hat zur Folge, dass hydrophobe Strukturen und Erkennungssequenzen für die Bindung molekularer Chaperone nur kurz exponiert werden, sodass eine Bindung unwahrscheinlich wird.

Die Abhängigkeit des mitochondrialen Proteinimports von Hsc70 wird einerseits durch die Korrelation zwischen Importeffizienz und Hsc70-Bindung des Klienten GCDH, andererseits durch die Abnahme der Importeffizienz unter dem Hsc70-Modulator Spergualin, wie in dieser Arbeit beobachtet, deutlich. Spergualin wurde primär als antineoplastische Substanz erwogen, später wurde Hsc70 als pharmakodynamische Zielstruktur identifiziert [267]. Es wurde gezeigt, dass Hsc70 am Transport anderer, nicht-mitochondrialer Proteine beteiligt ist und Spergualin diesen Mechanismus blockieren kann. Iftinca *et al.* zeigten, dass der Transport des Calciumkanals *transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channel* von Hsc70 abhängt und durch die Blockade der Hsc70-Aktivität (durch Spergualin) gestört werden kann [269]. Die Lokalisation von nukleär kodierten Proteinen in den Apicoplasten von *Plasmodium falciparum* kann ebenso durch Spergualin inhibiert werden [353]. Es wurde gezeigt, dass Spergualin an das C-terminale EEVD-Motiv von Hsc70 bindet und Hsc70 entweder inhibiert oder aktivieren kann [263, 268]. Ob die Hsc70-Interaktion mit dessen Klienten unter Spergualin verstärkt oder abgeschwächt wird, wird bis dato kontrovers beschrieben, dies ist eventuell auf eine unterschiedliche Substratspezifität zurückzuführen [354-356]. Die Beobachtungen dieser Arbeit suggerieren, dass Spergualin inhibitorisch auf die (ATPase-) Aktivität des Hsc70 wirkt und dadurch das *release* des Substrats, im vorliegenden Fall der GCDH, verhindert wird, sodass der Import der GCDH verringert wird. Das bedeutet, dass sowohl ein Nichtbinden als auch ein zu langes Binden des Hsc70 an GCDH den mitochondrialen Import verhindern könnte. Im ersten Fall faltet sich GCDH rasch, sodass die Importkompetenz verloren geht, im zweiten Fall findet keine Übergabe des *precursors* von den löslichen cytosolischen Chaperonen Hsc70, Hsp90 und Tom34 an die mitochondrialen Importrezeptoren statt. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die Interaktion zwischen Hsc70 und GCDH Wildtyp und Varianten spezifisch für jede Variante war. Alle GCDH-Varianten zeigten mit Spergualin eine Zunahme der Interaktion zu Hsc70. Da jedoch kein variantenspezifischer Effekt beobachtet wurde, wird vermutet, dass die Chaperon-Klient-Bindung von dem Faltungszustand des Klienten abhängt und nicht vom ATP-abhängigen Chaperon-Mechanismus. Eine weitere Annahme, die sich aus dieser Beobachtung ableiten lässt, jedoch weitere experimentelle Evidenz bedarf, stellt die Affinität des Hsc70 zu varianten, fehlgefalteten Klienten in den Vordergrund. Es wäre möglich, dass Hsc70 fehlgefaltete Proteine nicht aktiv bindet und deren Faltung korrigiert, beziehungsweise deren Aggregation verhindert, sondern der Bindungsmechanismus vom Klienten abhängt, also der Klient sein

Chaperon erkennt. Hsc70 ist der konstitutiv exprimierte Isotyp der Hsp70-Familie, von welchem Stress-induzierte Proteine (Hsp70) abgegrenzt werden müssen. Es ist denkbar, dass jene eine andere Affinität gegenüber Wildtyp- und varianten Klienten besitzen und somit eine *unfolded protein response* vermitteln können, wohingegen Hsc70 für balancierte zelluläre Funktionen (Synthese und Faltung neuer Proteine, *trafficking* und Instandhaltung des *native states*) zuständig sein könnte. Die Hypothese, dass Hsc70 und Hsp70 unterschiedliche Funktionen beherbergen, wird von Beobachtungen in *Saccharomyces cerevisiae* und *rescue*-Experimenten in *Xenopus*-Oozyten gestützt [357, 358].

Es kann des Weiteren spekuliert werden, dass die schwächere Interaktion zu Hsc70 ein internaler *rescue*-Mechanismus der varianten Proteine darstellt. Die Dissoziation von Hsc70 gewährleistet, dass fehlgefaltete Proteine nicht von Hsc70 und anderen molekularen Chaperonen gefangen gehalten werden und somit eine Resttranslokation und Restaktivität des Proteins aufrecht gehalten wird. Nach Beobachtungen von Meacham *et al.* eines Hsc70-abhängigen Transportmechanismus beim CFTR-Kanal wird eine duale Funktion des Hsc70 respektive des Klienten deutlich. Interessanterweise hängt auch der Transport an die Plasmamembran, beziehungsweise in das endoplasmatische Retikulum, des CFTR-Kanals von Hsc70 ab [359]. Fuller *et al.* zeigten, dass eine stärkere Interaktion zwischen Hsc70 und variantem CFTR zu einer schnelleren ubiquitinabhängigen Degradation des Proteins führt [360]. Eine Reduktion der Hsc70-Expression durch das pharmakologische Chaperon Natriumphanylbutyrat führte hingegen zu einer partiellen Wiederherstellung des Transportes der $\Delta F508$ -Variante an die Zelloberfläche [262, 361]. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass der Import der GCDH nicht durch die Hinzugabe von Natriumphanylbutyrat beeinflusst war. Im Gegensatz zum CFTR-Kanal zeigte stabile GCDH eine stärkere Interaktion zu Hsc70 als deren (instabile) Varianten. Somit muss klar differenziert werden zwischen Transport- und Degradationsmechanismen, die Hsc70 involvieren. Ausschlaggebend welcher Weg beschritten wird scheint nach diesen Erkenntnissen die Lokalisation und Struktur des Klienten zu sein, wobei weitere experimentelle Evidenz diesen Aspekt beleuchten muss.

Auch Hsp90 verfügt, wie Hsc70, über zwei Funktionen, die für den korrekten mitochondrialen Import eines Klienten unerlässlich sind. Hsp90 und Hsc70 können über ein gemeinsames Ko-Chaperon Sti1/Hop interagieren [41]. Als molekulares Chaperon verhindert Hsp90 die Faltung des Klienten und gewährleistet somit, dass das Protein in das Mitochondrium importiert werden kann. Zusätzlich bindet auch Hsp90 an das TPR-Motiv von Tom70 und vermittelt somit die direkte Übergabe des Klienten von cytosolischen Mechanismen zum Translokations-Komplex des Mitochondriums [5, 362, 363].

Neben diesen beiden Funktionen, die dem Hsc70 gleich sind, gewähren Beobachtungen von Fan *et al.* neue Erkenntnisse in den Hsp90-vermittelten Translokationsmechanismus nukleär kodierter mitochondrialer Proteine. Eine Inhibition der Hsp90-Funktion verhinderte die Bildung von Translokationsintermediaten. Dies lässt vermuten, dass Hsp90 nicht nur in dem cytosolischen *trafficking* der *precursors*, sondern auch beim Translokationsmechanismus an sich eine tragende Rolle spielt [2]. Demzufolge ist eine reduzierte Interaktion zwischen GCDH und Hsp90, wie sie im LUMIER assay gemessen wurde, ebenfalls mit dem Verlust des

Importes *per se* und nicht nur mit einem Defekt während des cytosolischen Proteinsortiervorganges, zeitlich vor der eigentlichen Translokation, vereinbar. Ob die Faltungs- oder die Übergabekomponente an die mitochondrialen Importrezeptoren überwiegt, beziehungsweise ein varianter Klient nur eine oder beide Komponenten beeinflussen kann oder gar beide Mechanismen simultan wirken, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht erklären.

Tom34 wird nicht als klassischer Translokator des mitochondrialen Imports beschrieben. Im Gegensatz zu Tom70, Tom20 und Tom22 ist Tom34 am ehesten als löslicher Faktor im Cytosol lokalisiert. Dies geht aus der in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie hervor und ist mit den Beobachtungen von Mukhopadhyay *et al.* vereinbar [364]. Im Gegensatz dazu zeigten Nuttall *et al.* eine mitochondriale Lokalisation [365]. Es wird demnach eine duale Lokalisation im Cytosol und an der mitochondrialen Außenmembran diskutiert. Es wurde gezeigt, dass Tom34 im Cytosol als Ko-Chaperon von Hsc70 und Hsp90 agiert [49]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit mittels dem durch BRET charakterisierten Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk verifiziert werden. Es ist bisher allerdings nicht eindeutig gezeigt, ob Tom34 über eine Chaperon-Aktivität verfügt und somit die zu transportierenden *precursors* in einem ungefalteten Zustand halten kann [364, 366]. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Wildtyp-GCDH sowie weitere *precursors* nukleär kodierter mitochondrialer Proteine mit Tom34 interagieren. Variante GCDH mit einem Aminosäureaustausch im maturen Anteil konnte die Interaktion aufheben. Chewawiwat *et al.* zeigten, dass, ähnlich wie Hsc70 und Hsp90, Tom34 für den mitochondrialen Import unerlässlich ist [367]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Tom34 mit maturen Strukturen der *precursors* interagiert, was das Protein zu einem interessanten Kandidaten für die Ursache des Importdefektes varianter Proteine werden lässt. Dies war Grundlage der quantitativen Analyse der Interaktion mittels LUMIER assay [364]. Des Weiteren ist Tom34 ein bekannter Interaktor mit VCP [368]. Diese Interaktion konnte in der vorliegenden Arbeit mittels BRET verifiziert werden. Somit könnte Tom34 neben der Translokation auch proteostatische Mechanismen, vermittelt über VCP, gewährleisten und beispielsweise die Signaltransduktion bei der *unfolded protein response* mit anderen Faktoren vermitteln. Analog zu Tom34 diskutierten Jubb *et al.*, dass durch die reduzierte Stabilität von varianter OTC beim OTC-Mangel eine veränderte Bindung zu Tom20 eine mögliche Ursache für einen verringerten mitochondrialen Import sein kann [282]. Das zeigt, dass das Prinzip der mutationsinduzierten Veränderung des Interaktionsnetzwerkes, des sogenannten *edotypes*, ein relevanter Baustein im Pathomechanismus von monogenetischen Erkrankungen darstellen kann.

Von den drei quantifizierten Chaperon-Klient-Interaktionen zeigte lediglich die abgeschwächte Hsc70-Interaktion eine Korrelation mit dem Importdefekt. Es ist deshalb anzunehmen, dass Hsc70 eine Rolle in der molekularen Pathogenese des Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangels spielt. Ob sich der Verlust der Interaktionen zu Hsp90 und Tom34 nun primär auf räumliche Effekte gründet oder Ausdruck eines Sekundärphänomens ist, bei dem durch den Verlust der Interaktion mit Hsc70 indirekt die Hsp90- und Tom34-Interaktion reduziert werden, ist mit den in dieser Arbeit gewonnenen Beobachtungen nicht abschließend zu klären. Dennoch binden alle drei Proteine am maturen Teil des Klienten, der bei den

Varianten verändert ist und somit die Voraussetzung für ein verändertes Bindungsverhalten erfüllt. Die Diskrepanz zwischen primären und sekundären Effekten in der Störung des Interaktionsnetzwerkes und eine klare Definition von Ursache und Wirkung können wichtig für die Entwicklung einer neuen Pharmakotherapie mit *pharmacological chaperones* oder *proteostasis regulators* sein [369]. Aufgrund des methodischen Vorgehens kann jedoch angenommen werden, dass die Interaktionsverluste direkt vermittelt werden: Im LUMIER assay wurde die Interaktion zweier Proteine getestet, die überexprimiert wurden. Die quantitative Dimension der Messung der Interaktion dieser Methode gründet sich primär auf Stöchiometrie. Als abhängige Variable diente die Menge an präzipitiertem Protein. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der Überexpression lediglich die beiden zu untersuchenden Proteinen in stöchiometrisch relevantem Verhältnis vorkommen und andere, endogen exprimierte Proteine in zu geringer Menge vorhanden sind, als dass diese die Interaktion stabilisieren könnten. Demzufolge könnte die gemessene Interaktion lediglich auf das Verhalten zwischen den überexprimierten Proteinen zueinander zurückzuführen sein. Hier bedarf es jedoch weiterer experimenteller Evidenz. Eine dreifache Expression mit Detektion zweier Interaktionspartnern mit unterschiedlichen Fusionspartnern im LUMIER assay kann Aufschlüsse hinsichtlich dieser Fragestellung geben [236].

Auf Basis der Beobachtung, dass variante Proteine nicht in das Mitochondrium importiert werden und dabei die Protein-Protein-Interaktion zwischen Hsc70, Hsp90, Tom34 und deren Klienten gestört ist, wird hier das Zusammenspiel der Faltungskinetik mit sekundärem Verlust der Protein-Protein-Interaktion zwischen zu importierenden Proteinen und molekularen Chaperonen als möglicher weiterer Faktor der Pathogenese von monogenetischen Erkrankungen mit Mutationen im Gen nukleär kodierter mitochondrialer Proteine vorgeschlagen (Abbildung 58). Ob die reduzierte Interaktion des Klienten mit Hsc70, Hsp90 und Tom34 und der Importdefekt in kausalem Zusammenhang stehen, konnte mit den experimentellen Daten dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Ursächlich für den Importdefekt kann einerseits die rasche Faltung beziehungsweise Aggregation und Degradation des Proteins sein, die ebenso eine Bindung mit Hsc70, Hsp90 und Tom34 schwächt, da weniger hydrophobe Anteile exponiert werden, andererseits kann der Aminosäureaustausch zu einer veränderten Ladung führen, was eine Interaktion mit anderen Proteinen erschwert.

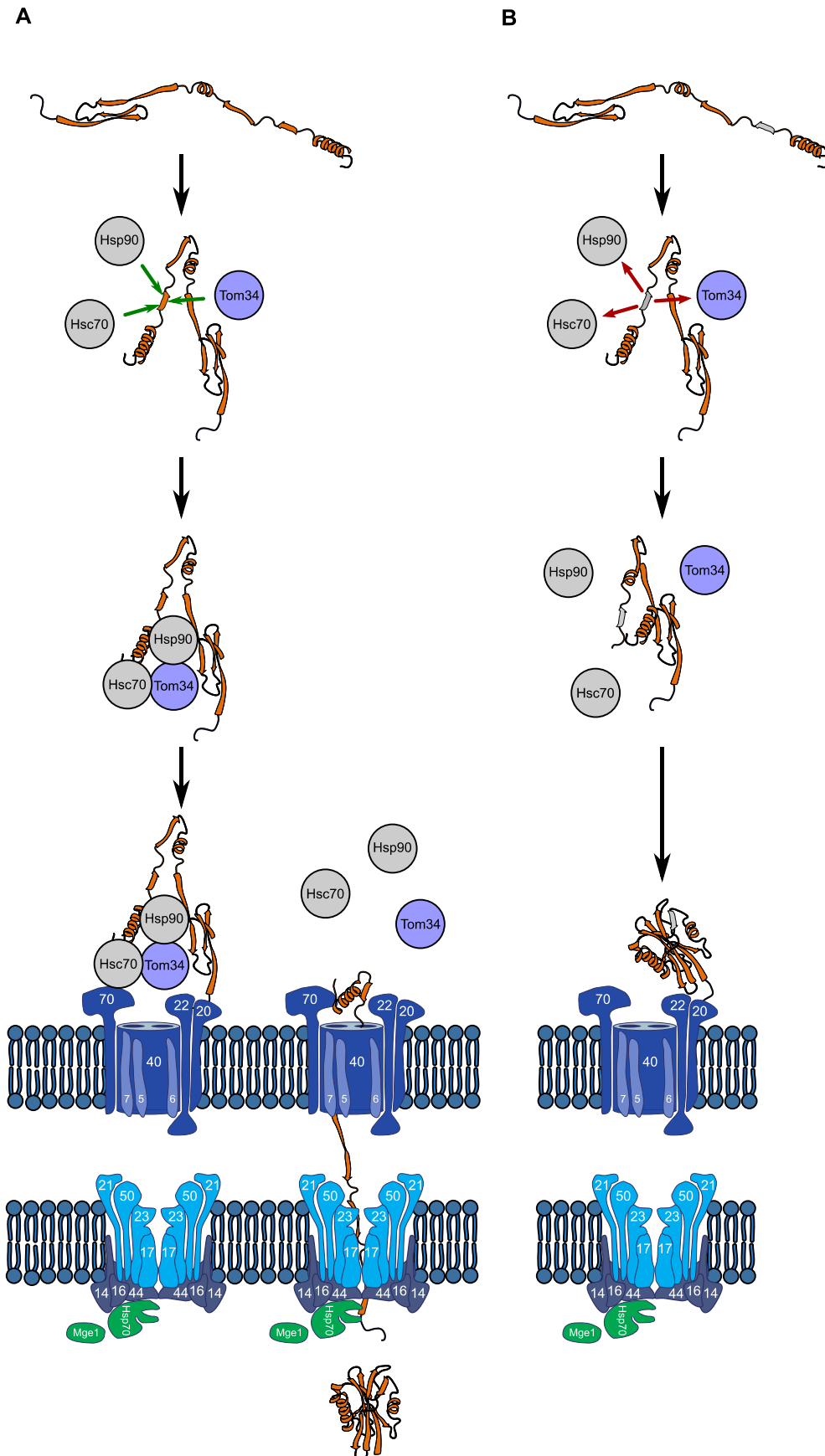


Abbildung 58: Hypothetischer Mechanismus des Importdefektes. Nach Synthese des Wildtyp- (A), beziehungsweise varianten (B) Polypeptids entscheidet die Bindung der Chaperone im Cytosol über eine Hemmung der (vollständigen) Faltung (A) oder eine vorzeitige Faltung/Aggregation (B). Im ungefalteten oder partiell gefalteten

Zustand bleibt die Importkompetenz erhalten. Die MTS wird von Tom20 erkannt, Tom70 bindet die molekularen Chaperone und den murenen Anteil des *precursors*. Nach vollständiger Translokation durch das Kanalprotein Tom40, Prozessierung des Signalpeptids und anschließender Faltungsassistenz durch Hsp60 liegt das mature Protein in der mitochondrialen Matrix in seiner funktionellen Form vor (**A**). Der Aminosäureaustausch im varianten Polypeptid verringert die Bindung von molekularen Chaperonen. Die Faltung/Aggregation erlaubt zwar noch die Assoziation an das Mitochondrium, jedoch nicht mehr die Translokation durch den TOM-Komplex (**B**) (Abbildung des TOM- und TIM-Komplexes aus [48], Proteinabbildung modifiziert nach NADYA, 2016, <http://www.cilker.com/clipart-protein-strukture-.html>, CC0-Lizenz).

Dass eine beschleunigte Proteinfaltung mit korrelierender Chaperon-Bindung mit dem Transport mitochondrialer Proteine zusammenhängen kann, zeigten Leiper *et al.* anhand von Beobachtungen zum molekularen Mechanismus der primären Hyperoxalurie Typ 1. Es wird von einem *second-hit*-Mechanismus bei der molekularen Pathogenese der Erkrankung ausgegangen. Ein Polymorphismus (P11L) generiert eine schwache MTS der physiologischerweise peroxisomal lokalisierten Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT). In Anwesenheit eines zweiten Aminosäureaustausches fern des N-Terminus (G170R), wird AGT in das Mitochondrium, anstatt das Peroxisom, importiert [291, 370]. Leiper *et al.* zeigten, dass der mitochondriale Import mit der Faltungseffizienz zusammenhängt. Je weniger das Protein gefaltet ist, desto höher ist seine Effizienz, in das Mitochondrium importiert zu werden [371]. Es wird angenommen, dass der Aminosäureaustausch im murenen Anteil des Proteins eine energetische Instabilität verursacht, deren einzige Auflösung die rasche Faltung, Fehlfaltung oder Aggregation darstellt, noch bevor es molekularen Chaperonen möglich ist, durch ATP-Hydrolyse dieser Spontanfaltung entgegenzuwirken [372].

Der reduzierte mitochondriale Proteinimport und der Verlust von Interaktionen zu molekularen Chaperonen nukleär kodierter mitochondrialer Proteine weitet den Blick auf andere zelluläre Systeme, die diesem Phänomen entgegenwirken. Es wurde gezeigt, dass persistierende *precursors* mitochondrialer Proteine im Cytosol eine *unfolded protein response activated by mistargeting of proteins* (UPRam) induzieren können [373, 374].

4.4 ***Proteostasis regulators und pharmacological chaperones***

Die derzeitige Therapie mitochondrialer Stoffwechselstörungen, seien es Fett- oder Aminosäurestoffwechselstörung wie der Glutaryl-CoA-Dehydrogenase-Mangel, der Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenasen-Mangel oder Harnstoffzyklusdefekte, wie beispielsweise der CPS1- und OTC-Mangel, basieren auf der Vermeidung der Akkumulation des Substrates beziehungsweise auf der Forcierung der Exkretion toxischer Metabolite [62, 375]. Als *ultima ratio* kann eine Lebertransplantation (bei Harnstoffzyklusdefekten) erwogen werden [376, 377]. Neben der Lebertransplantation besteht keine Möglichkeit, den Defekt kausal, im Sinne der Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität des betroffenen Proteins, zu behandeln.

Wird die *loss of function* bei angeborenen Stoffwechselstörungen nicht primär als Erlöschen der Aktivität eines Enzyms verstanden, sondern als eine Störung der Proteostase, so bieten sich neue pharmakologische Zielstrukturen neben dem varianten Indexprotein. *pharmacological chaperones* (PCs) und *proteostasis regulators* (PRs) fassen *small molecules* zusammen, die bei angeborenen Stoffwechselstörungen eingesetzt werden können [369, 378,

379]. PCs können direkt an fehlgefaltete Proteine binden und somit deren Faltungszustand korrigieren und stabilisieren, wohingegen PRs über die Veränderung des *proteostasis networks* die Funktion eines Indexproteins verbessern können. Neue Erkenntnisse zeigten einen synergistischen Effekt beim simultanen Einsatz beider Substanzklassen [380].

Dass die *proteostasis* eine konkrete Bedeutung für die Pathogenese und Therapie angeborener monogenetischer Erkrankungen haben kann, zeigen Arbeiten zur zystischen Fibrose. Bei der zystischen Fibrose induzieren Punktmutationen (prävalente Mutation: $\Delta F508$) einen Defekt des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), einem Chlorid-Kanal der apikalen Membran der Epithelzellen [381]. Die Mutation führt zur Proteinfehlfaltung mit *loss of function*. Pankow *et al.* zeigten, dass sich das Interaktionsnetzwerk des Wildtyp CFTR deutlich von dem der $\Delta F508$ -Variante unterscheidet [123]. Eine Modulation des *proteostasis networks* des CFTR-Kanals mittels *proteostasis regulators* führte zur Ausbildung neuer (die Funktion stabilisierender) Protein-Protein-Interaktionen mit der CFTR-Variante und konnte die Funktion des Kanals partiell wiederherstellen [123, 382, 383]. Dies zeigt, dass das Verständnis des *proteomes* ein wichtiger Angriffspunkt für neue pharmakologische Strategien darstellt. So kann bei monogenetischen Erkrankungen zwischen einem Verlust der enzymatischen Aktivität oder einer Reduktion der Proteinstabilität unterschieden werden. Je nach Dominanz kann eine Intervention mit *potentiators*, also Substanzen, die die Funktion unterstützen (beispielsweise Kofaktoren) oder *correctors* (beziehungsweise *proteostasis regulators*), die Synthese, Faltung und den Transport unterstützen, sinnvoll sein [382].

Pharmacological chaperones stabilisieren, wie molekulare Chaperone, den Faltungszustand eines Proteins und reduzieren dessen freie Energie ΔG [45, 384]. Im Kontext des ko- oder posttranslationalen Organellenimports muss diese Funktionseigenschaft jedoch verstanden und überlegt eingesetzt werden. Mit einem frühen Erreichen des finalen Faltungszustandes (in Cytosol) erlischt die Importkompetenz eines Proteins [371]. Wenn ein *pharmacological chaperone* demnach die Proteinfaltung forciert, wird der Wirkungsort der Substanz sowie der exakte Pathomechanismus des Funktionsverlustes relevant. Ist die Ursache des mitochondrialen Importdefektes, wie hier aufgezeigt, eine aufgehobene Interaktion zu molekularen Chaperonen im Cytosol, so spielt der Einsatz von *proteostasis regulators* zur Verbesserung der Chaperon-Klient-Interaktion wahrscheinlich eine größere Rolle als jener der *pharmacological chaperones*. Dennoch bleibt unklar, welchen Faltungszustand variante *precursors* im Cytosol aufweisen. Kommt zu der aufgehobenen Interaktion eine Aggregationstendenz des Klienten, so kann der duale Einsatz von *proteostasis regulators* und *pharmacological chaperones* synergistisch wirken [380]. Im Gegensatz dazu könnte eine zu frühe Stabilisierung der Faltung (im Cytosol) die Importkompetenz des *precursors* reduzieren. Eilers *et al.* konnten zeigen, dass Methotrexat, in diesem Zusammenhang wie ein *pharmacological chaperone* agierend, den mitochondrialen Import der Dihydrofolatreduktase (mit einer MTS fusioniert) inhibierte [32]. Sinnvoll wäre demzufolge eine extramitochondriale Regulation der Proteostase mittels *proteostasis regulators*, um das cytosolische *proteostasis network* zu stabilisieren, und eine intramitochondriale Faltungsassistenz durch *pharmacological chaperones* zum Erreichen des *native states*.

Ein weiteres Ergründen von Protein-Protein-Wechselwirkungen, des Faltungszustandes des *precursors* sowie der Adaptation des *proteostasis networks* auf variante Proteine ist notwendig, um neben den in der vorliegenden Arbeit fokussierten mitochondrialen Import und cytosolischen *proteostasis network* weitere Zielstrukturen und Zielmechanismen einer pharmakotherapeutischen Intervention zu eruieren und die bekannten Mechanismen besser zu verstehen. Das Verständnis eines mutationsspezifischen und damit für den Patienten individualisierten *proteostasis networks* kann somit Grundstein einer personalisierten Medizin und Ausgangspunkt für die Etablierung neuer Therapiekonzepte sein [385, 386].

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der kotranslationalen Proteininteraktion mit molekularen Chaperonen.	4
Abbildung 2: Architektur des TOM- und TIM-Komplexes.	5
Abbildung 3: Mechanismus der TIM-vermittelten IMM-Translokation.	6
Abbildung 4: Kristallstruktur der GCDH.	11
Abbildung 5: Das aktive Zentrum der GCDH.	11
Abbildung 6: <i>Protein protection assay</i> (schematische Darstellung).	48
Abbildung 7: Schematische Darstellung der <i>affinity coupled mass spectrometry</i> (AP-MS/MS).	50
Abbildung 8: Schematisierte Darstellung des BRET.	55
Abbildung 9: Prinzip des LUMIER assays.	57
Abbildung 10: Western Blot zur Bestimmung der Proteinmenge von Wildtyp und varianter GCDH und MCAD.	58
Abbildung 11: Lyse von Mitochondrien aus <i>COS-7</i> -Zellen mittels Digitonin und Triton X-100.	59
Abbildung 12: GCDH-Proteinenge in Abhängigkeit der transfizierten cDNA-Menge.	60
Abbildung 13: Transfektionsbasierter <i>competition assay</i> zur Bestimmung des p/m-Quotienten der GCDH-Proteinmenge abhängig vom Expressionsniveau.	61
Abbildung 14: Lokalisation der GCDH-Mutationen in der Tertiärstruktur.	62
Abbildung 15: Expression varianter GCDH-Proteine.	63
Abbildung 16: Lokalisation der Mutationen in der Tertiärstruktur der GCDH.	64
Abbildung 17: Immunfluoreszenzmikroskopie GCDH-exprimierender <i>COS-7</i> -Zellen.	65
Abbildung 18: Fraktionierung GCDH-exprimierender <i>COS-7</i> -Zellen.	66
Abbildung 19: <i>Protection assay</i> (GCDH WT und F71S).	67
Abbildung 20: <i>Protection assay</i> mit permeabilisierten Membranen.	67
Abbildung 21: <i>Protection assay</i> (GCDH- und MCAD-Varianten).	68
Abbildung 22: Expression der GCDH im Zeitverlauf.	69
Abbildung 23: Akkumulation des <i>precursors</i> der GCDH.	70
Abbildung 24: Zeitabhängige Proteinase-K-Proteolyse der pGCDH.	71

Abbildung 25: Identifikation der 90-kDa-Bande.....	72
Abbildung 26: Immunopräzipitation der GCDH.	74
Abbildung 27: Bestimmung der Lokalisation der GCDH $_{\Delta}$ MTS.....	75
Abbildung 28: Mitochondrienaufreinigung mit Mikrokügelchen mit anti-Tom22- Antikörpern.....	76
Abbildung 29: <i>Protection assay</i> des Wildtyps und varianter GCDH $_{\Delta}$ MTS.	76
Abbildung 30: Posttranslationale Bindung der Wildtyp-GCDH $_{\text{MTS}}$ und GCDH $_{\Delta}$ MTS an Mitochondrien.....	77
Abbildung 31: Posttranslationale Bindung der F71S-GCDH $_{\text{MTS}}$ und GCDH $_{\Delta}$ MTS an Mitochondrien.....	78
Abbildung 32: Posttranslationale Bindung der OTC $_{\text{MTS}}$, OTC $_{\Delta}$ MTS sowie BCKDHA $_{\text{MTS}}$ und BCKDHA $_{\Delta}$ MTS an Mitochondrien.....	78
Abbildung 33: Zusammenhang zwischen Anzahl der identifizierten Proteine und SILAC-Wert.....	80
Abbildung 34: Mit Wildtyp und R138G MBP-GCDH $_{\Delta}$ MTS präzipitierte Proteine.....	81
Abbildung 35: Zelluläre Lokalisation der Venus- und hRluc-Fusionsproteine.....	85
Abbildung 36: Submitochondriale Lokalisation der hRluc-GCDH.....	86
Abbildung 37: Ko-Expression hRluc- und Venus-fusionierter Proteine.....	86
Abbildung 38: Protein-Protein-Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Venus-PAH (BRET).....	87
Abbildung 39: Protein-Protein-Interaktionsmessung von GCDH- und Hsc70- Fusionsproteinen.....	88
Abbildung 40: Protein-Protein-Interaktionsmessung von GCDH- und Chaperon- Fusionsproteinen.....	90
Abbildung 41: Verhältnis zwischen transfizierter cDNA-Menge und Proteinmenge.....	91
Abbildung 42: BRET-Sättigungsexperiment.....	91
Abbildung 43: Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen nukleär kodierter mitochondrialer Proteine mit molekularen Chaperonen.	93
Abbildung 44: Ko-Immunopräzipitation von GCDH-V5 und Hsc70.....	95
Abbildung 45: Kontrollen im LUMIER-Experiment.	96
Abbildung 46: Ko-Expression der GCDH mit Hsc70, Hsp90 und Tom34.	96
Abbildung 47: Protein-Protein-Interaktionen zwischen hRluc-GCDH und Hsc70- His, Hsp90-His und Tom34-His.	97

Abbildung 48: Einfluss der MTS auf die Bindung der GCDH zu molekularen Chaperonen.	97
Abbildung 49: Protein-Protein-Interaktion zwischen varianter hRluc-GCDH und Hsc70-His, Hsp90-His und Tom34-His.	98
Abbildung 50: Korrelation zwischen LUMIER-Wert und p/m-Quotient.	99
Abbildung 51: Einfluss von Hsc70-Modulatoren auf den p/m-Quotienten der GCDH.	100
Abbildung 52: Dosisabhängiger Einfluss von Spergualin auf die pGCDH-, mGCDH-, Hsc70- und GAPDH-Mengen.	101
Abbildung 53: Quantitative Messung der Protein-Protein-Interaktion zwischen hRluc-GCDH und Hsc70-His unter Spergualin.	102
Abbildung 54: Monogenetische mitochondriale Erkrankungen.	104
Abbildung 55: N-Terminus der GCDH.	108
Abbildung 56: N-Terminus der GCDH mit R161.	109
Abbildung 57: <i>Proteostasis network</i>	111
Abbildung 58: Hypothetischer Mechanismus des Importdefektes.	120

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antibiotische Substanzen.....	14
Tabelle 2: Kits und Verbrauchsmaterialien.	16
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	18
Tabelle 4: Zellkulturmedien.....	19
Tabelle 5: Agaroseplatten.....	19
Tabelle 6: DNA- und Proteinstandards.	20
Tabelle 7: Klonierungs- und Expressionsvektoren.	20
Tabelle 8: Antikörper	21
Tabelle 9: Geräte.....	24
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien.	25
Tabelle 11: Software.....	26
Tabelle 12: Mutationen im <i>GCDH</i> -Gen.	33
Tabelle 13: Mutationen im <i>ACADM</i> -Gen.....	34
Tabelle 14: Primer zur Klonierung MTS-deletierter <i>GCDH</i>	34
Tabelle 15: Primer zur Klonierung MTS-deletierter <i>BCKDHA</i> - und <i>OTC</i> -Varianten.....	35
Tabelle 16: Sequenzierungsprimer.	36
Tabelle 17: Primäre Antikörper.	45
Tabelle 18: Sekundäre Antikörper.	46
Tabelle 19: Identifizierte molekulare Chaperone im Präzipitat der nicht denaturierten Wildtyp und R138G MBP- <i>GCDH</i> _{ΔMTS}	82
Tabelle 20: Identifizierte molekulare Chaperone im Präzipitat der denaturierten Wildtyp und R138G MBP- <i>GCDH</i> _{ΔMTS}	83

Abkürzungsverzeichnis

3-OH-GA	3-Hydroxyglutarsäure
95 % CI	95 %-Konfidenzintervall
A	Adenosin
AADAT	2-Amino adipat-Aminotransferase
AASDH	2-Amino adipat-Semialdehyd-Dehydrogenase
AASS	2-Amino adipat-Semialdehyd-Synthase
ABC	ATP-bindende Kasette
ACADM	Gen der Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
ACN	Acetonitril
AP	<i>affinity purification</i>
AP-MS/MS	<i>affinity-purification coupled mass spectrometry</i>
ATFS-1	<i>activated transcription factor associated with stress-1</i>
atoB	Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
att	<i>attachment</i>
BN	<i>blue-native</i>
C	Cytosin
c	cytosolisch
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
C5DC	Glutaryl carnitin
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CHOP	C/EBP homologes Protein
ClpP	Clp-Protease
CoA	Coenzym A
COS-7	<i>CV-1 in origin, carrying SV40 genetic material</i>
CPTI	Carnitin-Palmitoyltransferase I
CPTII	Carnitin-Palmitoyltransferase II
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DVE-1	<i>homeodomain-containing transcription factor</i>

E_{2e^-}	Enzym, reduziert
E_{ox}	Enzym, oxidiert
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
echA	Enoyl-CoA-Hydratase
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	<i>electrospray injection</i>
ETF	<i>electron-transferring flavoprotein</i>
FA	Ameisensäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
G	Guanosin
GA	Glutarsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCDH	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase
HADH	Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp	<i>heat shock proteins</i>
HSR	<i>heat shock response</i>
iBAQ	<i>intensity-based absolute quantification</i>
Icp	<i>intermediate cleaving peptidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IHF	<i>integration host factor</i>
IMM	<i>inner mitochondrial membrane</i>
IMS	<i>intermembrane space</i>
Int	Integrase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LonP	Lon-Protease
LOR	L-Lysin-2-Oxoglutarat-Reduktase
m	mitochondrial
μ	Mittelwert

$\bar{\mu}$	mittlere Differenz
MBP	Maltose-bindendes Protein
MCAD	Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
mGCDH	mature GCDH
mMCAD	mature MCAD
min	Minuten
MM	<i>mitochondrial matrix</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	<i>mitochondrial processing peptidase</i>
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mt	mitochondrial
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
MTS	<i>mitochondrial targeting sequence</i>
NaDC3	<i>Na⁺-dependent dicarboxylate cotransporter</i>
NEF	<i>nucleotide exchange factor</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
n. s.	nicht signifikant
OMM	<i>outer mitochondrial membrane</i>
OTC	Ornithin-Transcarbamoylase
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAH	Phenylalaninhydroxylase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>pharmacological chaperone</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pGCDH	<i>precursor</i> GCDH
PH1	primäre Hyperoxalurie Typ 1
pMCAD	<i>precursor</i> MCAD
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	<i>proteostasis regulator</i>
ProtK	Proteinase K
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park-Memorial-Institute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>

SEM	Sucrose-EDTA-Mannitol
SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
SV	<i>simian virus</i>
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIM	<i>translocator of the inner mitochondrial membrane</i>
TOM	<i>translocator of the outer mitochondrial membrane</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBL	<i>ubiquitin-like protein</i>
uf	<i>unfolded</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPR ^{ER}	endoplasmatische <i>unfolded protein response</i>
UPR ^{mt}	mitochondriale <i>unfolded proteins response</i>
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
YPD	<i>yeast-peptone-dextrose</i>

Literaturverzeichnis

1. **Neupert W.** *A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions.* J Mol Biol, 427(6 Pt A): p. 1135-58, 2015.
2. **Fan AC, Bhangoon MK, and Young JC.** *Hsp90 functions in the targeting and outer membrane translocation steps of Tom70-mediated mitochondrial import.* J Biol Chem, 281(44): p. 33313-24, 2006.
3. **Fan AC and Young JC.** *Function of cytosolic chaperones in Tom70-mediated mitochondrial import.* Protein Pept Lett, 18(2): p. 122-31, 2011.
4. **Young JC, Hoogenraad NJ, and Hartl FU.** *Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70.* Cell, 112(1): p. 41-50, 2003.
5. **Zanphorlin LM, Lima TB, Wong MJ, Balbuena TS, Minetti CA, Remeta DP, Young JC, Barbosa LR, Gozzo FC, and Ramos CH.** *Heat Shock Protein 90 kDa (Hsp90) Has a Second Functional Interaction Site with the Mitochondrial Import Receptor Tom70.* J Biol Chem, 291(36): p. 18620-31, 2016.
6. **Neupert W.** *Protein import into mitochondria.* Annu Rev Biochem, 66: p. 863-917, 1997.
7. **Wenz LS, Opalinski L, Wiedemann N, and Becker T.** *Cooperation of protein machineries in mitochondrial protein sorting.* Biochim Biophys Acta, 1853(5): p. 1119-29, 2015.
8. **Koopman WJ, Willems PH, and Smeitink JA.** *Monogenic mitochondrial disorders.* N Engl J Med, 366(12): p. 1132-41, 2012.
9. **Scharfe C, Lu HH, Neuenburg JK, Allen EA, Li GC, Klopstock T, Cowan TM, Enns GM, and Davis RW.** *Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes.* PLoS Comput Biol, 5(4): p. e1000374, 2009.
10. **Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, and Kelly JW.** *Adapting proteostasis for disease intervention.* Science, 319(5865): p. 916-9, 2008.
11. **Hutt D and Balch WE.** *Cell Biology. The proteome in balance.* Science, 329(5993): p. 766-7, 2010.
12. **Sahni N, Yi S, Taipale M, Fuxman Bass JI, Coulombe-Huntington J, Yang F, Peng J, Weile J, Karras GI, Wang Y, et al.** *Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders.* Cell, 161(3): p. 647-60, 2015.
13. **Nisbet EG and Sleep NH.** *The habitat and nature of early life.* Nature, 409(6823): p. 1083-91, 2001.
14. **Martin.** *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes.* 2007, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 306.
15. **Martin W and Muller M.** *The hydrogen hypothesis for the first eukaryote.* Nature, 392(6671): p. 37-41, 1998.
16. **Schrader M, Costello J, Godinho LF, and Islinger M.** *Peroxisome-mitochondria interplay and disease.* J Inherit Metab Dis, 38(4): p. 681-702, 2015.
17. **Wanders RJ, Waterham HR, and Ferdinandusse S.** *Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum.* Front Cell Dev Biol, 3: p. 83, 2015.
18. **Endo T, Yamano K, and Kawano S.** *Structural insight into the mitochondrial protein import system.* Biochim Biophys Acta, 1808(3): p. 955-70, 2011.

19. **Lane N and Martin W.** *The energetics of genome complexity.* Nature, 467(7318): p. 929-34, 2010.
20. **Andersson SG, Karlberg O, Canback B, and Kurland CG.** *On the origin of mitochondria: a genomics perspective.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 358(1429): p. 165-77; discussion 177-9, 2003.
21. **Schmidt O, Pfanner N, and Meisinger C.** *Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms.* Nat Rev Mol Cell Biol, 11(9): p. 655-67, 2010.
22. **Dolezal P, Likic V, Tachezy J, and Lithgow T.** *Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria.* Science, 313(5785): p. 314-8, 2006.
23. **Bjorkholm P, Harish A, Hagstrom E, Ernst AM, and Andersson SG.** *Mitochondrial genomes are retained by selective constraints on protein targeting.* Proc Natl Acad Sci U S A, 112(33): p. 10154-61, 2015.
24. **Adams KL and Palmer JD.** *Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus.* Mol Phylogenet Evol, 29(3): p. 380-95, 2003.
25. **Becker T, Bottinger L, and Pfanner N.** *Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network.* Trends Biochem Sci, 37(3): p. 85-91, 2012.
26. **Dudek J, Rehling P, and van der Laan M.** *Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks.* Biochim Biophys Acta, 1833(2): p. 274-85, 2013.
27. **Wiedemann N and Pfanner N.** *Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly.* Annu Rev Biochem, 86: p. 685-714, 2017.
28. **Yamano K, Yatsukawa Y, Esaki M, Hobbs AE, Jensen RE, and Endo T.** *Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import.* J Biol Chem, 283(7): p. 3799-807, 2008.
29. **Brix J, Rudiger S, Bukau B, Schneider-Mergener J, and Pfanner N.** *Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein.* J Biol Chem, 274(23): p. 16522-30, 1999.
30. **Pfanner N, Muller HK, Harmey MA, and Neupert W.** *Mitochondrial protein import: involvement of the mature part of a cleavable precursor protein in the binding to receptor sites.* EMBO J, 6(11): p. 3449-54, 1987.
31. **Harmey MA, Hallermayer G, Korb H, and Neupert W.** *Transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in a cell free system from Neurospora crassa.* Eur J Biochem, 81(3): p. 533-44, 1977.
32. **Eilers M and Schatz G.** *Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria.* Nature, 322(6076): p. 228-32, 1986.
33. **Rassow J, Hartl FU, Guiard B, Pfanner N, and Neupert W.** *Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state.* FEBS Lett, 275(1-2): p. 190-4, 1990.
34. **Stojanovski D, Bohnert M, Pfanner N, and van der Laan M.** *Mechanisms of protein sorting in mitochondria.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 4(10), 2012.
35. **Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, and Schekman R.** *A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides.* Nature, 332(6167): p. 800-5, 1988.
36. **Terada K, Ohtsuka K, Imamoto N, Yoneda Y, and Mori M.** *Role of heat shock cognate 70 protein in import of ornithine transcarbamylase precursor into mammalian mitochondria.* Mol Cell Biol, 15(7): p. 3708-13, 1995.

37. **Hoogenraad NJ, Ward LA, and Ryan MT.** *Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells.* Biochim Biophys Acta, 1592(1): p. 97-105, 2002.
38. **Lain B, Iriarte A, Mattingly JR, Jr., Moreno JI, and Martinez-Carrion M.** *Structural features of the precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase responsible for binding to hsp70.* J Biol Chem, 270(42): p. 24732-9, 1995.
39. **Chan NC, Likic VA, Waller RF, Mulhern TD, and Lithgow T.** *The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi.* J Mol Biol, 358(4): p. 1010-22, 2006.
40. **Wu Y and Sha B.** *Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p.* Nat Struct Mol Biol, 13(7): p. 589-93, 2006.
41. **Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, and Moarefi I.** *Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine.* Cell, 101(2): p. 199-210, 2000.
42. **Reidy M, Kumar S, Anderson DE, and Masison DC.** *Dual Roles for Yeast Sti1/Hop in Regulating the Hsp90 Chaperone Cycle.* Genetics, 209(4): p. 1139-1154, 2018.
43. **Lee CT, Graf C, Mayer FJ, Richter SM, and Mayer MP.** *Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1.* EMBO J, 31(6): p. 1518-28, 2012.
44. **Odunuga OO, Hornby JA, Bies C, Zimmermann R, Pugh DJ, and Blatch GL.** *Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity.* J Biol Chem, 278(9): p. 6896-904, 2003.
45. **Hartl FU, Bracher A, and Hayer-Hartl M.** *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis.* Nature, 475(7356): p. 324-32, 2011.
46. **Bukau B, Weissman J, and Horwich A.** *Molecular chaperones and protein quality control.* Cell, 125(3): p. 443-51, 2006.
47. **Young JC, Agashe VR, Siegers K, and Hartl FU.** *Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol.* Nat Rev Mol Cell Biol, 5(10): p. 781-91, 2004.
48. **Neupert W and Herrmann JM.** *Translocation of proteins into mitochondria.* Annu Rev Biochem, 76: p. 723-49, 2007.
49. **Faou P and Hoogenraad NJ.** *Tom34: a cytosolic cochaperone of the Hsp90/Hsp70 protein complex involved in mitochondrial protein import.* Biochim Biophys Acta, 1823(2): p. 348-57, 2012.
50. **Mokranjac D and Neupert W.** *Energetics of protein translocation into mitochondria.* Biochim Biophys Acta, 1777(7-8): p. 758-62, 2008.
51. **Ungermann C, Guiard B, Neupert W, and Cyr DM.** *The delta psi- and Hsp70/MIM44-dependent reaction cycle driving early steps of protein import into mitochondria.* EMBO J, 15(4): p. 735-44, 1996.
52. **Schneider HC, Berthold J, Bauer MF, Dietmeier K, Guiard B, Brunner M, and Neupert W.** *Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import.* Nature, 371(6500): p. 768-74, 1994.
53. **Ungermann C, Neupert W, and Cyr DM.** *The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria.* Science, 266(5188): p. 1250-3, 1994.
54. **Schulz C, Schendzielorz A, and Rehling P.** *Unlocking the presequence import pathway.* Trends Cell Biol, 25(5): p. 265-75, 2015.

55. **Teixeira PF and Glaser E.** *Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts.* Biochim Biophys Acta, 1833(2): p. 360-70, 2013.
56. **Vogle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, et al.** *Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability.* Cell, 139(2): p. 428-39, 2009.
57. **Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, and Langer T.** *Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria.* Science, 291(5511): p. 2135-8, 2001.
58. **Ostermann J, Horwich AL, Neupert W, and Hartl FU.** *Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis.* Nature, 341(6238): p. 125-30, 1989.
59. **Xu Z, Horwich AL, and Sigler PB.** *The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex.* Nature, 388(6644): p. 741-50, 1997.
60. **Horwich AL and Fenton WA.** *Chaperonin-mediated protein folding: using a central cavity to kinetically assist polypeptide chain folding.* Q Rev Biophys, 42(2): p. 83-116, 2009.
61. **Hartl FU and Hayer-Hartl M.** *Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo.* Nat Struct Mol Biol, 16(6): p. 574-81, 2009.
62. **Kolker S, Christensen E, Leonard JV, Greenberg CR, Boneh A, Burlina AB, Burlina AP, Dixon M, Duran M, Garcia Cazorla A, et al.** *Diagnosis and management of glutaric aciduria type I--revised recommendations.* J Inherit Metab Dis, 34(3): p. 677-94, 2011.
63. **Fu Z, Wang M, Paschke R, Rao KS, Frerman FE, and Kim JJ.** *Crystal structures of human glutaryl-CoA dehydrogenase with and without an alternate substrate: structural bases of dehydrogenation and decarboxylation reactions.* Biochemistry, 43(30): p. 9674-84, 2004.
64. **Kolker S, Garbade SF, Greenberg CR, Leonard JV, Saudubray JM, Ribes A, Kalkanoglu HS, Lund AM, Merinero B, Wajner M, et al.** *Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.* Pediatr Res, 59(6): p. 840-7, 2006.
65. **Hedlund GL, Longo N, and Pasquali M.** *Glutaric acidemia type 1.* Am J Med Genet C Semin Med Genet, 142C(2): p. 86-94, 2006.
66. **Boy N, Muhlhausen C, Maier EM, Heringer J, Assmann B, Burgard P, Dixon M, Fleissner S, Greenberg CR, Harting I, et al.** *Proposed recommendations for diagnosing and managing individuals with glutaric aciduria type I: second revision.* J Inherit Metab Dis, 40(1): p. 75-101, 2017.
67. **Kyllerman M, Skjeldal O, Christensen E, Hagberg G, Holme E, Lonquist T, Skov L, Rotwelt T, and von Döbeln U.** *Long-term follow-up, neurological outcome and survival rate in 28 Nordic patients with glutaric aciduria type 1.* Eur J Paediatr Neurol, 8(3): p. 121-9, 2004.
68. **Boy N, Mengler K, Thimm E, Schiergens KA, Marquardt T, Weinhold N, Marquardt I, Das AM, Freisinger P, Grunert SC, et al.** *Newborn screening: A disease-changing intervention for glutaric aciduria type 1.* Ann Neurol, 83(5): p. 970-979, 2018.
69. **Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen e.V.** *Diagnostik, Therapie und Management der Glutarazidurie Typ I.* Abgerufen am 29.11.2019. URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/027-018l_S3_Glutarazidurie_Typ_I_2016-07.pdf.
70. **Kolker S, Valayannopoulos V, Burlina AB, Sykut-Cegielska J, Wijburg FA, Teles EL, Zeman J, Dionisi-Vici C, Baric I, Karall D, et al.** *The phenotypic spectrum of organic acidurias and urea cycle disorders. Part 2: the evolving clinical phenotype.* J Inherit Metab Dis, 38(6): p. 1059-74, 2015.

71. **Martinez Granero MA, Garcia Perez A, Martinez-Pardo M, and Parra E.** *[Macrocephaly the first manifestation of glutaric aciduria type I: the importance of early diagnosis].* Neurologia, 20(5): p. 255-60, 2005.
72. **Busquets C, Merinero B, Christensen E, Gelpi JL, Campistol J, Pineda M, Fernandez-Alvarez E, Prats JM, Sans A, Arteaga R, et al.** *Glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency in Spain: evidence of two groups of patients, genetically, and biochemically distinct.* Pediatr Res, 48(3): p. 315-22, 2000.
73. **Baric I, Wagner L, Feyh P, Liesert M, Buckel W, and Hoffmann GF.** *Sensitivity and specificity of free and total glutaric acid and 3-hydroxyglutaric acid measurements by stable-isotope dilution assays for the diagnosis of glutaric aciduria type I.* J Inherit Metab Dis, 22(8): p. 867-81, 1999.
74. **Christensen E, Ribes A, Merinero B, and Zschocke J.** *Correlation of genotype and phenotype in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.* J Inherit Metab Dis, 27(6): p. 861-8, 2004.
75. **Schillaci LA, Greene CL, Strovel E, Rispoli-Joines J, Spector E, Woontner M, Scharer G, Enns GM, Gallagher R, Zinn AB, et al.** *The M405V allele of the glutaryl-CoA dehydrogenase gene is an important marker for glutaric aciduria type I (GA-I) low excretors.* Mol Genet Metab, 119(1-2): p. 50-6, 2016.
76. **Andresen BS, Olpin S, Poorthuis BJ, Scholte HR, Vianey-Saban C, Wanders R, Ijlst L, Morris A, Pourfarzam M, Bartlett K, et al.** *Clear correlation of genotype with disease phenotype in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* Am J Hum Genet, 64(2): p. 479-94, 1999.
77. **Lindner M, Gramer G, Haege G, Fang-Hoffmann J, Schwab KO, Tacke U, Trefz FK, Mengel E, Wendel U, Leichsenring M, et al.** *Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases--report of 10 years from South-West Germany.* Orphanet J Rare Dis, 6: p. 44, 2011.
78. **Gortner L.** *[Cystic Fibrosis Screening in Germany].* Klin Padiatr, 229(2): p. 55-56, 2017.
79. **Chace DH, Kalas TA, and Naylor EW.** *Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns.* Clin Chem, 49(11): p. 1797-817, 2003.
80. **Heringer J, Boy SP, Ensenauer R, Assmann B, Zschocke J, Harting I, Lucke T, Maier EM, Muhlhausen C, Haege G, et al.** *Use of guidelines improves the neurological outcome in glutaric aciduria type I.* Ann Neurol, 68(5): p. 743-52, 2010.
81. **Smith WE, Millington DS, Koeberl DD, and Lesser PS.** *Glutaric acidemia, type I, missed by newborn screening in an infant with dystonia following promethazine administration.* Pediatrics, 107(5): p. 1184-7, 2001.
82. **Wilcken B, Wiley V, Hammond J, and Carpenter K.** *Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry.* N Engl J Med, 348(23): p. 2304-12, 2003.
83. **Napolitano N, Wiley V, and Pitt JJ.** *Pseudo-glutaryl-carnitinaemia in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening.* J Inherit Metab Dis, 27(4): p. 465-71, 2004.
84. **Hennermann JB, Roloff S, Gellermann J, Gruters A, and Klein J.** *False-positive newborn screening mimicking glutaric aciduria type I in infants with renal insufficiency.* J Inherit Metab Dis, 32 Suppl 1: p. S355-9, 2009.
85. **Bijarnia S, Wiley V, Carpenter K, Christodoulou J, Ellaway CJ, and Wilcken B.** *Glutaric aciduria type I: outcome following detection by newborn screening.* J Inherit Metab Dis, 31(4): p. 503-7, 2008.

86. **Boneh A, Beauchamp M, Humphrey M, Watkins J, Peters H, and Yapfite-Lee J.** *Newborn screening for glutaric aciduria type I in Victoria: treatment and outcome.* Mol Genet Metab, 94(3): p. 287-91, 2008.
87. **Seccombe DW, James L, and Booth F.** *L-carnitine treatment in glutaric aciduria type I.* Neurology, 36(2): p. 264-7, 1986.
88. **Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, and Garrett Q.** *Role of carnitine in disease.* Nutr Metab (Lond), 7: p. 30, 2010.
89. **Dixon MA and Leonard JV.** *Intercurrent illness in inborn errors of intermediary metabolism.* Arch Dis Child, 67(11): p. 1387-91, 1992.
90. **Prietsch V, Lindner M, Zschocke J, Nyhan WL, and Hoffmann GF.** *Emergency management of inherited metabolic diseases.* J Inher Metab Dis, 25(7): p. 531-46, 2002.
91. **Strauss KA, Lazovic J, Wintermark M, and Morton DH.** *Multimodal imaging of striatal degeneration in Amish patients with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.* Brain, 130(Pt 7): p. 1905-20, 2007.
92. **Goodman SI and Kohlhoff JG.** *Glutaric aciduria: inherited deficiency of glutaryl-CoA dehydrogenase activity.* Biochem Med, 13(2): p. 138-40, 1975.
93. **Goodman SI, Markey SP, Moe PG, Miles BS, and Teng CC.** *Glutaric aciduria; a "new" disorder of amino acid metabolism.* Biochem Med, 12(1): p. 12-21, 1975.
94. **Brandt NJ, Brandt S, Christensen E, Gregersen N, and Rasmussen K.** *Glutaric aciduria in progressive choreo-athetosis.* Clin Genet, 13(1): p. 77-80, 1978.
95. **Brandt NJ, Gregersen N, Christensen E, and Rasmussen K.** *Glutaric aciduria in two brothers.* J Inher Metab Dis, 1(1): p. 13-4, 1978.
96. **Biery BJ, Stein DE, Morton DH, and Goodman SI.** *Gene structure and mutations of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase: impaired association of enzyme subunits that is due to an A421V substitution causes glutaric acidemia type I in the Amish.* Am J Hum Genet, 59(5): p. 1006-11, 1996.
97. **Schwartz M, Christensen E, Superti-Furga A, and Brandt NJ.** *The human glutaryl-CoA dehydrogenase gene: report of intronic sequences and of 13 novel mutations causing glutaric aciduria type I.* Hum Genet, 102(4): p. 452-8, 1998.
98. **Lenich AC and Goodman SI.** *The purification and characterization of glutaryl-coenzyme A dehydrogenase from porcine and human liver.* J Biol Chem, 261(9): p. 4090-6, 1986.
99. **Goodman SI, Kratz LE, DiGiulio KA, Biery BJ, Goodman KE, Isaya G, and Frerman FE.** *Cloning of glutaryl-CoA dehydrogenase cDNA, and expression of wild type and mutant enzymes in Escherichia coli.* Hum Mol Genet, 4(9): p. 1493-8, 1995.
100. **Schmiesing J, Lohmoller B, Schweizer M, Tidow H, Gersting SW, Muntau AC, Braulke T, and Muhlhausen C.** *Disease-causing mutations affecting surface residues of mitochondrial glutaryl-CoA dehydrogenase impair stability, heteromeric complex formation and mitochondria architecture.* Hum Mol Genet, 26(3): p. 538-551, 2017.
101. **Ghisla S and Thorpe C.** *Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview.* Eur J Biochem, 271(3): p. 494-508, 2004.
102. **Dwyer TM, Rao KS, Goodman SI, and Frerman FE.** *Proton abstraction reaction, steady-state kinetics, and oxidation-reduction potential of human glutaryl-CoA dehydrogenase.* Biochemistry, 39(37): p. 11488-99, 2000.

103. **Westover JB, Goodman SI, and Frerman FE.** *Pathogenic mutations in the carboxyl-terminal domain of glutaryl-CoA dehydrogenase: effects on catalytic activity and the stability of the tetramer.* Mol Genet Metab, 79(4): p. 245-56, 2003.
104. **Kolker S, Strauss KA, Goodman SI, Hoffmann GF, Okun JG, and Koeller DM.** *Challenges for basic research in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.* J Inherit Metab Dis, 27(6): p. 843-9, 2004.
105. **Woontner M, Crnic LS, and Koeller DM.** *Analysis of the expression of murine glutaryl-CoA dehydrogenase: in vitro and in vivo studies.* Mol Genet Metab, 69(2): p. 116-22, 2000.
106. **Sauer SW, Okun JG, Fricker G, Mahringer A, Muller I, Crnic LR, Muhlhausen C, Hoffmann GF, Horster F, Goodman SI, et al.** *Intracerebral accumulation of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids secondary to limited flux across the blood-brain barrier constitute a biochemical risk factor for neurodegeneration in glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency.* J Neurochem, 97(3): p. 899-910, 2006.
107. **Muhlhausen C, Burckhardt BC, Hagos Y, Burckhardt G, Keyser B, Lukacs Z, Ullrich K, and Braulke T.** *Membrane translocation of glutaric acid and its derivatives.* J Inherit Metab Dis, 31(2): p. 188-93, 2008.
108. **Stellmer F, Keyser B, Burckhardt BC, Koepsell H, Streichert T, Glatzel M, Jabs S, Thiem J, Herdering W, Koeller DM, et al.** *3-Hydroxyglutaric acid is transported via the sodium-dependent dicarboxylate transporter NaDC3.* J Mol Med (Berl), 85(7): p. 763-70, 2007.
109. **Lamp J, Keyser B, Koeller DM, Ullrich K, Braulke T, and Muhlhausen C.** *Glutaric aciduria type 1 metabolites impair the succinate transport from astrocytic to neuronal cells.* J Biol Chem, 286(20): p. 17777-84, 2011.
110. **Muhlhausen C, Ott N, Chalajour F, Tilki D, Freudenberg F, Shahhossini M, Thiem J, Ullrich K, Braulke T, and Ergun S.** *Endothelial effects of 3-hydroxyglutaric acid: implications for glutaric aciduria type I.* Pediatr Res, 59(2): p. 196-202, 2006.
111. **Greenberg CR, Duncan AM, Gregory CA, Singal R, and Goodman SI.** *Assignment of human glutaryl-CoA dehydrogenase gene (GCDH) to the short arm of chromosome 19 (19p13.2) by in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis.* Genomics, 21(1): p. 289-90, 1994.
112. **Koeller DM, DiGiulio KA, Angeloni SV, Dowler LL, Frerman FE, White RA, and Goodman SI.** *Cloning, structure, and chromosome localization of the mouse glutaryl-CoA dehydrogenase gene.* Genomics, 28(3): p. 508-12, 1995.
113. **Institute of Medical Genetics in Cardiff.** *The Human Gene Mutation Database.* Abgerufen am 29.11.2019. URL: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
114. **Zschocke J, Quak E, Guldberg P, and Hoffmann GF.** *Mutation analysis in glutaric aciduria type I.* J Med Genet, 37(3): p. 177-81, 2000.
115. **Goodman SI, Stein DE, Schlesinger S, Christensen E, Schwartz M, Greenberg CR, and Elpeleg ON.** *Glutaryl-CoA dehydrogenase mutations in glutaric acidemia (type I): review and report of thirty novel mutations.* Hum Mutat, 12(3): p. 141-4, 1998.
116. **Morton DH, Bennett MJ, Seargeant LE, Nichter CA, and Kelley RI.** *Glutaric aciduria type I: a common cause of episodic encephalopathy and spastic paralysis in the Amish of Lancaster County, Pennsylvania.* Am J Med Genet, 41(1): p. 89-95, 1991.
117. **Haworth JC, Booth FA, Chudley AE, deGroot GW, Dilling LA, Goodman SI, Greenberg CR, Mallory CJ, McClarty BM, Seshia SS, et al.** *Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds.* J Pediatr, 118(1): p. 52-8, 1991.

118. **Greenberg CR, Reimer D, Singal R, Triggs-Raine B, Chudley AE, Dilling LA, Philipps S, Haworth JC, Seargeant LE, and Goodman SI.** *A G-to-T transversion at the +5 position of intron 1 in the glutaryl CoA dehydrogenase gene is associated with the Island Lake variant of glutaric acidemia type I.* Hum Mol Genet, 4(3): p. 493-5, 1995.
119. **Goodman SI.** *Prenatal diagnosis of glutaric acidemias.* Prenat Diagn, 21(13): p. 1167-8, 2001.
120. **Kyllerman M and Steen G.** *Glutaric aciduria. A "common" metabolic disorder?* Arch Fr Pediatr, 37(4): p. 279, 1980.
121. **Stefl S, Nishi H, Petukh M, Panchenko AR, and Alexov E.** *Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations.* J Mol Biol, 425(21): p. 3919-36, 2013.
122. **Neupert W.** *A mitochondrial odyssey.* Annu Rev Biochem, 81: p. 1-33, 2012.
123. **Pankow S, Bamberger C, Calzolari D, Martinez-Bartolome S, Lavallee-Adam M, Balch WE, and Yates JR, 3rd.** *F508 CFTR interactome remodelling promotes rescue of cystic fibrosis.* Nature, 528(7583): p. 510-6, 2015.
124. **Taylor RG, Walker DC, and McInnes RR.** *E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing.* Nucleic Acids Res, 21(7): p. 1677-8, 1993.
125. **Daegelen P, Studier FW, Lenski RE, Cure S, and Kim JF.** *Tracing ancestors and relatives of Escherichia coli B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3).* J Mol Biol, 394(4): p. 634-43, 2009.
126. **Gluzman Y.** *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.* Cell, 23(1): p. 175-82, 1981.
127. **Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, and Koprowski H.** *Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 52: p. 53-9, 1964.
128. **Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, and Boeke JD.** *Designer deletion strains derived from Saccharomyces cerevisiae S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications.* Yeast, 14(2): p. 115-32, 1998.
129. **Mortimer RK and Johnston JR.** *Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center.* Genetics, 113(1): p. 35-43, 1986.
130. **Froger A and Hall JE.** *Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method.* J Vis Exp, (6): p. 253, 2007.
131. **Hanahan D, Jessee J, and Bloom FR.** *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria.* Methods Enzymol, 204: p. 63-113, 1991.
132. **Tan SC and Yiap BC.** *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present.* J Biomed Biotechnol, 2009: p. 574398, 2009.
133. **Tataurov AV, You Y, and Owczarzy R.** *Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids.* Biophys Chem, 133(1-3): p. 66-70, 2008.
134. **Barbas CF, 3rd, Burton DR, Scott JK, and Silverman GJ.** *Quantitation of DNA and RNA.* CSH Protoc, 2007: p. pdb ip47, 2007.
135. **Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, and Marky LA.** *Predicting DNA duplex stability from the base sequence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 83(11): p. 3746-50, 1986.
136. **Sugimoto N, Nakano S, Yoneyama M, and Honda K.** *Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes.* Nucleic Acids Res, 24(22): p. 4501-5, 1996.

137. **Lorenz TC.** *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies.* J Vis Exp, (63): p. e3998, 2012.
138. **Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, and Kim YH.** *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments.* J Vis Exp, (62), 2012.
139. **Landy A.** *Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination.* Annu Rev Biochem, 58: p. 913-49, 1989.
140. **Hartley JL, Temple GF, and Brasch MA.** *DNA cloning using in vitro site-specific recombination.* Genome Res, 10(11): p. 1788-95, 2000.
141. **Cheo DL, Titus SA, Byrd DR, Hartley JL, Temple GF, and Brasch MA.** *Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: functional analysis of multi-segment expression clones.* Genome Res, 14(10B): p. 2111-20, 2004.
142. **Kozak M.** *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.* Nucleic Acids Res, 15(20): p. 8125-48, 1987.
143. **Bryksin AV and Matsumura I.** *Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids.* Biotechniques, 48(6): p. 463-5, 2010.
144. **Bernard P and Couturier M.** *Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes.* J Mol Biol, 226(3): p. 735-45, 1992.
145. **Xu JZ and Zhang WG.** *Strategies used for genetically modifying bacterial genome: site-directed mutagenesis, gene inactivation, and gene over-expression.* J Zhejiang Univ Sci B, 17(2): p. 83-99, 2016.
146. **Laible M and Boonrod K.** *Homemade site directed mutagenesis of whole plasmids.* J Vis Exp, (27), 2009.
147. **Pingoud A and Jeltsch A.** *Structure and function of type II restriction endonucleases.* Nucleic Acids Res, 29(18): p. 3705-27, 2001.
148. **Siwek W, Czapinska H, Bochtler M, Bujnicki JM, and Skowronek K.** *Crystal structure and mechanism of action of the N6-methyladenine-dependent type IIM restriction endonuclease R.DpnI.* Nucleic Acids Res, 40(15): p. 7563-72, 2012.
149. **den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, and Taschner PE.** *HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update.* Hum Mutat, 37(6): p. 564-9, 2016.
150. **Radha Rama Devi A, Ramesh VA, Nagarajaram HA, Satish SP, Jayanthi U, and Lingappa L.** *Spectrum of mutations in Glutaryl-CoA dehydrogenase gene in glutaric aciduria type I--Study from South India.* Brain Dev, 38(1): p. 54-60, 2016.
151. **Keyser B, Muhlhausen C, Dickmanns A, Christensen E, Muschol N, Ullrich K, and Braulke T.** *Disease-causing missense mutations affect enzymatic activity, stability and oligomerization of glutaryl-CoA dehydrogenase (GCDH).* Hum Mol Genet, 17(24): p. 3854-63, 2008.
152. **Andresen BS, Bross P, Udvari S, Kirk J, Gray G, Kmoch S, Chamoles N, Knudsen I, Winter V, Wilcken B, et al.** *The molecular basis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency in compound heterozygous patients: is there correlation between genotype and phenotype?* Hum Mol Genet, 6(5): p. 695-707, 1997.
153. **Matsubara Y, Narisawa K, Miyabayashi S, Tada K, Coates PM, Bachmann C, Elsas LJ, 2nd, Pollitt RJ, Rhead WJ, and Roe CR.** *Identification of a common mutation in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* Biochem Biophys Res Commun, 171(1): p. 498-505, 1990.

154. **Waddell L, Wiley V, Carpenter K, Bennetts B, Angel L, Andresen BS, and Wilcken B.** *Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: genotype-biochemical phenotype correlations.* Mol Genet Metab, 87(1): p. 32-9, 2006.
155. **Maier EM, Liebl B, Roschinger W, Nennstiel-Ratzel U, Fingerhut R, Olgemoller B, Busch U, Krone N, v Kries R, and Roscher AA.** *Population spectrum of ACADM genotypes correlated to biochemical phenotypes in newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* Hum Mutat, 25(5): p. 443-52, 2005.
156. **Purevsuren J, Kobayashi H, Hasegawa Y, Mushimoto Y, Li H, Fukuda S, Shigematsu Y, Fukao T, and Yamaguchi S.** *A novel molecular aspect of Japanese patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCADD): c.449-452delCTGA is a common mutation in Japanese patients with MCADD.* Mol Genet Metab, 96(2): p. 77-9, 2009.
157. **Andresen BS, Vianey-Saban C, Bross P, Divry P, Roe CR, Nada MA, Knudsen I, and Gregersen N.** *The mutational spectrum in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency.* J Inherit Metab Dis, 19(2): p. 169-72, 1996.
158. **Maier EM, Gersting SW, Kemter KF, Jank JM, Reindl M, Messing DD, Truger MS, Sommerhoff CP, and Muntau AC.** *Protein misfolding is the molecular mechanism underlying MCADD identified in newborn screening.* Hum Mol Genet, 18(9): p. 1612-23, 2009.
159. **Moore GE, Gerner RE, and Franklin HA.** *Culture of normal human leukocytes.* JAMA, 199(8): p. 519-24, 1967.
160. **Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, and Hofschneider PH.** *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.* EMBO J, 1(7): p. 841-5, 1982.
161. **Ong SE and Mann M.** *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative.* Nat Chem Biol, 1(5): p. 252-62, 2005.
162. **Ong SE and Mann M.** *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics.* Methods Mol Biol, 359: p. 37-52, 2007.
163. **Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, and Mann M.** *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.* Mol Cell Proteomics, 1(5): p. 376-86, 2002.
164. **Ong SE and Mann M.** *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).* Nat Protoc, 1(6): p. 2650-60, 2006.
165. **Van Hoof D, Pinkse MW, Oostwaard DW, Mummery CL, Heck AJ, and Krijgsveld J.** *An experimental correction for arginine-to-proline conversion artifacts in SILAC-based quantitative proteomics.* Nat Methods, 4(9): p. 677-8, 2007.
166. **Bergman LW.** *Growth and maintenance of yeast.* Methods Mol Biol, 177: p. 9-14, 2001.
167. **Boldogh I, Vojtov N, Karmon S, and Pon LA.** *Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p.* J Cell Biol, 141(6): p. 1371-81, 1998.
168. **Daum G, Bohni PC, and Schatz G.** *Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria.* J Biol Chem, 257(21): p. 13028-33, 1982.
169. **Meeusen S, McCaffery JM, and Nunnari J.** *Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro.* Science, 305(5691): p. 1747-52, 2004.
170. **Boldogh IR and Pon LA.** *Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Methods Cell Biol, 80: p. 45-64, 2007.

171. **Gregg C, Kyryakov P, and Titorenko VI.** *Purification of mitochondria from yeast cells.* J Vis Exp, (30), 2009.
172. **Kiseleva E, Allen TD, Rutherford SA, Murray S, Morozova K, Gardiner F, Goldberg MW, and Drummond SP.** *A protocol for isolation and visualization of yeast nuclei by scanning electron microscopy (SEM).* Nat Protoc, 2(8): p. 1943-53, 2007.
173. **Holm C, Meeks-Wagner DW, Fangman WL, and Botstein D.** *A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast.* Gene, 42(2): p. 169-73, 1986.
174. **Pallotti F and Lenaz G.** *Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines.* Methods Cell Biol, 80: p. 3-44, 2007.
175. **Gottesman S.** *Proteases and their targets in Escherichia coli.* Annu Rev Genet, 30: p. 465-506, 1996.
176. **Groberg J and Dunn JJ.** *ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification.* J Bacteriol, 170(3): p. 1245-53, 1988.
177. **Brunner M and Neupert W.** *Purification and characterization of mitochondrial processing peptidase of Neurospora crassa.* Methods Enzymol, 248: p. 717-28, 1995.
178. **Hunt T and Jackson RJ.** *The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA.* Hamatol Bluttransfus, 14: p. 300-7, 1974.
179. **Pelham HR and Jackson RJ.** *An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.* Eur J Biochem, 67(1): p. 247-56, 1976.
180. **Stueber D, Ibrahimi I, Cutler D, Dobberstein B, and Bujard H.** *A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences.* EMBO J, 3(13): p. 3143-8, 1984.
181. **Ji H.** *Lysis of cultured animal cells, yeast, and bacteria for immunoblotting.* Cold Spring Harb Protoc, 2010(8): p. pdb prot5467, 2010.
182. **Ji H.** *Lysis of cultured cells for immunoprecipitation.* Cold Spring Harb Protoc, 2010(8): p. pdb prot5466, 2010.
183. **Koley D and Bard AJ.** *Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM).* Proc Natl Acad Sci U S A, 107(39): p. 16783-7, 2010.
184. **Hubner NC and Mann M.** *Extracting gene function from protein-protein interactions using Quantitative BAC InteraCtomics (QUBIC).* Methods, 53(4): p. 453-9, 2011.
185. **Cuatrecasas P and Wilchek M.** *Single-step purification of avidine from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns.* Biochem Biophys Res Commun, 33(2): p. 235-9, 1968.
186. **Kapust RB and Waugh DS.** *Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused.* Protein Sci, 8(8): p. 1668-74, 1999.
187. **Raran-Kurussi S and Waugh DS.** *The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated.* PLoS One, 7(11): p. e49589, 2012.
188. **Lathe GH and Ruthven CR.** *The separation of substances on the basis of their molecular weights, using columns of starch and water.* Biochem J, 60(4): p. xxxiv, 1955.
189. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, and Wang X.** *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.* Science, 275(5303): p. 1129-32, 1997.

190. **Bradford MM.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 72: p. 248-54, 1976.
191. **Zor T and Selinger Z.** *Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies.* Anal Biochem, 236(2): p. 302-8, 1996.
192. **Shapiro AL, Vinuela E, and Maizel JV, Jr.** *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.* Biochem Biophys Res Commun, 28(5): p. 815-20, 1967.
193. **Weber K and Osborn M.** *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.* J Biol Chem, 244(16): p. 4406-12, 1969.
194. **Laemmli UK.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 227(5259): p. 680-5, 1970.
195. **Schagger H and von Jagow G.** *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.* Anal Biochem, 199(2): p. 223-31, 1991.
196. **Wittig I, Braun HP, and Schagger H.** *Blue native PAGE.* Nat Protoc, 1(1): p. 418-28, 2006.
197. **Fazekas de St Groth S, Webster RG, and Datyner A.** *Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.* Biochim Biophys Acta, 71: p. 377-91, 1963.
198. **Chevallet M, Luche S, and Rabilloud T.** *Silver staining of proteins in polyacrylamide gels.* Nat Protoc, 1(4): p. 1852-8, 2006.
199. **Towbin H, Staehelin T, and Gordon J.** *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 76(9): p. 4350-4, 1979.
200. **Burnette WN.** *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.* Anal Biochem, 112(2): p. 195-203, 1981.
201. **Kurien BT and Scofield RH.** *Introduction to protein blotting.* Methods Mol Biol, 536: p. 9-22, 2009.
202. **Kurien BT and Scofield RH.** *Protein blotting: a review.* J Immunol Methods, 274(1-2): p. 1-15, 2003.
203. **Kurien BT and Scofield RH.** *Western blotting.* Methods, 38(4): p. 283-93, 2006.
204. **Mahmood T and Yang PC.** *Western blot: technique, theory, and trouble shooting.* N Am J Med Sci, 4(9): p. 429-34, 2012.
205. **Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, and Hammond M.** *A defined methodology for reliable quantification of Western blot data.* Mol Biotechnol, 55(3): p. 217-26, 2013.
206. **Thorpe GH, Kricka LJ, Moseley SB, and Whitehead TP.** *Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays.* Clin Chem, 31(8): p. 1335-41, 1985.
207. **Mruk DD and Cheng CY.** *Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits.* Spermatogenesis, 1(2): p. 121-122, 2011.
208. **Kaufmann SH, Ewing CM, and Shaper JH.** *The erasable Western blot.* Anal Biochem, 161(1): p. 89-95, 1987.

209. **Storey CC, Mearns G, and Richmond SJ.** *Immune dot blot technique for diagnosing infection with Chlamydia trachomatis.* Genitourin Med, 63(6): p. 375-9, 1987.
210. **Panigrahi D, Burks M, Hariharan H, and Finkelstein RA.** *Evaluation of immuno-dot-blot assay for detection of cholera-related enterotoxin antigen in Salmonella typhimurium.* J Clin Microbiol, 25(4): p. 702-5, 1987.
211. **Hube F, Myal Y, and Leygue E.** *The promoter competition assay (PCA): a new approach to identify motifs involved in the transcriptional activity of reporter genes.* Front Biosci, 11: p. 1577-84, 2006.
212. **Ryan MT, Voos W, and Pfanner N.** *Assaying protein import into mitochondria.* Methods Cell Biol, 65: p. 189-215, 2001.
213. **Phizicky EM and Fields S.** *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis.* Microbiol Rev, 59(1): p. 94-123, 1995.
214. **Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, Rau C, Jensen LJ, Bastuck S, Dumpelfeld B, et al.** *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery.* Nature, 440(7084): p. 631-6, 2006.
215. **Gingras AC, Gstaiger M, Raught B, and Aebersold R.** *Analysis of protein complexes using mass spectrometry.* Nat Rev Mol Cell Biol, 8(8): p. 645-54, 2007.
216. **Kocher T and Superti-Furga G.** *Mass spectrometry-based functional proteomics: from molecular machines to protein networks.* Nat Methods, 4(10): p. 807-15, 2007.
217. **Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, Li J, Pu S, Datta N, Tikuisis AP, et al.** *Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Nature, 440(7084): p. 637-43, 2006.
218. **Hubner NC, Bird AW, Cox J, Splettstoesser B, Bandilla P, Poser I, Hyman A, and Mann M.** *Quantitative proteomics combined with BAC TransgeneOmics reveals in vivo protein interactions.* J Cell Biol, 189(4): p. 739-54, 2010.
219. **Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, and Whitehouse CM.** *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules.* Science, 246(4926): p. 64-71, 1989.
220. **Choe YJ, Park SH, Hassemer T, Korner R, Vincenz-Donnelly L, Hayer-Hartl M, and Hartl FU.** *Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress.* Nature, 531(7593): p. 191-5, 2016.
221. **Cox J and Mann M.** *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.* Nat Biotechnol, 26(12): p. 1367-72, 2008.
222. **Keilhauer EC, Hein MY, and Mann M.** *Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS).* Mol Cell Proteomics, 14(1): p. 120-35, 2015.
223. **Schwanhauser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, and Selbach M.** *Global quantification of mammalian gene expression control.* Nature, 473(7347): p. 337-42, 2011.
224. **Kaboord B and Perr M.** *Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation.* Methods Mol Biol, 424: p. 349-64, 2008.
225. **De Las Rivas J and Fontanillo C.** *Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks.* PLoS Comput Biol, 6(6): p. e1000807, 2010.

226. **Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, and Miyawaki A.** *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications.* Nat Biotechnol, 20(1): p. 87-90, 2002.
227. **Inouye S and Shimomura O.** *The use of Renilla luciferase, Oplophorus luciferase, and apoaequorin as bioluminescent reporter protein in the presence of coelenterazine analogues as substrate.* Biochem Biophys Res Commun, 233(2): p. 349-53, 1997.
228. **Wu P and Brand L.** *Resonance energy transfer: methods and applications.* Anal Biochem, 218(1): p. 1-13, 1994.
229. **Brown NE, Blumer JB, and Hepler JR.** *Bioluminescence resonance energy transfer to detect protein-protein interactions in live cells.* Methods Mol Biol, 1278: p. 457-65, 2015.
230. **Gersting SW, Lotz-Havla AS, and Muntau AC.** *Bioluminescence resonance energy transfer: an emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells.* Methods Mol Biol, 815: p. 253-63, 2012.
231. **Hamdan FF, Percherancier Y, Breton B, and Bouvier M.** *Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET).* Curr Protoc Neurosci, Chapter 5: p. Unit 5 23, 2006.
232. **Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, Shinjo F, Liu Y, Dembowy J, Taylor IW, et al.** *High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells.* Science, 307(5715): p. 1621-5, 2005.
233. **Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, Kayatekin C, Westover KD, Karras GI, and Lindquist S.** *Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition.* Cell, 150(5): p. 987-1001, 2012.
234. **Taipale M, Krykbaeva I, Whitesell L, Santagata S, Zhang J, Liu Q, Gray NS, and Lindquist S.** *Chaperones as thermodynamic sensors of drug-target interactions reveal kinase inhibitor specificities in living cells.* Nat Biotechnol, 31(7): p. 630-7, 2013.
235. **Taipale M, Tucker G, Peng J, Krykbaeva I, Lin ZY, Larsen B, Choi H, Berger B, Gingras AC, and Lindquist S.** *A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways.* Cell, 158(2): p. 434-48, 2014.
236. **Blasche S and Koegl M.** *Analysis of protein-protein interactions using LUMIER assays.* Methods Mol Biol, 1064: p. 17-27, 2013.
237. **Tanaka K, Yokota I, Coates PM, Strauss AW, Kelly DP, Zhang Z, Gregersen N, Andresen BS, Matsubara Y, Curtis D, et al.** *Mutations in the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) gene.* Hum Mutat, 1(4): p. 271-9, 1992.
238. **Waters PJ.** *How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression.* Hum Mutat, 21(4): p. 357-69, 2003.
239. **Livnat-Levanon N and Glickman MH.** *Ubiquitin-proteasome system and mitochondria - reciprocity.* Biochim Biophys Acta, 1809(2): p. 80-7, 2011.
240. **Heo JM and Rutter J.** *Ubiquitin-dependent mitochondrial protein degradation.* Int J Biochem Cell Biol, 43(10): p. 1422-6, 2011.
241. **Barrios-Rodiles M, Ellis JD, Blencowe BJ, and Wrana JL.** *LUMIER: A Discovery Tool for Mammalian Protein Interaction Networks.* Methods Mol Biol, 1550: p. 137-148, 2017.
242. **Nakagawa C, Inahata K, Nishimura S, and Sugimoto K.** *Improvement of a Venus-based bimolecular fluorescence complementation assay to visualize bFos-bJun interaction in living cells.* Biosci Biotechnol Biochem, 75(7): p. 1399-401, 2011.

243. **Ransone LJ, Visvader J, Lamph WW, Sassone-Corsi P, and Verma IM.** *fos and jun interaction: the role of the leucine zipper.* Int J Cancer Suppl, 4: p. 10-21, 1989.
244. **Rohne P, Prochnow H, Wolf S, Renner B, and Koch-Brandt C.** *The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment.* Cell Physiol Biochem, 34(5): p. 1626-39, 2014.
245. **Richter K, Haslbeck M, and Buchner J.** *The heat shock response: life on the verge of death.* Mol Cell, 40(2): p. 253-66, 2010.
246. **Michel D, Chatelain G, North S, and Brun G.** *Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene.* Biochem J, 328 (Pt 1): p. 45-50, 1997.
247. **Lee S, Sowa ME, Watanabe YH, Sigler PB, Chiu W, Yoshida M, and Tsai FT.** *The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state.* Cell, 115(2): p. 229-40, 2003.
248. **Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, and Reed JC.** *BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70.* EMBO J, 16(16): p. 4887-96, 1997.
249. **Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, and Behl C.** *Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3.* EMBO J, 28(7): p. 889-901, 2009.
250. **Gehrmann M, Marienhagen J, Eichholtz-Wirth H, Fritz E, Ellwart J, Jaattela M, Zilch T, and Multhoff G.** *Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells.* Cell Death Differ, 12(1): p. 38-51, 2005.
251. **Kalia SK, Lee S, Smith PD, Liu L, Crocker SJ, Thorarinsdottir TE, Glover JR, Fon EA, Park DS, and Lozano AM.** *BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration.* Neuron, 44(6): p. 931-45, 2004.
252. **Takayama S, Xie Z, and Reed JC.** *An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators.* J Biol Chem, 274(2): p. 781-6, 1999.
253. **Kabbage M and Dickman MB.** *The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators.* Cell Mol Life Sci, 65(9): p. 1390-402, 2008.
254. **Otto H, Conz C, Maier P, Wolfle T, Suzuki CK, Jenö P, Rucknagel P, Stahl J, and Rospert S.** *The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 102(29): p. 10064-9, 2005.
255. **King FW, Wawrzynow A, Hohfeld J, and Zylicz M.** *Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53.* EMBO J, 20(22): p. 6297-305, 2001.
256. **Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, and Bouvier M.** *Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer.* J Biol Chem, 277(47): p. 44925-31, 2002.
257. **James JR, Oliveira MI, Carmo AM, Iaboni A, and Davis SJ.** *A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer.* Nat Methods, 3(12): p. 1001-6, 2006.
258. **Yamaguchi S, Brailey LL, Morizono H, Bale AE, and Tuchman M.** *Mutations and polymorphisms in the human ornithine transcarbamylase (OTC) gene.* Hum Mutat, 27(7): p. 626-32, 2006.
259. **Rodriguez-Pombo P, Navarrete R, Merinero B, Gomez-Puertas P, and Ugarte M.** *Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain.* Hum Mutat, 27(7): p. 715, 2006.

260. **Haberle J, Shchelochkov OA, Wang J, Katsonis P, Hall L, Reiss S, Eeds A, Willis A, Yadav M, Summar S, et al.** *Molecular defects in human carbamoyl phosphate synthetase I: mutational spectrum, diagnostic and protein structure considerations.* Hum Mutat, 32(6): p. 579-89, 2011.
261. **Smith EH, Thomas C, McHugh D, Gavrillov D, Raymond K, Rinaldo P, Tortorelli S, Matern D, Highsmith WE, and Oglesbee D.** *Allelic diversity in MCAD deficiency: the biochemical classification of 54 variants identified during 5 years of ACADM sequencing.* Mol Genet Metab, 100(3): p. 241-50, 2010.
262. **Rubenstein RC and Zeitlin PL.** *Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR.* Am J Physiol Cell Physiol, 278(2): p. C259-67, 2000.
263. **Schlecht R, Scholz SR, Dahmen H, Wegener A, Sirrenberg C, Musil D, Bomke J, Eggenweiler HM, Mayer MP, and Bukau B.** *Functional analysis of Hsp70 inhibitors.* PLoS One, 8(11): p. e78443, 2013.
264. **Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, Macias AT, Daniels Z, Geoffroy S, Dopson M, et al.** *A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells.* Cancer Chemother Pharmacol, 66(3): p. 535-45, 2010.
265. **Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, Daniels Z, Dokurno P, Drysdale MJ, Foloppe N, Francis GL, Graham CJ, Howes R, et al.** *Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design.* J Med Chem, 52(6): p. 1510-3, 2009.
266. **Leu JI, Pimkina J, Pandey P, Murphy ME, and George DL.** *HSP70 inhibition by the small-molecule 2-phenylethynylsulfonamide impairs protein clearance pathways in tumor cells.* Mol Cancer Res, 9(7): p. 936-47, 2011.
267. **Nadler SG, Tepper MA, Schacter B, and Mazzucco CE.** *Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins.* Science, 258(5081): p. 484-6, 1992.
268. **Nadler SG, Dischino DD, Malacko AR, Cleaveland JS, Fujihara SM, and Marquardt H.** *Identification of a binding site on Hsc70 for the immunosuppressant 15-deoxyspergualin.* Biochem Biophys Res Commun, 253(1): p. 176-80, 1998.
269. **Iftinca M, Flynn R, Basso L, Melo H, Aboushousha R, Taylor L, and Altier C.** *The stress protein heat shock cognate 70 (Hsc70) inhibits the Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) channel.* Mol Pain, 12, 2016.
270. **Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, et al.** *A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology.* Cell, 134(1): p. 112-23, 2008.
271. **Calvo SE, Clauser KR, and Mootha VK.** *MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins.* Nucleic Acids Res, 44(D1): p. D1251-7, 2016.
272. **Gammage PA and Frezza C.** *Mitochondrial DNA: the overlooked oncogenome?* BMC Biol, 17(1): p. 53, 2019.
273. **Gustafsson CM, Falkenberg M, and Larsson NG.** *Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA.* Annu Rev Biochem, 85: p. 133-60, 2016.
274. **Scarpulla RC.** *Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function.* Physiol Rev, 88(2): p. 611-38, 2008.
275. **Shutt TE and Shadel GS.** *A compendium of human mitochondrial gene expression machinery with links to disease.* Environ Mol Mutagen, 51(5): p. 360-79, 2010.

276. **Pfanner N, Warscheid B, and Wiedemann N.** *Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks.* Nat Rev Mol Cell Biol, 20(5): p. 267-284, 2019.
277. **Vidal M, Cusick ME, and Barabasi AL.** *Interactome networks and human disease.* Cell, 144(6): p. 986-98, 2011.
278. **Przulj N, Wigle DA, and Jurisica I.** *Functional topology in a network of protein interactions.* Bioinformatics, 20(3): p. 340-8, 2004.
279. **Strong M and Eisenberg D.** *The protein network as a tool for finding novel drug targets.* Prog Drug Res, 64: p. 191, 193-215, 2007.
280. **Stumpf MP, Thorne T, de Silva E, Stewart R, An HJ, Lappe M, and Wiuf C.** *Estimating the size of the human interactome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 105(19): p. 6959-64, 2008.
281. **Wells JA and McClendon CL.** *Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces.* Nature, 450(7172): p. 1001-9, 2007.
282. **Jubb HC, Pandurangan AP, Turner MA, Ochoa-Montano B, Blundell TL, and Ascher DB.** *Mutations at protein-protein interfaces: Small changes over big surfaces have large impacts on human health.* Prog Biophys Mol Biol, 128: p. 3-13, 2017.
283. **Sahni N, Yi S, Zhong Q, Jaikhani N, Charloteaux B, Cusick ME, and Vidal M.** *Edgotype: a fundamental link between genotype and phenotype.* Curr Opin Genet Dev, 23(6): p. 649-57, 2013.
284. **Porta-Pardo E, Garcia-Alonso L, Hrabe T, Dopazo J, and Godzik A.** *A Pan-Cancer Catalogue of Cancer Driver Protein Interaction Interfaces.* PLoS Comput Biol, 11(10): p. e1004518, 2015.
285. **Pires DE, Chen J, Blundell TL, and Ascher DB.** *In silico functional dissection of saturation mutagenesis: Interpreting the relationship between phenotypes and changes in protein stability, interactions and activity.* Sci Rep, 6: p. 19848, 2016.
286. **Wang X, Wei X, Thijssen B, Das J, Lipkin SM, and Yu H.** *Three-dimensional reconstruction of protein networks provides insight into human genetic disease.* Nat Biotechnol, 30(2): p. 159-64, 2012.
287. **Tuchman M, Plante RJ, Garcia-Perez MA, and Rubio V.** *Relative frequency of mutations causing ornithine transcarbamylase deficiency in 78 families.* Hum Genet, 97(3): p. 274-6, 1996.
288. **Pena LD, van Calcar SC, Hansen J, Edick MJ, Walsh Vockley C, Leslie N, Cameron C, Mohsen AW, Berry SA, Arnold GL, et al.** *Outcomes and genotype-phenotype correlations in 52 individuals with VLCAD deficiency diagnosed by NBS and enrolled in the IBEM-IS database.* Mol Genet Metab, 118(4): p. 272-81, 2016.
289. **Patel MS and Harris RA.** *Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes: gene regulation and genetic defects.* FASEB J, 9(12): p. 1164-72, 1995.
290. **Takakubo F, Cartwright P, Hoogenraad N, Thorburn DR, Collins F, Lithgow T, and Dahl HH.** *An amino acid substitution in the pyruvate dehydrogenase E1 alpha gene, affecting mitochondrial import of the precursor protein.* Am J Hum Genet, 57(4): p. 772-80, 1995.
291. **Danpure CJ.** *Primary hyperoxaluria type 1: AGT mistargeting highlights the fundamental differences between the peroxisomal and mitochondrial protein import pathways.* Biochim Biophys Acta, 1763(12): p. 1776-84, 2006.
292. **Kojima W, Kujuro Y, Okatsu K, Bruno Q, Koyano F, Kimura M, Yamano K, Tanaka K, and Matsuda N.** *Unexpected mitochondrial matrix localization of Parkinson's disease-related DJ-1 mutants but not wild-type DJ-1.* Genes Cells, 21(7): p. 772-88, 2016.

293. **Davey KM, Parboosingh JS, McLeod DR, Chan A, Casey R, Ferreira P, Snyder FF, Bridge PJ, and Bernier FP.** *Mutation of DNAJC19, a human homologue of yeast inner mitochondrial membrane co-chaperones, causes DCMA syndrome, a novel autosomal recessive Barth syndrome-like condition.* J Med Genet, 43(5): p. 385-93, 2006.
294. **Rothbauer U, Hofmann S, Muhlenbein N, Paschen SA, Gerbitz KD, Neupert W, Brunner M, and Bauer MF.** *Role of the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria.* J Biol Chem, 276(40): p. 37327-34, 2001.
295. **Hansen JJ, Durr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, Davoine CS, Brice A, Fontaine B, Gregersen N, et al.** *Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60.* Am J Hum Genet, 70(5): p. 1328-32, 2002.
296. **Briones P, Vilaseca MA, Ribes A, Vernet A, Lluch M, Cusi V, Huckriede A, and Agsteribbe E.** *A new case of multiple mitochondrial enzyme deficiencies with decreased amount of heat shock protein 60.* J Inherit Metab Dis, 20(4): p. 569-77, 1997.
297. **Agsteribbe E, Huckriede A, Veenhuis M, Ruiters MH, Niezen-Koning KE, Skjeldal OH, Skullerud K, Gupta RS, Hallberg R, van Diggelen OP, et al.** *A fatal, systemic mitochondrial disease with decreased mitochondrial enzyme activities, abnormal ultrastructure of the mitochondria and deficiency of heat shock protein 60.* Biochem Biophys Res Commun, 193(1): p. 146-54, 1993.
298. **Yano H, Baranov SV, Baranova OV, Kim J, Pan Y, Yablonska S, Carlisle DL, Ferrante RJ, Kim AH, and Friedlander RM.** *Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin.* Nat Neurosci, 17(6): p. 822-31, 2014.
299. **Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, Hu X, McCoy J, Chu CT, Burton EA, et al.** *alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease.* Sci Transl Med, 8(342): p. 342ra78, 2016.
300. **Koenig MK.** *Presentation and diagnosis of mitochondrial disorders in children.* Pediatr Neurol, 38(5): p. 305-13, 2008.
301. **David A, Razali R, Wass MN, and Sternberg MJ.** *Protein-protein interaction sites are hot spots for disease-associated nonsynonymous SNPs.* Hum Mutat, 33(2): p. 359-63, 2012.
302. **Pfanner N and Wiedemann N.** *Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases.* Curr Opin Cell Biol, 14(4): p. 400-11, 2002.
303. **Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, and Barton GJ.** *JPred4: a protein secondary structure prediction server.* Nucleic Acids Res, 43(W1): p. W389-94, 2015.
304. **Bedwell DM, Strobel SA, Yun K, Jongeward GD, and Emr SD.** *Sequence and structural requirements of a mitochondrial protein import signal defined by saturation cassette mutagenesis.* Mol Cell Biol, 9(3): p. 1014-25, 1989.
305. **Isaya G, Fenton WA, Hendrick JP, Furtak K, Kalousek F, and Rosenberg LE.** *Mitochondrial import and processing of mutant human ornithine transcarbamylase precursors in cultured cells.* Mol Cell Biol, 8(12): p. 5150-8, 1988.
306. **Chen WJ and Douglas MG.** *The role of protein structure in the mitochondrial import pathway. Unfolding of mitochondrially bound precursors is required for membrane translocation.* J Biol Chem, 262(32): p. 15605-9, 1987.
307. **Chen WJ and Douglas MG.** *The role of protein structure in the mitochondrial import pathway. Analysis of the soluble F1-ATPase beta-subunit precursor.* J Biol Chem, 262(32): p. 15598-604, 1987.

308. **Naito E, Indo Y, and Tanaka K.** *Identification of two variant short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase alleles, each containing a different point mutation in a patient with short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency.* J Clin Invest, 85(5): p. 1575-82, 1990.
309. **Jank JM, Maier EM, Reibeta DD, Haslbeck M, Kemter KF, Truger MS, Sommerhoff CP, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Gersting SW, et al.** *The domain-specific and temperature-dependent protein misfolding phenotype of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase.* PLoS One, 9(4): p. e93852, 2014.
310. **Street TO, Zeng X, Pellarin R, Bonomi M, Sali A, Kelly MJ, Chu F, and Agard DA.** *Elucidating the mechanism of substrate recognition by the bacterial Hsp90 molecular chaperone.* J Mol Biol, 426(12): p. 2393-404, 2014.
311. **Erbse A, Mayer MP, and Bukau B.** *Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones.* Biochem Soc Trans, 32(Pt 4): p. 617-21, 2004.
312. **Marcinowski M, Rosam M, Seitz C, Elferich J, Behnke J, Bello C, Feige MJ, Becker CF, Antes I, and Buchner J.** *Conformational selection in substrate recognition by Hsp70 chaperones.* J Mol Biol, 425(3): p. 466-74, 2013.
313. **Randall SK and Shore GC.** *Import of a mutant mitochondrial precursor fails to respond to stimulation by a cytosolic factor.* FEBS Lett, 250(2): p. 561-4, 1989.
314. **Hachiya N, Alam R, Sakasegawa Y, Sakaguchi M, Mihara K, and Omura T.** *A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins.* EMBO J, 12(4): p. 1579-86, 1993.
315. **Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Katrakili N, Plaitakis A, and Tokatlidis K.** *Import of a major mitochondrial enzyme depends on synergy between two distinct helices of its presequence.* Biochem J, 473(18): p. 2813-29, 2016.
316. **Zahedi RP, Sickmann A, Boehm AM, Winkler C, Zufall N, Schonfisch B, Guiard B, Pfanner N, and Meisinger C.** *Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins.* Mol Biol Cell, 17(3): p. 1436-50, 2006.
317. **Stan T, Ahting U, Dembowski M, Kunkele KP, Nussberger S, Neupert W, and Rapaport D.** *Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria.* EMBO J, 19(18): p. 4895-902, 2000.
318. **Yamamoto H, Fukui K, Takahashi H, Kitamura S, Shiota T, Terao K, Uchida M, Esaki M, Nishikawa S, Yoshihisa T, et al.** *Roles of Tom70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins.* J Biol Chem, 284(46): p. 31635-46, 2009.
319. **Zwizinski C and Neupert W.** *Precursor proteins are transported into mitochondria in the absence of proteolytic cleavage of the additional sequences.* J Biol Chem, 258(21): p. 13340-6, 1983.
320. **Brix J, Dietmeier K, and Pfanner N.** *Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70.* J Biol Chem, 272(33): p. 20730-5, 1997.
321. **Bedwell DM, Klionsky DJ, and Emr SD.** *The yeast F1-ATPase beta subunit precursor contains functionally redundant mitochondrial protein import information.* Mol Cell Biol, 7(11): p. 4038-47, 1987.
322. **Zara V, Palmieri F, Mahlke K, and Pfanner N.** *The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import.* J Biol Chem, 267(17): p. 12077-81, 1992.

323. **Hurt EC, Pesold-Hurt B, and Schatz G.** *The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix.* EMBO J, 3(13): p. 3149-56, 1984.
324. **Hurt EC, Pesold-Hurt B, and Schatz G.** *The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix.* FEBS Lett, 178(2): p. 306-10, 1984.
325. **Horwich AL, Kalousek F, Mellman I, and Rosenberg LE.** *A leader peptide is sufficient to direct mitochondrial import of a chimeric protein.* EMBO J, 4(5): p. 1129-35, 1985.
326. **Monteith WB, Cohen RD, Smith AE, Guzman-Cisneros E, and Pielak GJ.** *Quinary structure modulates protein stability in cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 112(6): p. 1739-42, 2015.
327. **Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, and Balch WE.** *Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency.* Annu Rev Biochem, 78: p. 959-91, 2009.
328. **Hipp MS, Park SH, and Hartl FU.** *Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases.* Trends Cell Biol, 24(9): p. 506-14, 2014.
329. **Peikert CD, Mani J, Morgenstern M, Kaser S, Knapp B, Wenger C, Harsman A, Oeljeklaus S, Schneider A, and Warscheid B.** *Charting organellar importomes by quantitative mass spectrometry.* Nat Commun, 8: p. 15272, 2017.
330. **Morgenstern M, Stiller SB, Lubbert P, Peikert CD, Dannenmaier S, Drepper F, Weill U, Hoss P, Feuerstein R, Gebert M, et al.** *Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale.* Cell Rep, 19(13): p. 2836-2852, 2017.
331. **Cusick ME, Klitgord N, Vidal M, and Hill DE.** *Interactome: gateway into systems biology.* Hum Mol Genet, 14 Spec No. 2: p. R171-81, 2005.
332. **Casas C.** *GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection.* Front Neurosci, 11: p. 177, 2017.
333. **Mogk A, Haslberger T, Tessarz P, and Bukau B.** *Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control.* Biochem Soc Trans, 36(Pt 1): p. 120-5, 2008.
334. **Haslberger T, Zdanowicz A, Brand I, Kirstein J, Turgay K, Mogk A, and Bukau B.** *Protein disaggregation by the AAA+ chaperone ClpB involves partial threading of looped polypeptide segments.* Nat Struct Mol Biol, 15(6): p. 641-50, 2008.
335. **Wynn RM, Davie JR, Chuang JL, Cote CD, and Chuang DT.** *Impaired assembly of E1 decarboxylase of the branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in type IA maple syrup urine disease.* J Biol Chem, 273(21): p. 13110-8, 1998.
336. **Cotecchia S, Stanasila L, and Diviani D.** *Protein-protein interactions at the adrenergic receptors.* Curr Drug Targets, 13(1): p. 15-27, 2012.
337. **Zhang T and Ye Y.** *The final moments of misfolded proteins en route to the proteasome.* DNA Cell Biol, 33(8): p. 477-83, 2014.
338. **Ye Y.** *Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase.* J Struct Biol, 156(1): p. 29-40, 2006.
339. **Meyer H, Bug M, and Bremer S.** *Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system.* Nat Cell Biol, 14(2): p. 117-23, 2012.
340. **Murakami K and Mori M.** *Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein.* EMBO J, 9(10): p. 3201-8, 1990.

341. **Murakami K, Tanase S, Morino Y, and Mori M.** *Presequence binding factor-dependent and -independent import of proteins into mitochondria.* J Biol Chem, 267(19): p. 13119-22, 1992.
342. **Ono H and Tuboi S.** *The cytosolic factor required for import of precursors of mitochondrial proteins into mitochondria.* J Biol Chem, 263(7): p. 3188-93, 1988.
343. **Eilers M, Hwang S, and Schatz G.** *Unfolding and refolding of a purified precursor protein during import into isolated mitochondria.* EMBO J, 7(4): p. 1139-45, 1988.
344. **Schleyer M and Neupert W.** *Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes.* Cell, 43(1): p. 339-50, 1985.
345. **Schwaiger M, Herzog V, and Neupert W.** *Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins.* J Cell Biol, 105(1): p. 235-46, 1987.
346. **Ahting U, Thieffry M, Engelhardt H, Hegerl R, Neupert W, and Nussberger S.** *Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria.* J Cell Biol, 153(6): p. 1151-60, 2001.
347. **Hill K, Model K, Ryan MT, Dietmeier K, Martin F, Wagner R, and Pfanner N.** *Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment].* Nature, 395(6701): p. 516-21, 1998.
348. **Kunkele KP, Heins S, Dembowski M, Nargang FE, Benz R, Thieffry M, Walz J, Lill R, Nussberger S, and Neupert W.** *The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.* Cell, 93(6): p. 1009-19, 1998.
349. **Lithgow T, Ryan M, Anderson RL, Hoj PB, and Hoogenraad NJ.** *A constitutive form of heat-shock protein 70 is located in the outer membranes of mitochondria from rat liver.* FEBS Lett, 332(3): p. 277-81, 1993.
350. **Mihara K and Omura T.** *Cytosolic factors in mitochondrial protein import.* Experientia, 52(12): p. 1063-8, 1996.
351. **Terada K, Ueda I, Ohtsuka K, Oda T, Ichiyama A, and Mori M.** *The requirement of heat shock cognate 70 protein for mitochondrial import varies among precursor proteins and depends on precursor length.* Mol Cell Biol, 16(11): p. 6103-9, 1996.
352. **Clerico EM, Tilitsky JM, Meng W, and Gierasch LM.** *How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions.* J Mol Biol, 427(7): p. 1575-88, 2015.
353. **Ramya TN, Karmodiya K, Surolia A, and Surolia N.** *15-deoxyspergualin primarily targets the trafficking of apicoplast proteins in Plasmodium falciparum.* J Biol Chem, 282(9): p. 6388-97, 2007.
354. **Smith MC, Scaglione KM, Assimon VA, Patury S, Thompson AD, Dickey CA, Southworth DR, Paulson HL, Gestwicki JE, and Zuiderweg ER.** *The E3 ubiquitin ligase CHIP and the molecular chaperone Hsc70 form a dynamic, tethered complex.* Biochemistry, 52(32): p. 5354-64, 2013.
355. **Fewell SW, Day BW, and Brodsky JL.** *Identification of an inhibitor of hsc70-mediated protein translocation and ATP hydrolysis.* J Biol Chem, 276(2): p. 910-4, 2001.
356. **Geminard C, Nault F, Johnstone RM, and Vidal M.** *Characteristics of the interaction between Hsc70 and the transferrin receptor in exosomes released during reticulocyte maturation.* J Biol Chem, 276(13): p. 9910-6, 2001.
357. **Tutar Y, Song Y, and Masison DC.** *Primate chaperones Hsc70 (constitutive) and Hsp70 (induced) differ functionally in supporting growth and prion propagation in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics, 172(2): p. 851-61, 2006.

358. **Goldfarb SB, Kashlan OB, Watkins JN, Suaud L, Yan W, Kleyman TR, and Rubenstein RC.** *Differential effects of Hsc70 and Hsp70 on the intracellular trafficking and functional expression of epithelial sodium channels.* Proc Natl Acad Sci U S A, 103(15): p. 5817-22, 2006.
359. **Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A, and Cyr DM.** *The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis.* EMBO J, 18(6): p. 1492-505, 1999.
360. **Fuller W and Cuthbert AW.** *Post-translational disruption of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-molecular chaperone complex with geldanamycin stabilizes delta F508 CFTR in the rabbit reticulocyte lysate.* J Biol Chem, 275(48): p. 37462-8, 2000.
361. **Rubenstein RC, Egan ME, and Zeitlin PL.** *In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR.* J Clin Invest, 100(10): p. 2457-65, 1997.
362. **Li J, Qian X, Hu J, and Sha B.** *Molecular chaperone Hsp70/Hsp90 prepares the mitochondrial outer membrane translocon receptor Tom71 for preprotein loading.* J Biol Chem, 284(35): p. 23852-9, 2009.
363. **Gava LM, Goncalves DC, Borges JC, and Ramos CH.** *Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the C-terminus of human 90kDa heat shock protein Hsp90 and the mitochondrial translocase of outer membrane Tom70.* Arch Biochem Biophys, 513(2): p. 119-25, 2011.
364. **Mukhopadhyay A, Avramova LV, and Weiner H.** *Tom34 unlike Tom20 does not interact with the leader sequences of mitochondrial precursor proteins.* Arch Biochem Biophys, 400(1): p. 97-104, 2002.
365. **Nuttall SD, Hanson BJ, Mori M, and Hoogenraad NJ.** *hTom34: a novel translocase for the import of proteins into human mitochondria.* DNA Cell Biol, 16(9): p. 1067-74, 1997.
366. **Young JC, Obermann WM, and Hartl FU.** *Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90.* J Biol Chem, 273(29): p. 18007-10, 1998.
367. **Chewawiwat N, Yano M, Terada K, Hoogenraad NJ, and Mori M.** *Characterization of the novel mitochondrial protein import component, Tom34, in mammalian cells.* J Biochem, 125(4): p. 721-7, 1999.
368. **Yang CS and Weiner H.** *Yeast two-hybrid screening identifies binding partners of human Tom34 that have ATPase activity and form a complex with Tom34 in the cytosol.* Arch Biochem Biophys, 400(1): p. 105-10, 2002.
369. **Muntau AC, Leandro J, Staudigl M, Mayer F, and Gersting SW.** *Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators.* J Inherit Metab Dis, 37(4): p. 505-23, 2014.
370. **Purdue PE, Takada Y, and Danpure CJ.** *Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine:glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1.* J Cell Biol, 111(6 Pt 1): p. 2341-51, 1990.
371. **Leiper JM, Oatey PB, and Danpure CJ.** *Inhibition of alanine:glyoxylate aminotransferase 1 dimerization is a prerequisite for its peroxisome-to-mitochondrion mistargeting in primary hyperoxaluria type 1.* J Cell Biol, 135(4): p. 939-51, 1996.
372. **Eilers M and Schatz G.** *Protein unfolding and the energetics of protein translocation across biological membranes.* Cell, 52(4): p. 481-3, 1988.

373. **Wrobel L, Topf U, Bragoszewski P, Wiese S, Sztolsztener ME, Oeljeklaus S, Varabyova A, Lirski M, Chroscicki P, Mroczek S, et al.** *Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol.* *Nature*, 524(7566): p. 485-8, 2015.
374. **Topf U, Wrobel L, and Chacinska A.** *Chatty Mitochondria: Keeping Balance in Cellular Protein Homeostasis.* *Trends Cell Biol*, 26(8): p. 577-86, 2016.
375. **Haberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, Karall D, Martinelli D, Crespo PS, Santer R, et al.** *Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders.* *Orphanet J Rare Dis*, 7: p. 32, 2012.
376. **Perito ER, Rhee S, Roberts JP, and Rosenthal P.** *Pediatric liver transplantation for urea cycle disorders and organic acidemias: United Network for Organ Sharing data for 2002-2012.* *Liver Transpl*, 20(1): p. 89-99, 2014.
377. **Foschi FG, Morelli MC, Savini S, Dall'Aglio AC, Lanzi A, Cescon M, Ercolani G, Cucchetti A, Pinna AD, and Stefanini GF.** *Urea cycle disorders: a case report of a successful treatment with liver transplant and a literature review.* *World J Gastroenterol*, 21(13): p. 4063-8, 2015.
378. **Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, and Kelly JW.** *Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24): p. 15428-33, 2002.
379. **Calamini B, Silva MC, Madoux F, Hutt DM, Khanna S, Chalfant MA, Saldanha SA, Hodder P, Tait BD, Garza D, et al.** *Small-molecule proteostasis regulators for protein conformational diseases.* *Nat Chem Biol*, 8(2): p. 185-96, 2011.
380. **Mu TW, Ong DS, Wang YJ, Balch WE, Yates JR, 3rd, Segatori L, and Kelly JW.** *Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases.* *Cell*, 134(5): p. 769-81, 2008.
381. **Ratjen F and Doring G.** *Cystic fibrosis.* *Lancet*, 361(9358): p. 681-9, 2003.
382. **Esposito S, Tosco A, Vilella VR, Raia V, Kroemer G, and Maiuri L.** *Manipulating proteostasis to repair the F508del-CFTR defect in cystic fibrosis.* *Mol Cell Pediatr*, 3(1): p. 13, 2016.
383. **Hutt DM, Herman D, Rodrigues AP, Noel S, Pilewski JM, Matteson J, Hoch B, Kellner W, Kelly JW, Schmidt A, et al.** *Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis.* *Nat Chem Biol*, 6(1): p. 25-33, 2010.
384. **Wang YJ, Di XJ, and Mu TW.** *Using pharmacological chaperones to restore proteostasis.* *Pharmacol Res*, 83: p. 3-9, 2014.
385. **Amaral MD and Balch WE.** *Hallmarks of therapeutic management of the cystic fibrosis functional landscape.* *J Cyst Fibros*, 14(6): p. 687-99, 2015.
386. **Amaral MD.** *Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients.* *J Intern Med*, 277(2): p. 155-66, 2015.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen präsentiert:

Engels D, Muntau AC, Gersting SW. Protein misfolding in nuclear encoded mitochondrial proteins can lead to impaired mitochondrial import. Talk presented at: Annual Symposium of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism; 2014 Sep 2-5; Innsbruck, Austria.

Engels D, Muntau AC, Gersting SW. Glutaric Aciduria Type I as a model for impaired mitochondrial protein import in inherited metabolic misfolding diseases. Poster presented at: 2nd Rare Diseases Summer School; 2014 Jul 14-16; Zürich, Switzerland

Danksagung

Ich danke herzlich Frau Prof. Dr. med. Ania C. Muntau und Herrn Prof. Dr. med. Søren W. Gersting für die initiale Zündung dieses Projektes und die immer fortwährende strukturelle und inhaltliche Förderung, Inspiration und Kreativität. Der stetige Diskurs, die Hingabe und Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten haben diese Arbeit geprägt.

Heidi Noll-Puchta, Heike Preisler, Anja Schultze und Christoph Siegel lieferten exzellente technische Expertise und größte Verlässlichkeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Pädiatrie danke ich für ausgezeichnete Diskussionen und das Teilen von versierter experimenteller Methodik.

Herrn Dr. rer. nat. Roman Körner sowie Herrn Albert Ries verdankt diese Arbeit sämtliche durch die Massenspektrometrie gewonnenen Erkenntnisse.

Der größte Dank gilt meiner Mutter, meinen Großeltern und Charlotte.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich, Daniel Engels, die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Mitochondrialer Import und
Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk
varianter Glutaryl-CoA-Dehydrogenase**

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

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

Daniel Engels

München, am 05.02.2021

Finis Operis