

Katja Martina Schöler  
Dr. med.

## **Funktionelle Charakterisierung der krankheitsauslösenden Mutationen des 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase Mangels**

Geboren am 15.10.1981 in Speyer  
Staatsexamen am 11.06.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik  
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. med. J. Zschocke

Die pathophysiologischen Grundlagen der Neurodegeneration bei der im Jahr 2000 von Zschocke et al. erstmals beschriebenen Stoffwechselkrankheit 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenasemangel (MHBD-Mangel) sollten durch diese Arbeit erstmals systematisch untersucht werden. Speziell sollte bestätigt werden, dass der klinische Phänotyp bei Patienten unabhängig ist von der enzymatischen Restaktivität des mutierten Proteins. Zu diesem Zweck sollten die sieben bisher identifizierten humanen Mutationen im *HADH2*-Gen rekombinant hergestellt und anschließend bezüglich Enzymaktivität (photometrische Kinetikmessungen), biophysikalischem Verhalten (Differential-scanning-fluorimetrie), zellulärem Transportverhalten (konfokale Laser-Scanning Mikroskopie), sowie Struktur (Kristallographie) untersucht werden.

Sechs der sieben bekannten Mutationen konnten erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden. Eine semi-quantitative Bestimmung der Expressivität zeigte verminderte Expression von vier der sieben Mutanten, eine Mutante erwies sich als unlöslich (L122V). Die kinetischen Untersuchungen ergaben stark reduzierte Aktivitäten aller HSD17B10-Mutanten für die Substrate 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA, Hydroxy-Butyryl-CoA und Allopregnanolon, wobei die Ergebnisse mit letztem Substrat aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht weiter analysiert wurden. Unterschiedliche Mutationen zeigten ähnliche enzymatische Restaktivität für die untersuchten Substratgruppen, ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Restaktivität und dem klinischen Bild ließ sich jedoch nicht erkennen.

Des Weiteren ergab sich eine Korrelation zwischen der kinetischen Aktivität der Mutanten und der Erhöhung der thermischen Stabilität nach Zugabe von Kofaktor und damit Bindungsfähigkeit (bis auf eine Mutante). Eine verminderte Kofaktorbindungskapazität konnte so für die Mutanten R130C, Q165H, N247S und E249Q festgestellt werden. Durch die biophysikalischen Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass die Mutationen D86G, N247S und E249Q zu einem Verlust der thermischen Stabilität der Proteine gegenüber dem Wildtypprotein führen, R130C ist nach Zugabe von Kofaktor deutlich instabiler als Wildtypprotein.

Für diese Mutationen zeigte sich bei strukturellen Analysen am Wildtyp-Modell außerdem eine Beteiligung an der intra-, bzw. intermolekularen Stabilisierung (D86, L122, R130, N247, E249). Zwei Mutationen betreffen das aktive Zentrum des Enzyms (Q165, P210).

Durch die Untersuchung des zellulären Transports wurde gezeigt, dass die hierbei untersuchten, klinisch relevantesten Mutanten (D86G, R130C und Q165H) stabil exprimiert und mitochondrial importiert werden; Unterschiede des klinischen Bildes sind also nicht durch eine intrazelluläre Transportstörung mutierter Proteine zu erklären.

Nicht auszuschließen wäre auch eine dadurch hervorgerufene Störung möglicher Interaktionen mitochondrialer Komponenten.

Diese müssen jedoch in folgenden Arbeiten weiter verifiziert werden.