

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin II

Geschäftsführende Direktorin: Frau Prof. Dr. Stefanie Weber

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Vaskulopathiespezifische Manifestationen des
Cobalamin C Defekts. Proteinbiochemische
Untersuchungen der Auswirkungen einer Deletion des
2. Exons im MMACHC-Gen.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Jana Katrin Hofmann (geb. Wolgast)

geboren in Zürich, Schweiz

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 22.05.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. M. Kömhoff

1. Korreferent: Herr PD Dr. V. Ruppert

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1. Cobalamin	10
1.2. Der Weg des Cobalamins aus der Nahrung bis zur Zelle	12
1.3. Intrazelluläre Verarbeitungsprozesse des Cobalamins	12
1.3.1. Lysosomale Membranproteine ABCD4 und LMBRD1	14
1.3.2. MMACHC.....	15
1.3.3. MMADHC	17
1.3.4. Methionin-Synthase und Methionin-Synthase-Reduktase	18
1.4. Homocystein	20
1.5. Störungen des intrazellulären Cobalaminstoffwechsels	21
1.6. Cobalamin-Defekt Typ C (CbIC)	23
1.6.1. Klinische Manifestationen der CbIC	25
1.6.2. Behandlung des Cobalamin-Defekts Typ C	26
1.7. MMACHC-Spleißmutationen mit Verlust des 2. Exons	27
1.7.1. Pulmonal-arterielle Hypertonie	28
1.7.2. Renale thrombotische Mikroangiopathie und atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom.....	29
1.7.3. Vorüberlegungen zur Pathogenese vaskulopathiespezifischer MMACHC-Mutationen ...	31
1.8. Fragestellung	33
2. Material und Methoden	34
2.1. Material	34
2.1.1. Chemikalien	34
2.1.2. Kommerzielle Kits	36
2.1.3. Geräte und Programme	36

2.1.4. Verbrauchsmaterialien	37
2.1.5. Puffer	38
2.2. Molekularbiologische Arbeiten	39
2.2.1. Gezielte Mutagenese	39
2.2.2. Restriktionsverdau mit Dpn1	42
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.3.1. Gießen der Agarosegele	42
2.2.4. Transformation in XL 1 Blue Strain E.coli Bakterien.....	43
2.2.5. Plasmidisolierung und Aufreinigung	43
2.2.5.1. Minis.....	44
2.2.5.2. Midis.....	45
2.2.6. Quantifizierung gewonnener DNA-Mengen	45
2.2.7. Subklonierung	45
2.2.7.1. Restriktionsverdau	45
2.2.7.2. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	46
2.2.7.3. Ligation.....	46
2.2.8. Sequenzierung	47
2.2.9. Herstellung von Glycerinkulturen	47
2.3. Zellkultur	48
2.3.1. Zelllinien.....	48
2.3.1.1. Humane embryonale Nierenzellen: HEK293	48
2.3.1.2. Humane Leberzelllinie: HepG2.....	48
2.3.1.3. Simiane Nierenzellkarzinomzellen: COS-7.....	49
2.3.2. Zubereitung supplementierter Nährmedien.....	49
2.3.2.1. Cobalaminhaltige Nährmedien	49
2.3.2.2. Homocysteinhaltige Nährmedien	50
2.3.3. Transfektion	50
2.3.3.1. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA	51
2.3.3.2. Transfektion für Western Blot Analysen	51
2.3.3.3. Transfektion Immunocytologie und Proximity Ligation Assay	52
2.3.3.4. Reverse Transfektion von siRNA	53
2.3.4. Cycloheximide Chase Experiment	54
2.3.5. Assays zur Prüfung der Zytotoxizität und Zellviabilität	55
2.3.5.1. MTT-Assay	55
2.3.5.2. Trypanblau Färbung	56
2.4. Proteinbiochemische Methoden	56
2.4.1. Proteinextraktion	56
2.4.2. Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA-Assay.....	57

2.4.3. Vorbereitung der Proben	58
2.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.4.4.1. Polyacrylamidgele und Tris-Glycin-eXtended (TGX) Gele	59
2.4.5. Western Blot	60
2.4.6. Immunodetektion	61
2.5. Immunzytologie	62
2.5.1. Kolokalisationsstudien	63
2.5.2. Proximity Ligation Assay	63
2.6. Statistische Auswertung	66
3. Ergebnisse	67
3.1. Literaturrecherche.....	67
3.2. Einbringen eines Flag- und Myc-Tags mittels gezielter Mutagenese	71
3.3. Expression von wt- und ΔEx2-MMACHC in HEK293- und HepG2-Zellen.....	72
3.4. Knockdown des endogenen MMACHCs.....	73
3.5. Homo-/Heterodimere.....	74
3.5.1. Dimerbildung unter nicht reduzierenden Bedingungen	74
3.5.2. Homo- und Heterodimerbildung im Proximity Ligation Assay.....	78
3.6. Einfluss von Cobalamin.....	79
3.6.1. Cobalaminsupplementation in HEK293- und HepG2-Zellen	79
3.6.2. Halbwertszeiten des Δ Ex2-MMACHC-Proteins unter Cobalamin einfluss	81
3.7. Einfluss von Homocystein	85
3.8. Intrazelluläre Lokalisation.....	87
3.9. Wirkung von Cobalamin auf die proteasomale und lysosomale Lokalisation des MMACHC-Proteins.....	88
3.10. Interaktionspartner des MMACHC-Proteins.....	91
4. Diskussion	94
4.1. Zusammenhang von ΔEx2-Spleißmutationen im MMACHC-Gen mit renalen und pulmonalen Vaskulopathien	94
4.2. Charakterisierung des ΔEx2-MMACHC-Proteins.....	98
4.3. Disulfidbrückenbildung.....	102
4.4. Einfluss von Cobalamin.....	105

4.5. Einfluss von Homocystein	109
4.6. Oxidativer Stress und Δ Ex2-Spleißmutationen.....	112
4.7. Schlussfolgerung und Ausblick	114
5. Zusammenfassung.....	117
6. Literaturverzeichnis	121
7. Anhang.....	133

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<i>Abbildung</i>
Ado-Cbl	<i>Adenosylcobalamin</i>
Ado-Hcy	<i>S-Adenosyl-Homocystein (Ado-Hyc)</i>
aHUS	<i>Atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom</i>
APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
BCA	<i>Bicinchoninsäure</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
ca.	<i>circa</i>
Cbl	<i>Cobalamin</i>
CBS	<i>Cystathionin-β-Synthase</i>
CN-Cbl	<i>Cyanocobalamin</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DMB	<i>5,6-Dimethylbenzimidazol</i>
ER	<i>Endoplasmatisches Retikulum</i>
FAD	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
FMN	<i>Flavinmononukleotid</i>
H₂O-Cbl	<i>Aquacobalamin</i>
H₄Folat	<i>Tetrahydrofolat</i>
HCU	<i>Homocystinurie</i>
Hcy	<i>Homocystein</i>
hnRNA	<i>Heterogene nukleäre RNA</i>
HWZ	<i>Halbwertszeit</i>
i.m.	<i>intramuskulär</i>
i.v.	<i>intravenös</i>
MCM	<i>Methylmalonyl-CoA-Mutase</i>
Me-Cbl	<i>Methylcobalamin</i>
MeH₄-Folat	<i>Methyltetrahydrofolat</i>
Min.	<i>Minute(n)</i>
MMA	<i>Methylmalonazidämie</i>
MMACHC	<i>Methylmalonazidämie mit Homozysteinurie Cbl Typ C</i>

MMS	<i>Methylmalonsäure</i>
MnSD	<i>Mangan Superoxiddismutase</i>
MS	<i>Methionin Synthase</i>
MSR	<i>Methionin Synthase Reduktase</i>
MTHFR	<i>Methyl-Tetrahydrofolat Reduktase</i>
NH₄Cl	<i>Ammoniumchlorid</i>
OH-Cbl	<i>Hydroxycobalamin</i>
p.o.	<i>Per os</i>
PH	<i>Pulmonale Hypertonie</i>
PAH	<i>Pulmonal-arterielle Hypertonie</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PVOD	<i>Pulmonale veno-okklusive Erkrankung</i>
ROS	<i>Reaktive Sauerstoffspezies ("Sauerstoffradikale")</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
rTMA	<i>Renale thrombotische Mikroangiopathie</i>
s.c.	<i>subkutan</i>
SAM	<i>S-Adenosylmethionin</i>
Sek.	<i>Sekunde(n)</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylendiamid</i>
TGX	<i>Tris-Glycin-eXtended</i>
TMA	<i>Thrombotische Mikroangiopathie</i>
TTP	<i>Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
vgl.	<i>vergleiche</i>
wt	<i>Wildtyp</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
ΔEx2-MMACHC	<i>MMACHC mit Verlust des 2. Exons</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Cobalamins.....	11
Abbildung 2: Der Weg des Cobalamins vom Lysosomen zu seinen Zielenzymen..	14
Abbildung 3: Methionin-Synthase als zentrales Enzym des Cobalamin- und Folsäurestoffwechsels. ..	21
Abbildung 4: Angeborene Defekte des intrazellulären Cobalaminstoffwechsels.	22
Abbildung 5: MMACHC-Spleißmutationen mit Verlust des 2. Exons.	28
Abbildung 6: Einbringen eines Myc- und Flag-Tags.....	72
Abbildung 7: Knockdown des endogenen MMACHCs in HepG2-Zellen	73
Abbildung 8: Δ Ex2-MMACHC-Dimerbildung unter nicht reduzierenden Bedingungen..	75
Abbildung 9: MMACHC-Monomere und Dimere	76
Abbildung 10: Keine Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen MMACHC und MMADHC	76
Abbildung 11: Homodimerbildung Δ Ex2-MMACHC.....	77
Abbildung 12: Homo-/ Heterodimerbildung der MMACHC-Proteine mittels PLA.	79
Abbildung 13: Veränderung der MMACHC-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Cobalaminzugabe in HEK293-Zellen	80
Abbildung 14: Veränderung der MMACHC-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Cobalaminzugabe in HepG2-Zellen.	81
Abbildung 15: Western Blot: Einfluss der Cobalaminsupplementation auf die Halbwertszeit des Δ Ex2- MMACHC-Proteins.	83
Abbildung 16: Auswertung: Einfluss der Cobalaminsupplementation auf die Halbwertszeit des Δ Ex2- MMACHC-Proteins in monomerer und dimerer Form.	83
Abbildung 17: Vergleich der ermittelten Proteinmengen an Δ Ex2-MMACHC-Proteinen in Abhängigkeit von der Cobalaminsupplementation.....	85
Abbildung 18: Einfluss von Homocystein auf die Expression von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Protein	86
Abbildung 19: Intrazelluläre Lokalisation von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen.	88
Abbildung 20: Proteasomale Kolokalisation von wt (A)- und Δ Ex2 (B)-MMACHC Proteinen	89
Abbildung 21: Lysosomale Kolokalisation von von wt (C)- und Δ Ex2 (D)-MMACHC Proteinen	90
Abbildung 22: PLA Interaktionspartner	93
Abbildung 23: 3D-Modellierung des MMACHC-Proteins	102
Abbildung 24: Homocysteinilierung von Proteinen	111

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zuordnung des Cobalamin-Defekts zum betroffenen Gen und Protein.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 2: Chemikalien.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 3: kommerzielle Kits</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 4: Geräte und Programme</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 6: Ansatz 10x TAE Puffer, pH 7,6.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 7: 10x Laufpuffer, pH 7,9 - 8,3.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 8: SOC-Medium, pH 7,3.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 9: LB-Medium.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 10: 10x PBS Puffer, pH 7,6.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 11: Tris-SDS Puffer, pH 6,8 und pH 8,8.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 12: Ansatz gezielte Mutagenese</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 13: Primer.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 14: Einstellungen des PCR-Geräts</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 15: Ansatz Restriktionsverdau.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 16: Ansatz Ligation.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 17: Nährmedium HEK293- und COS-7-Zelllinien</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 18: Nährmedium HepG2-Zelllinie.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 19: Zusätze ins Nährmedium.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 20: Aussaat nach Zelllinie und Kulturplattengröße</i>	<i>51</i>
<i>Tabelle 21: transiente Transfektion mit Lipofectamin 3000.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 22: Konstrukte.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 23: siRNA Zielsequenzen und Kontrollen.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 24: Triton X-100 Lysepuffer.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 25: CHAPS Lysepuffer, pH 7,4.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 26: Ladepuffer.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 27: Zubereitung der Polyacrylamidgele</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 28: Primärantikörper Western Blot.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 29: Sekundärantikörper Western Blot.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 30: Primärantikörper Immunozytologie/ PLA</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 31: gekoppelte Antikörper und Sekundärantikörper Immunozytologie</i>	<i>65</i>
<i>Tabelle 32: Übersicht der absoluten Häufigkeiten des Auftretens eines isolierten aHUS/ rTMA, einer isolierten PAH/ PVOD oder eines komb. Phänotyps bei Patienten mit ΔEx2-Spleißmutation</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 33: Übersicht der absoluten Häufigkeiten des Auftretens eines isolierten aHUS/ rTMA, einer isolierten PAH/ PVOD oder eines komb. Phänotyps bei Patienten ohne ΔEx2-Spleißmutation.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 34: Übersicht der durchgeführten Cobalamin-Behandlung und des erreichten Outcomes bei Patienten mit und ohne ΔEx2-Spleißmutation</i>	<i>71</i>

1. Einleitung

Als *Orphan Diseases* (Waisenerkrankungen) werden Erkrankungen bezeichnet, die durch ihre niedrige Prävalenz oft spät erkannt werden und deren therapeutische Möglichkeiten häufig beschränkt sind. Aufgrund der überwiegend genetischen Grundlage weisen sie in der Mehrzahl der Fälle schwere, chronische Krankheitsverläufe auf.

Den Orphan Diseases zuzurechnen sind Defekte des intrazellulären Cobalamin-metabolismus mit ihrem häufigsten Vertreter dem Cobalamin Defekt Typ C (CblC). Zum Verständnis dieser komplexen Stoffwechselerkrankungen wird einleitend der physiologische Weg des Cobalamins (Cbl) von der Nahrungsaufnahme bis zu seinen Bestimmungsorten erläutert. Im Folgenden werden die verschiedenen genetischen Defekte vorgestellt, die den intrazellulären Störungen des Cbl-Stoffwechsels zugrunde liegen.

1.1. Cobalamin

Das wasserlösliche Cbl übernimmt wichtige Funktionen im Protein-, Fettsäure- und Nukleinsäurestoffwechsel menschlicher Zellen. Im Gegensatz zu bestimmten Bakterien kann der Mensch das Cbl nicht *de novo* synthetisieren und ist auf eine alimentäre Aufnahme angewiesen (Banerjee, 2006). Somit ist das Cbl auch als Vitamin B₁₂ bekannt.

Der Nobelpreisträgerin Dorothy Hodgkin gelang es 1956 die Kristallstruktur des Cbls mittels Röntgenanalysen darzustellen. Cobalamine sind komplexe metallorganische Verbindungen, deren zentrales Cobaltion von einem Tetrapyrrolringssystem (Corrin) umgeben ist. Das Cobaltatom besitzt Bindungsstellen für sechs Liganden; vier davon werden von den Stickstoffatomen des Corrins eingenommen (Hodgkin et al., 1955). Der β -axiale, obere Ligand bestimmt die vorliegende Cbl-Form: so entsteht Cyanocobalamin (CN-Cbl) bei Bindung eines Cyanidrests, Hydroxycobalamin (OH-Cbl) bei Bindung einer OH-Gruppe, Methylcobalamin (Me-Cbl) bei Bindung einer Methylgruppe und 5' Desoxyadenosylcobalamin (Ado-Cbl), wenn 5' Desoxyadenosyl als Ligand gebunden wird (Gruber, Puffer, & Kräutler, 2011).

Den α -axialen, unteren Liganden bildet die Nucleotidbase 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB), die in der base-on Konfiguration direkt an das Cobaltion bindet. Unter physiologischen pH-Werten liegt die base-on Form vor. Zur enzymatischen Verarbeitung wird die base-off Form eingenommen, bei der die direkte Bindung an das Cobaltion aufgelöst wird. Der DMB Ligand kann zudem durch ein Histidinrest der Methionin Synthase (MS) ersetzt werden. Abbildung 1 verbildlicht den Aufbau des Cbls und die base-on und base-off Konfiguration des DMBs. Die Ligandenbindungen bestimmen die Reaktivität des Cobaltions, das die Oxidationsstufen +1, +2 und +3 annehmen kann (Obeid, Fedosov, & Nexo, 2015).

CN-Cbl ist die am weitesten verbreitete kommerziell erwerbliche Cbl-Form. Obwohl die erste dreidimensionale Darstellung des Cbls in Form des CN-Cbl gelang und somit die Bezeichnung Vitamin B₁₂ strenggenommen nur CN-Cbl meint, kann diese Form weder aus Mikroorganismen, noch aus pflanzlichem oder tierischem Gewebe extrahiert werden (Qureshi, Rosenblatt, & Cooper, 1994).

Erkrankungen im Vitamin-B₁₂-Stoffwechsel werden eingeteilt in Störungen der Aufnahme, des Transports, sowie in Defekte der intrazellulären Verarbeitung des Vitamins.

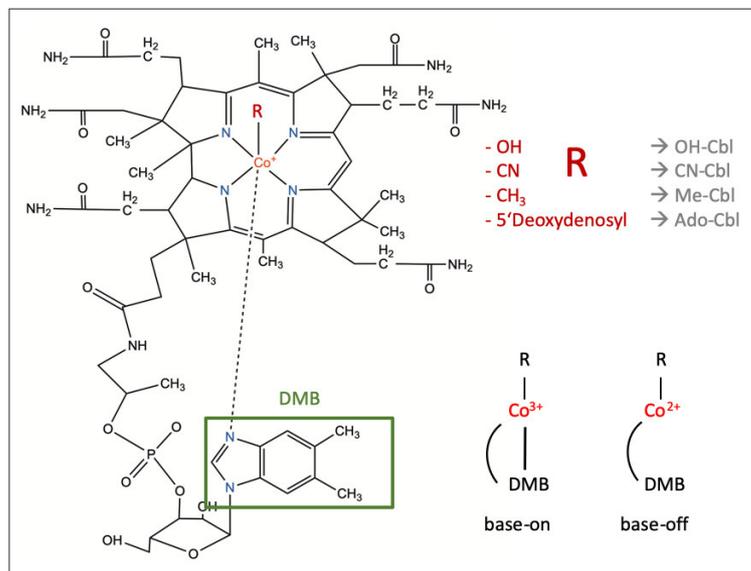


Abbildung 1: Aufbau des Cobalamins. Der β -axiale Ligand (R) bestimmt die Form des Cobalamins: OH-Cbl = Hydroxycobalamin, CN-Cbl = Cyanocobalamin, Me-Cbl = Methylcobalamin, Ado-Cbl = 5'Deoxyadenosylcobalamin. Den α -axialen Liganden bildet das 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMB, grün umrandet). Bindet der Stickstoff des DMB-Rings an das Cobaltion liegt die base-on Konfiguration des Cbls vor. Besteht diese Bindung nicht, liegt die base-off Konfiguration vor. Grafik erstellt mit ChemDraw (Version 21.0) und Microsoft PowerPoint (Version 16.6). In Anlehnung an Froese & Gravel, 2010, sowie McCaddon et al., 2002.

1.2. Der Weg des Cobalamins aus der Nahrung bis zur Zelle

Durch die Nahrung aufgenommenes Cbl liegt überwiegend proteingebunden vor. Diese Bindung wird durch Speichelenzyme sowie der Magensäure und dem gastralen Verdauungsenzym Pepsin gelöst. Frei gewordenes Cbl wird von dem Glykoprotein Haptocorrin (Transcobalamin I) aus der Speichelflüssigkeit gebunden, um so einem weiteren Verdau des Vitamins entgegenzuwirken (Kim, Hannibal, Gherasim, Jacobsen, & Banerjee, 2009). Die pankreatischen Verdauungsenzyme, insbesondere das Pepsin, lösen das Cbl vom Haptocorrin, woraufhin es im Duodenum vom Intrinsic Factor gebunden wird, der die proteolytische Zersetzung des Cbls während der Darmpassage verhindert (Quadros, 2010). Die Enterozyten des terminalen Ileums binden den Cbl-Intrinsic-Factor-Komplex über den Cubam-Rezeptor, der durch seine begrenzte Anzahl die Aufnahme von Cbl aus der Nahrung auf maximal 1,5 µg pro Mahlzeit limitiert (Obeid et al., 2015). Mittels rezeptorvermittelter Endozytose gelangt das Cbl in die Enterozyten, wird dort im Lysosomen vom Intrinsic Factor gelöst, gelangt über den LMBD1/ABCD4-Komplex ins Zytosol und wird über den Multidrug-resistance-protein-1 Transporter (MRP-1/ABCC1) ins portovenöse Blut abgegeben. Im Blut wird das freie Cbl unter anderem (u.a.) vom Transportprotein Transcobalamin II gebunden und ins periphere Gewebe transportiert (Beedholm-Ebsen et al., 2010).

1.3. Intrazelluläre Verarbeitungsprozesse des Cobalamins

Cbl spielt eine zentrale Rolle als Kofaktor zweier Enzyme: Zum einen ist es an der Remethylierung von Homocystein zu Methionin beteiligt. Hier wirkt es in Form des Me-Cbl als Kofaktor der zytosolischen Methionin-Synthase (MS). Zum anderen wird es bei der β -Oxidation ungradzahliger und verzweigtkettiger Fettsäuren sowie dem Abbau bestimmter Aminosäuren benötigt. Hier dient es der mitochondrialen Methylmalonyl-CoA-Mutase (MCM) in Form des Ado-Cbls als Kofaktor. Aufgrund der starken Elektronegativität des Cobaltatoms gelingt es der MCM Alkylreste umzulagern, sodass Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA überführt werden kann, welches dann dem Citratzyklus zur Verfügung steht (Fenton & Rosenberg, 1978).

Zu den Herausforderungen des intrazellulären Vitamin-B₁₂-Stoffwechsels zählt einerseits die Umwandlung der verschiedenen Cbl-Derivate in die benötigten Koenzyme Me-Cbl und Ado-Cbl und die dazu erforderliche Bereitstellung des Cbls in der base-off Konfiguration und andererseits die hohe Reaktivität des Cobaltions, v.a. in der Oxidationsstufe +1 (Banerjee, 2006). Um diesen Herausforderungen effizient zu begegnen, haben die Zellen einen ausgeklügelten Weg entwickelt, das Cbl gezielt durch die Zelle zu schleusen.

Die Aufnahme des Cbls aus dem Blut erfolgt über den Transcobalamin-Rezeptor. Er erkennt Cbl-beladenes Transcobalamin, bindet es und schleust es mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zelle. Der Rezeptor kann dabei je nach Cbl-Bedarf der Zelle hoch- oder runterreguliert werden (Quadros & Sequeira, 2013).

Durch Verschmelzen mit einem primären Lysosom entsteht aus dem Endosom das reife Lysosom und das Cbl wird vom Transcobalamin gelöst. Um aus dem Lysosom ins Zytoplasma zu gelangen, sind zwei integrale lysosomale Membranproteine vonnöten: LMBD1 und ABCD4. Das Cbl erreicht in der Oxidationsstufe +3 (Cob(III)alamin) das Zytoplasma, wird vom MMACHC-Protein entgegengenommen und weiter zu Cob(II)alamin prozessiert. Dem MMACHC-Protein kommt dabei die Aufgabe zu, die unterschiedlichen über die Nahrung aufgenommenen Cbl-Derivate in einer Form bereitzustellen, die für die weitere Verarbeitung zu Me-Cbl, bzw. Ado-Cbl geeignet ist. Dazu verfügt es über drei katalytische Aktivitäten, die den oberen Liganden des Cbls entfernen und die base-off Konfiguration stabilisieren (siehe Abschnitt 1.3.2.).

Nachdem das MMACHC-Protein die unterschiedlichen Cbl-Formen in Cob(II)alamin umgewandelt hat, bildet es einen Dimer mit MMADHC, das die Verteilung des Cbls auf seine Zielenzyme reguliert: Gelangt das Cob(II)alamin zum Mitochondrium, wird es von einer Adenosyltransferase zu Ado-Cbl konvertiert, dem Kofaktor der MCM. Im Zytosol wird es in Me-Cbl umgewandelt und steht der MS als Kofaktor zur Verfügung. In Abbildung 2 ist der Weg des Cbls vom Lysosom bis zu seinen Zielenzymen schematisch dargestellt.

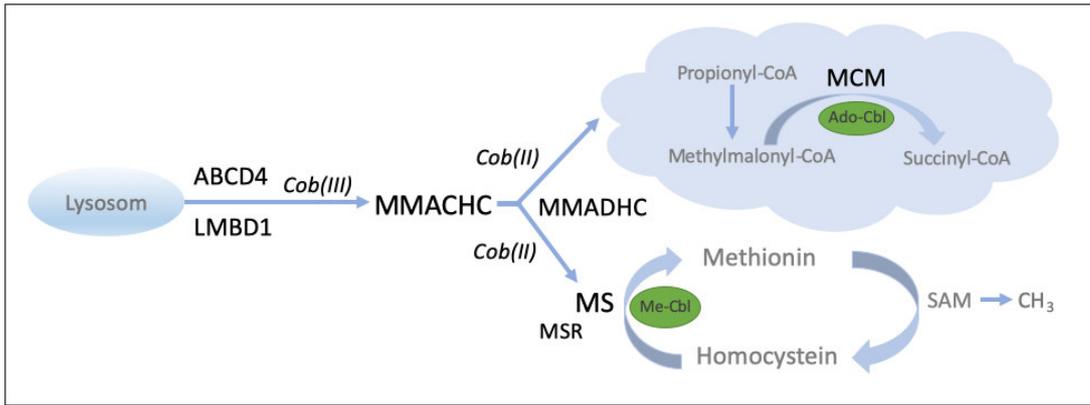


Abbildung 2: Der Weg des Cobalamins vom Lysosom zu seinen Zielenzymen. Über den Transcobalamin-Rezeptor aufgenommenes Cobalamin gelangt über die beiden lysosomalen Membranproteine ABCD4 und LMBD1 als Cob(III)alamin ins Zytoplasma. Dort wird es vom MMACHC-Protein entgegengenommen und weiter prozessiert. Nach Entfernung des oberen Liganden und Umwandlung in Cob(II)alamin formt MMACHC ein Heterodimer mit MMADHC. Dieser leitet MMACHC zum Mitochondrium (blaue Wolke) oder zur zytosolischen Methionin-Synthase (MS). Im Mitochondrium wandelt die Methylmalonyl-CoA-Mutase (MCM) Methylmalonyl-CoA mithilfe des Koenzyms Ado-Cbl in Succinyl-CoA um. Die zytosolische MS katalysiert Me-Cbl-abhängig die Remethylierung von Homocystein zu Methionin. Legende: Cob(III)/(II)alamin = Cobalamin in der Oxidationsstufe +3/ +2 , MS = Methionin-Synthase, MSR = Methionin-Synthase-Reduktase, MCM = Methylmalonyl-CoA-Mutase, Ado-Cbl = Adenosylcobalamin, Me-Cbl = Methylcobalamin.

1.3.1. Lysosomale Membranproteine ABCD4 und LMBRD1

Die beiden lysosomalen integralen Membranproteine ABCD4 und LMBD1 gewährleisten den Transport des Cbls aus dem Lysosom in das Zytoplasma (Fettelschoss et al., 2017). Ist die Funktion einer der beiden Proteine beeinträchtigt, kommt es zu einer intralysosomalen Akkumulation von Cbl, welches den nachfolgenden Stoffwechselwegen nicht mehr zur Verfügung steht. Da ein Defekt einer der beiden Gene im gleichen Phänotyp mündet, ist anzunehmen, dass die Bildung eines Komplex der beiden kodierten Proteine zwingend erforderlich ist, um die Beförderung des aufgenommenen Cbls aus dem Lysosomen ins Zytoplasma zu gewährleisten (Kawaguchi, Okamoto, Morita, & Imanaka, 2016).

Das ABCD4-Gen kodiert für das aus 606 Aminosäuren bestehende ABCD4-Protein, das ein Molekulargewicht von 67 kDa aufweist (Kawaguchi et al., 2016). Das ABCD4-Protein gehört zur Klasse der ABC-Transporter, deren gemeinsames Strukturmerkmal die ATP-bindende Kasette darstellt, welche den ATP-abhängigen transmembranösen Transport einer Vielzahl von Substraten ermöglicht (Lee et al., 2014). Der ABC-Transporter Subtyp D4 ist anders als die übrigen Mitglieder der D-Subfamilie nicht peroxisomal, sondern in den Membranen des Lysosoms und des

endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert (Kashiwayama et al., 2009). Interessanterweise kommt es zu einer Translokation von ABCD4 vom ER zum Lysosom in Gegenwart des Proteins LMBD1.

Das hydrophobe LMBD1-Protein wird vom LMBRD1-Gen kodiert. Es besteht aus 540 Aminosäuren und neun Transmembranregionen und weist ein Molekulargewicht von 61,4 kDa auf (Gailus et al., 2010). Kitai et al. (2021) konnten im Zellmodell zeigen, dass das ABCD4-Protein mithilfe der ATPase-Aktivität aktiv Cbl aus dem Lumen des Lysosoms ins Zytoplasma transportiert, wohingegen LMBD1 keine Fähigkeit zum transmembranösen Transport besitzt. LMBD1 scheint folglich als Chaperon für ABCD4 zu dienen, um dieses vom ER zum Lysosomen zu führen und dabei vor proteolytischer Zersetzung zu schützen (Kawaguchi et al., 2016; Coelho et al., 2012).

1.3.2. MMACHC

Das MMACHC-Gen (OMIM *609831) ist auf dem Chromosomen 1p34 lokalisiert. Das 10.736 bp lange Gen besteht aus 5 Exonen. Das erste bis vierte Exon kodieren für eine 849 bp lange mRNA, wobei das 3'Ende des 4. Exons und das gesamte 5. Exon untranslatiert bleiben. Die cDNA hat einen 846 bp offenen Leserahmen und kodiert für ein Polypeptid aus 282 Aminosäuren. Das vorhergesagte Molekulargewicht liegt bei 31,7 kDa (Lerner-Ellis et al., 2006). Durch alternatives Splicing kann zusätzlich ein 245 Aminosäuren langes Protein entstehen (*EC Splicing* (Kim et al., 2005)).

Das MMACHC-Protein besteht aus zwei Modulen, welche über einen Linker verbunden sind. Die N-terminalen Residuen (1-172) formen das Core-Protein, die C-terminalen Residuen (183-244) formen eine Kappe, die sich nach Cbl-Bindung über das gebundene Substrat legt (Koutmos et al., 2011). Van-der-Waals-Kräfte sowie Wasserstoffbrücken sorgen für den Kontakt zwischen der Kappe des MMACHC-Proteins und dem oberen Liganden des Cbls (Froese et al., 2012).

Das MMACHC-Protein erfüllt zwei wesentliche Aufgaben: In der Funktion eines zytosolischen Transportchaperons geleitet es das Cbl vom Lysosom zum Zielenzym, bzw. zu weiteren, bisher unbekanntem Transportproteinen an der mitochondrialen Membran. Hierdurch werden ungewollte Nebenreaktionen verhindert, die erforderliche base-off Konfiguration stabilisiert und eine effiziente Nutzung des knappen und reaktiven Organometalls gewährleistet (Banerjee, 2006).

Zur Bindung der verschiedenen mit der Nahrung aufgenommenen Cbl-Derivate verfügt das MMACHC-Protein über einen weiten Hohlraum. Nach Bindung eines Cbl-Derivats kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der sich die Kappe über den Hohlraum legt. Die gebildete Cbl-bindende Tasche weist ein hohes Maß an Flexibilität auf. So wird einerseits die effiziente Bindung der unterschiedlichen Cbl-Derivate, vom kleinen Me-Cbl bis hin zum großen Ado-Cbl, sichergestellt, andererseits ermöglicht sie eine effiziente Prozessierung der Cbl-Derivate. Dabei entfernt das MMACHC-Protein den oberen Liganden und überführt die verschiedenen Derivate in das Zwischenprodukt Cob(II)alamin (Kim et al., 2009; Koutmos, Gherasim, Smith, & Banerjee, 2011).

Zur Prozessierung bindet das MMACHC-Protein das Cbl in der base-off Konfiguration. Hierdurch wird die Bindung des oberen Liganden zum Cobaltatom geschwächt und eine konsekutive Spaltung und Überführung des Cbls in seine Cob(II)alaminform erleichtert (Froese et al., 2012).

Ohne Substratbindung liegt das MMACHC-Protein überwiegend als Monomer vor. Durch die Bindung von Flavinmononukleotid (FMN) oder eines Alkyl-Cbl verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Dimerbildung. Die Homodimerbildung erleichtert die Prozessierung des gebundenen Cbls, indem sich die Kappe über die aktiven Seiten des Substrats legt und die optimale Ausrichtung der Cbl-Substrate und deren Interaktionspartner begünstigt (Froese et al., 2012).

Das Cob(II)alamin wird nachfolgend an seinen Zielorten in die biologisch aktiven Kofaktoren Ado-Cbl und Me-Cbl umgewandelt (Kim et al., 2009).

Folgende zwei katalytische Funktionen stehen dem MMACHC-Protein zur Prozessierung des Cbls zur Verfügung:

1.) Decyanierung

Das MMACHC-Protein katalysiert die reduktive Decyanierung von CN-Cbl in base-off Cob(II)alamin. Mit Bindung des CN-Cbls erfährt das MMACHC-Protein eine Konformationsänderung, welche eine Flavinbindestelle freilegt. Das gebundene Flavin (FMN oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)) ermöglicht den Transfer eines Elektrons von NADPH auf das Cob(III)alamin, sodass Cob(II)alamin und freies Cyanid entstehen. Die Bereitstellung von NADPH erfolgt durch die Methionin

Synthase Reduktase (MSR) oder die Protein Novel Reduktase 1 (Kim, Gherasim, & Banerjee, 2008; Kim et al., 2009).

2.) Dealkylierung

Durch die Bindung eines Alkyl-Cbls erhöht sich die Bindungsaffinität und -stabilität von GSH an eine argininreiche Tasche des MMACHC-Proteins in der Nähe der Cbl-Bindestelle. Zwei Cbl-beladene MMACHC-Moleküle lagern sich zu einem Dimer zusammen und erleichtern die katalytische Dealkylierung des Cbls. Dazu bindet das MMACHC-Protein Alkyl-Cbl in der base-off Konfiguration und spaltet heterolytisch die Alkylgruppe vom Cbl ab, wobei diese auf Glutathion übertragen wird. Es entstehen Cob(I)alamin und der jeweils korrespondierende Glutathionthioether. Das hochreaktive Cob(I)alamin oxidiert sogleich zu Cob(II)alamin und teilweise zu OH₂-Cbl (Froese et al., 2012; Kim et al., 2009; Li, Gherasim, Lesniak, & Banerjee, 2014).

Die katalytischen Aktivitäten des MMACHC-Proteins beruhen auf grundsätzlich unterschiedlichen Mechanismen. Während es bei der Decyanierung zu einem Elektronentransfer auf das CN-Cbl kommt, wird bei der Elimination der Alkylgruppe eine nukleophile Substitutionsreaktion durchgeführt. Dies lässt auf unterschiedliche Lokalisationen der beiden katalytischen Aktivitäten innerhalb des Proteins schließen (Kim et al., 2009). Tatsächlich werden Mutationen mit unterschiedlichen Lokalisationen im MMACHC-Gen mit Einschränkungen nur einer der beiden Aktivitäten in Verbindung gebracht: Mutationen im 4. Exon des MMACHC Gens (Arg161) zeigten im Experiment eine geringere Dealkylierungsaktivität bei erhaltener Decyanierungsfunktion (Gherasim, Ruetz, Li, Hudolin, & Banerjee, 2015).

Neben der Dealkylierung und Decyanierung kann an MMACHC gebundenes H₂O-Cbl durch intrazelluläre NADH reduziert werden. Dabei entstehen Cob(II)alamin und NADH⁺. Diese Reaktion wird entscheidend beschleunigt durch die Anwesenheit von FMN (Dereven'kov, Hannibal, Makarov, & Molodtsov, 2020).

1.3.3. MMADHC

Das MMADHC-Gen ist auf dem Chromosomen 2q23.2 lokalisiert und kodiert für das 296 Aminosäuren lange MMADHC-Protein mit einem Molekulargewicht von 32,9 kDa (Coelho et al., 2008).

MMADHC übernimmt eine Verteilerfunktion des Cbls am Schnittpunkt zwischen zytosolischem und mitochondrialem Weg. Dazu geht es eine Bindung mit MMACHC ein. Diese 1:1 Heterodimerbildung entsteht, nachdem das MMACHC-Protein den β -axialen Liganden des Cbls entfernt hat. Mithilfe eines Schwefelrests des Cys-261 Residuums bindet MMADHC an das MMACHC-gebundene Cob(II)alamin und formt so ein Komplex, der mit der Oxidation des Cob(II)alamins zu Thiolat-Cob(III)alamin einhergeht (Li et al., 2020). MMACHC-Proteine mit prozessiertem Cob(II)alamin ziehen dabei die Bindung von MMADHC der Homodimerbildung mit einem weiteren MMACHC-Protein vor (Froese et al., 2015).

Als Heterodimer mit MMACHC sorgt MMADHC für die geordnete Verteilung des prozessierten Cob(II)alamins auf seine Zielenzyme: die zytosolische MS und die mitochondriale MCM. Somit ist MMADHC maßgeblich an der Regulierung der Menge an hergestellten Ado- und Me-Cbl beteiligt (Gherasim et al., 2015).

Das monomere MMADHC-Protein lässt sich sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien nachweisen (Mah et al., 2013). N-terminal verfügt es über eine schwache mitochondriale Leader Sequenz, welche für die Bereitstellung von Ado-Cbl im Mitochondrium erforderlich ist (Coelho et al., 2008). C-terminale Sequenzen sind für die Interaktion mit MMACHC sowie für die zytosolische Bereitstellung von Me-Cbl unabdingbar.

Diese strukturelle Besonderheit spiegelt sich auch im Phänotyp von Patienten mit unterschiedlich lokalisierten Mutationen im MMADHC-Gen wider: C-terminale Mutationen gehen mit einer kombinierten Methylmalonazidämie (MMA) und Homocystinurie (HCU) einher, Mutationen in der Mitte des Gens (Aminosäuren 197–226 und 246–259) führen zu einer isolierten HCU (Froese et al., 2015). Bei N-terminalen Mutationen kommt es durch einen Translationsabbruch im Bereich früher Residuen zur isolierten MMA. Bedingt durch eine Reinitiierung der Translation an späteren Punkten (Met₆₂ oder Met₁₁₆) bleiben C-terminale Funktionen, wie die Bereitstellung von Me-Cbl, unbeeinträchtigt (Stucki et al., 2012).

1.3.4. Methionin-Synthase und Methionin-Synthase-Reduktase

Die 140 kDa schwere Methionin-Synthase (MS) wird kodiert vom MTR-Gen (MTR = 5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyltransferase), welches auf dem

Chromosomen 1q42.3-1q44 lokalisiert ist (Li et al., 1996). Das große monomere Protein weist einen modularen Aufbau auf mit unterschiedlichen Regionen für die Bindung von Homocystein, Methyltetrahydrofolat, Cbl und Adenosylmethionin (Goulding, Postigo, & Matthews, 1997).

Die MS katalysiert die Umwandlung von Homocystein zu Methionin. Dazu bindet sie zunächst Methyltetrahydrofolat (MeH₄-Folat) und überträgt die Methylgruppe auf Cob(I)alamin, welches nun als Methylcob(III)alamin vorliegt. Im nächsten Schritt wird die Methylgruppe heterolytisch gespalten und auf Homocystein übertragen. Zurück bleiben das hochreaktive Cob(I)alamin, das biologisch aktive Tetrahydrofolat (H₄-Folat) und Methionin (Banerjee, 1997; Ludwig & Matthews, 1997).

Die MS sorgt folglich für die Bereitstellung zweier metabolisch substantieller Produkte: erstens dem Tetrahydrofolat, der aktiven Form der Folsäure, welche für die Biosynthese der Nukleinbasen Purin und Pyrimidin, sowie den Aminosäurestoffwechsel unabdingbar ist, und zweitens Methionin, aus dem unter ATP-Verbrauch S-Adenosylmethionin (SAM) entsteht (Drummond, Huang, Blumenthal, & Matthews, 1993).

Alle 75 – 2000 Reaktionen oxidiert das Cob(I)alamin zu Cob(II)alamin, was eine Inaktivierung der MS nach sich zieht. Die MSR besitzt FAD und FMN als Kofaktoren, welche Elektronen vom oxidierten Cbl (Cob(II)alamin oder OH₂Cbl) auf NADPH übertragen. Anschließend wird eine Methylgruppe von Adenosylmethionin auf das entstandene Cob(I)alamin übertragen. So sorgt die MSR durch die reduktive Demethylierung von Cob(II)alamin zu Me-Cbl für die Wiederherstellung der Funktionalität der MS (Dereven'kov et al., 2020; Ludwig and & Matthews, 1997; Mangum & Scrimgeour, 1962).

Das für die MSR kodierende Gen MTRR ist auf dem Chromosomen 5p15.2-15.3 lokalisiert. MSR liegt physiologisch als Dimer vor und besteht aus zwei identischen Untereinheiten, jeweils mit einem Molekulargewicht von 77,7 kDa (Leclerc et al., 1998; Matthews, 1998).

1.4. Homocystein

Homocystein ist eine nicht proteinogene Aminosäure mit einer Thiolgruppe (-SH) als funktioneller Gruppe. Hohe Homocysteinkonzentrationen sind bekannt für ihre prothrombotischen und gefäßschädigenden Eigenschaften (Lawrence De Koning, Werstuck, Zhou, & Austin, 2003; Perna, Ingrosso, & De Santo, 2003). Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich mit der Rolle von Homocystein in der Entstehung von Endothelschäden. Erhöhte Homocysteinwerte werden dabei mit der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion durch eine verminderte Produktion und Verfügbarkeit von NO, mit einer Zunahme an oxidativem Zellstress sowie einer erhöhten Kollagensynthese und einer verminderten Elastizität der Arterienwände in Verbindung gebracht (Loscalzo, 1996; Upchurch et al., 1997; Zhang et al., 2014).

Homocystein kann entweder durch Transsulfuration zu Cystein abgebaut werden oder durch eine Remethylierung mit Methyltetrahydrofolat als Methyl donor in Methionin umgewandelt werden. Unter ATP-Verbrauch entsteht aus Methionin SAM, der ubiquitären Methylgruppendonor der Zellen. Nach Abgabe der Methylgruppe bleibt S-Adenosyl-Homocystein (Ado-Hcy) zurück, welches durch hydrolytische Spaltung in Homocystein und Adenosin überführt wird. (Perna et al., 2003).

Etwa die Hälfte des anfallenden Homocysteins wird durch Transsulfurierung abgebaut. Die Cystathionin- β -Synthase (CBS) katalysiert dabei den geschwindigkeitsbestimmenden ersten Schritt der Vitamin B₆-abhängigen Kopplung von Serin an Homocystein, wobei Cystathionin entsteht. In nachfolgenden Schritten wird Cystathionin zu Cystein und α -Ketobutyrat abgebaut (Janošik, Kery, Gaustadnes, Maclean, & Kraus, 2001).

Abbildung 3 veranschaulicht die Stellung von Homocystein im Methioninstoffwechsel und verdeutlicht die enge Verknüpfung des Cbl-Stoffwechsels mit dem Folsäurestoffwechsel mit der MS als zentraler Schnittstelle. Neben der MS kann alternativ in Niere und Leber die Betain-Homocystein-Methyltransferase Methionin aus Betain und Homocystein generieren (Martinelli, Deodato, & Dionisi-Vici, 2011; McKeever, Weir, Molloy, & Scott, 1991).

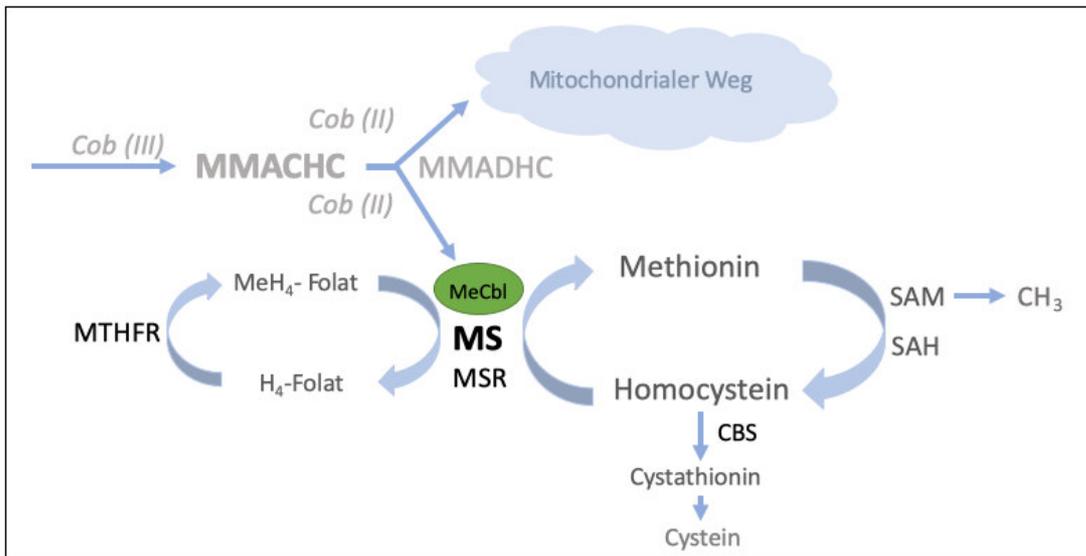


Abbildung 3: Methionin-Synthase als zentrales Enzym des Cobalamin- und Folsäurestoffwechsels. Die zytosolische MS katalysiert Me-Cbl-abhängig die Remethylierung von Homocystein zu Methionin und stellt so die Bildung des universalen Methylgruppendonators SAM sicher. Nach Abgabe der CH₃-Gruppe wird aus SAM das SAH. Die Methylgruppe entstammt dem MeH₄-Folat, welches durch die MTHFR aus biologisch aktivem H₄-Folat gewonnen wird. Neben der Remethylierung zu Methionin kann Homocystein über Cystathionin zu Cystein abgebaut werden. Den ersten Schritt übernimmt dabei das Enzym CBS. Legende: MS = Methionin-Synthase, Me-Cbl = Methylcobalamin, CH₃ = Methylgruppe, SAM = S-Adenosylmethionin, SAH = S-Adosylhomocystein, H₄-Folat = Tetrahydrofolat, MeH₄-Folat = Methyltetrahydrofolat, MTHFR = Methyltetrahydrofolatreduktase, CBS = Cystathionin-β-Synthase.

1.5. Störungen des intrazellulären Cobalaminstoffwechsels

Die autosomal-rezessiv vererbten Defekte des Cbl-Stoffwechsels lassen sich in neun Klassen unterteilen (Cbl Typ A-G, J, *mut*), wobei jede Klasse für einen Defekt eines im Cbl-Stoffwechsel beteiligten Proteins steht. Zusätzlich existieren die X-chromosomal vererbten Formen CblX und CblX-like, welche biochemisch und klinisch dem Cbl-Defekt Typ C zugeordnet werden. Zudem führen Mutationen im PRDX1-Gen durch epigenetische Mechanismen mit Promotor-Methylierung des MMACHC-Gens im Zusammenspiel mit einer pathogenen MMACHC-Mutation zu einer CblC (Guéant et al., 2018; Zhang et al., 2021).

Die alphabetische Typenbezeichnung gibt den ursächlichen Gendefekt für die Erkrankung an. So steht der Typ C für Mutationen im MMACHC-Gen, Typ D beruht auf Mutationen im MMADHC-Gen, Typ F ist auf Mutationen im LMBRD1-Gen und Typ J auf Mutationen im ABCD4-Gen zurückzuführen. In Tabelle 1 ist eine vollständige Zuordnung des betroffenen Gens und Proteins zum jeweiligen Cbl-Typ abgebildet.

Anhand der Laborparameter lassen sich bereits erste Hinweise auf den vorliegenden Gendefekt gewinnen: Störungen, die früh im Stoffwechselweg auftreten (Typ F, J, C, D), führen zu einer kombinierten Methylmalonazidämie (MMA) mit Homocystinurie (HCU). Sind Proteine im späteren Teil des Stoffwechselweges betroffen, kommt es zu einer isolierten MMA (z.B. Typ A, B, *mut*) oder einer isolierten HCU (z.B. Typ E, G). Abbildung 4 verbildlicht die verschiedenen Cbl-Defekt-Typen und ihre auffälligen Laborparameter anhand der Funktion des betroffenen Proteins im intrazellulären Cbl-Stoffwechsel.

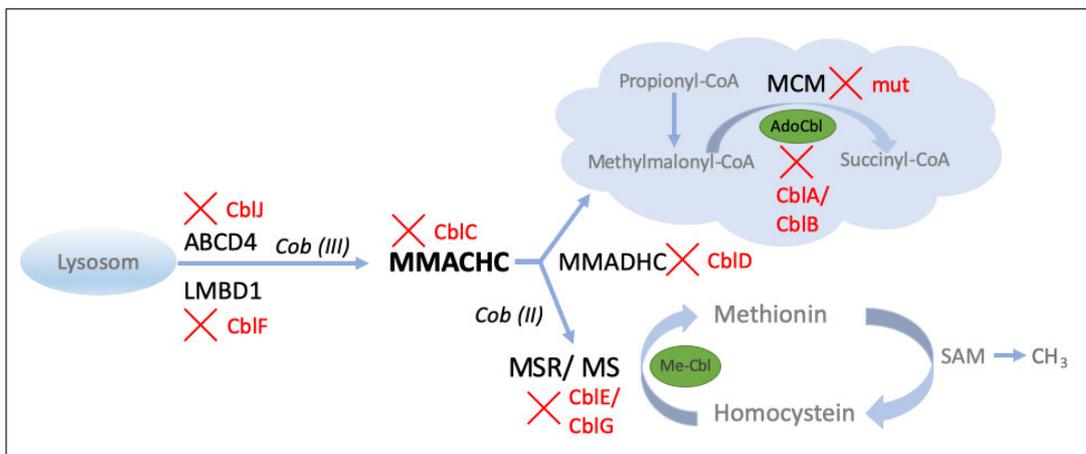


Abbildung 4: Angeborene Defekte des intrazellulären Cobalaminstoffwechsels. In Schwarz dargestellt sind die relevanten Proteine des intrazellulären Cbl-Metabolismus. In Rot der jeweilige Krankheitstyp, der bei einem Defekt des Proteins entsteht. Frühe Störungen im Cbl-Stoffwechsel führen zu einer kombinierten Methylmalonazidämie (MMA) und Homocystinurie (HCU). Ist nur der mitochondriale Weg betroffen, kommt es zu einer isolierten MMA. Ist nur der zytosolische Weg betroffen, kommt es zu einer isolierten HCU. Legende: Cob(III) = Cob(III)alamin, Cob(II) = Cob(II)alamin, MS = Methionin-Synthase, MSR = Methionin-Synthase-Reduktase, MCM = Methylmalonyl-CoA-Mutase, SAM = S-Adenosylmethionin, Me-Cbl = Methylcobalamin, Ado-Cbl = Adenosylcobalamin.

Zur Diagnosesicherung wurden traditionell Komplementierungsstudien durchgeführt: Dazu werden kultivierte, radioaktiv markierte Fibroblasten von Patienten mit Fibroblasten eines bekannten Cbl-Defekts fusioniert. Anschließend wird beobachtet, ob die Fusion zu einer vermehrten [¹⁴C]-Propionataufnahme führt. Kommt es zu einer vermehrten Aufnahme, kann es sich nicht um dieselbe Komplementierungsklasse handeln, da der bekannte Cbl-Defekt durch die Patientenfibroblasten kompensiert wird. Ist hingegen keine Aufnahme und damit keine Korrektur des vorbekannten Defekts möglich, muss es sich um dieselbe Klasse handeln (Gravel, Mahoney, Ruddle, & Rosenberg, 1975; Shevell & Rosenblatt, 1992).

Heute ist diese zeitintensive Methode zunehmend durch die kostengünstigere Möglichkeit molekulargenetischer Testungen abgelöst worden, die Klassenbezeichnungen sind jedoch erhalten geblieben (Carrillo-Carrasco, Chandler, & Venditti, 2012).

Tabelle 1: Zuordnung des Cobalamin-Defekts zum betroffenen Gen und Protein

Typ	Gendefekt	Protein	Lokalisation	Laborparameter	Quelle
A	<i>MMAA</i>	MMAA	4q31	Isolierte MMA	Dobson et al., 2002a
B	<i>MMAB</i>	MMAB	12q24.11	Isolierte MMA	Dobson et al., 2002b
C	<i>MMACHC</i>	MMACHC	1p23.2	MMA + HCU	Lerner-Ellis et al., 2006
	<i>PRDX1</i>	MMACHC	1p34.1	MMA + HCU	Quintana et al., 2017
D	<i>MMADHC</i>	MMADHC	2q23.2	MMA + HCU	Coehlo et al., 2008
E	<i>MTRR</i>	MSR	5p15.3-p15.2	Isolierte HCU	Leclerc et al., 1999
F	<i>LMBRD1</i>	LMBD1	6q13	MMA + HCU	Rutsch et al., 2009
G	<i>MTR</i>	MS	1q43	Isolierte HCU	Watkins et al., 2002
J	<i>ABCD4</i>	ABCD4	14q24.3	MMA + HCU	Coehlo et al., 2012
mut	<i>MMUT</i>	MCM	6p12.3	MMA	Ledley et al., 1988
X	<i>HCFC1</i>	MMACHC	Xq28	MMA + HCU	Yu et al., 2013
X-like	<i>ZNF143</i>	Zinkfinger Protein143	11p15.4	MMA+ HCU	Pupavac et al., 2016
	<i>THAP11</i>	THAP11	16q22.1	MMA + HCU	Quintana et al., 2017

Legende: MMA = Methylmalonazidämie, HCU = Homocystinurie

1.6. Cobalamin-Defekt Typ C (CblC)

Die CblC stellt mit etwa 80% die häufigste angeborene Störung im intrazellulären Cobalaminstoffwechsel dar (Lerner-Ellis et al., 2006). Die Inzidenz wird je nach Studie und Population auf 1:37.000 (lateinamerikanische Population), 1:60.000 – 100.000 (US-amerikanische Studien) und 1:3920 – 19.697 (chinesische Population) geschätzt (Cusmano-Ozog et al., 2007; Han et al., 2016; Weisfeld-Adams et al., 2010; Zhou, Li, Wang, Wang, & Gu, 2019).

MMACHC steht für Methylmalonazidämie kombiniert mit Homocystinurie vom Typ C. Der Name des Gens beschreibt folglich die Laborparameter, die bei einem Gendefekt auffällig werden.

Erstmals beschrieben Mudd und Kollegen 1969 einen Säugling mit kombinierter MMA und HCU. 37 Jahre später konnte das MMACHC-Gen als ursächliches Gen für die Erkrankung identifiziert werden (Lerner-Ellis et al., 2006; Mudd, Levy, & Abeles, 1969).

Weltweit wurden bis heute über 1000 Fälle einer genetisch nachgewiesenen CblC beschrieben (u.a. Lerner-Ellis et al., 2009 (365), Fischer et al., 2014 (74), Nogueira et al., 2008 (41), Morel, Lerner-Ellis, & Rosenblatt, 2006 (36), Richard et al., 2009 (48) Liu et al., 2018 (460), Wang et al., 2010 (27)). Dabei wurden 104 verschiedene pathogene Mutationen im MMACHC-Gen identifiziert (*Human Gene Mutation Database (HGMD) professional 2023.1, Stand: November 2023*).

Das Mutationsspektrum weist große regionale Unterschiede auf, wobei sich die Mutationen im westlichen Raum fast vollständig von denen im asiatischen Raum unterscheiden (Wang et al., 2019).

Klinische Manifestationen der CblC sind vielfältig mit einer großen Variation im Schweregrad. Dabei lassen sich innerhalb der CblC-Erkrankung starke Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beobachten, welche sich beispielsweise im Alter der Erstmanifestation widerspiegeln.

Die Klassifikation von Rosenblatt unterscheidet einen early-onset mit Manifestationsbeginn innerhalb des ersten Lebensjahrs von einem late-onset mit einer Erstmanifestation nach dem 4. Lebensjahr (Rosenblatt et al., 1997). Knapp 90 % der CblC-Erkrankungen gehen mit einem early-onset einher (Fischer et al., 2014).

Die im europäischen Raum in 42 % aller pathogenen MMACHC-Allele auftretende Frameshift Mutation *c.271dupA*, ebenso wie die häufige *c.331C>T*-Mutation, sind bei homozygoter Expression mit einem frühen Erkrankungsbeginn assoziiert. Die Mutationen *c.394C>T*, *c.347T>C*, *c.440G>C* und *c.482G>A* führen hingegen meist zu einem späten Beginn der CblC (Almannai et al., 2017; Lerner-Ellis et al., 2009; Morel et al., 2006). Ein früher Erkrankungsbeginn ist mit einem schlechteren Outcome assoziiert, der unbehandelt meist zum Versterben des Säuglings führt. Späte Manifestationsformen können hingegen mild verlaufen und es besteht die Möglichkeit, dass Patienten unter Therapie komplett symptomfrei bleiben (Han et al., 2016).

1.6.1. Klinische Manifestationen der CblC

Die CblC ist eine Multisystemerkrankung, welche nicht nur mit einer großen Bandbreite an Symptomen einhergeht, sondern auch erhebliche individuelle Unterschiede im Erstmanifestationsalter aufweist. Die Diagnose einer CblC kann daher nicht aufgrund der klinischen Symptomatik allein gestellt werden. Wegweisend sind die laborchemischen Veränderungen einer kombinierten MMA und HCU.

Prinzipiell kann die Erkrankung durch ein erweitertes Neugeborenencreening bereits früh nach der Geburt diagnostiziert werden (Fearing & Marsden, 2003). Bei späten Manifestationsformen bleibt das Screening zunächst jedoch unauffällig. Perinatal können Symptome einer intrauterinen Wachstumsretardierung, Mikro- oder Hydrozephalus, fetale dilatative Kardiomyopathie und kongenitale Herzfehler auf eine Störung im Cbl-Stoffwechsel hinweisen. Im Säuglings- und Kindesalter sind Probleme bei der Nahrungsaufnahme, Gedeihstörungen, Hypotonie und Lethargie, neurologische Defizite sowie bei Säuglingen akute metabolische Entgleisungen typisch (Carrillo-Carrasco et al., 2012; Sloan et al., 2018).

Neben den charakteristischen hämatologischen Zeichen einer megaloblastären Anämie werden häufig epileptische Krampfanfälle, kardiale und pulmonale Beschwerden sowie ophthalmologische Auffälligkeiten, wie eine retinale Degeneration, Nystagmus und Optikusatrophie berichtet (Gaillard, Matthieu, & Borruat, 2008; Gerth, Morel, Feigenbaum, & Levin, 2008; Martinelli et al., 2011).

In den letzten Jahren häufen sich darüber hinaus Berichte über renale Komplikation in Form eines atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS), zum Teil in Kombination mit einer pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) (Andrès, Affenberger, Federici, & Korganow, 2006; Beck, van Spronsen, Diepstra, Berger, & Kömhoff, 2017; Huemer et al., 2014; Kind et al., 2002; Sharma, Greenberg, Prasad, & Prasad, 2007).

Späte Erkrankungsmanifestationen sind vor allem durch neuropsychiatrische Auffälligkeiten gekennzeichnet. Hier kann es u.a. zu Psychosen, Demenz, einer progressiven Enzephalopathie, Leukenzephalopathie oder einer subakut kombinierten Degeneration des Rückenmarks kommen (Chung-Hui Tsai et al., 2007; Powers et al., 2001; Roze et al., 2003). Ebenfalls wird im Erwachsenenalter über renale Komplikationen in Form von atypischen Glomerulopathien und

thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) berichtet (Brunelli, Meyers, Guttenberg, Kaplan, & Kaplan, 2002; Guignon et al., 2005).

Der kurze Abriss soll die Vielzahl der Symptome der CblC verdeutlichen. Einen ausführlichen Überblick über die unterschiedlichen Symptome in den verschiedenen Altersklassen vermittelt das Review von Sloan, Carrillo, Adams und Venditti (2008).

1.6.2. Behandlung des Cobalamin-Defekts Typ C

Die Behandlung der CblC basiert auf der Supplementation hoher Dosen OH-Cbl von 1 mg/ Tag bis zu 20 mg/ Tag intramuskulär (i.m.) oder subkutan (s.c.), um die Homocystein- und Methylmalonsäurewerte zu senken und die Methioninkonzentrationen zu steigern. Je nach Ansprechen der Therapie können die Zeitintervalle der OH-Cbl-Gaben im Verlauf verlängert werden (Carrillo-Carrasco et al., 2012; Carrillo-Carrasco, Sloan, Valle, Hamosh, & Venditti, 2009; Van Hove et al., 2002).

Selbst hohe Gaben von OH-Cbl i.m. scheinen keine gravierenden Nebenwirkungen aufzuweisen (Matos et al., 2013). Die orale Gabe von CN-Cbl hat sich sowohl *in vitro* als auch in klinischen Studien an CblC-Patienten als weitaus ineffektiver erwiesen als die i.m. Applikation von OH-Cbl (Andersson & Shapira, 1998; Mellman & Willard, 1979). Ebenso ist die parenterale Gabe von OH-Cbl der i.m. Gabe von Me-Cbl überlegen (Ribes et al., 1990).

Zusätzlich können Betain, Folsäure und L-Carnitin verabreicht werden. Betain unterstützt in Leber und Niere als Substrat der Betain-Homocystein-Methyltransferase die Umwandlung von Homocystein zu Methionin. Folsäure steigert die Remethylierungskapazität durch Bereitstellung des MeH₄-Folats (Martinelli et al., 2011). Das aus Methionin und Lysin bestehende L-Carnitin erleichtert die Ausscheidung von Propionylgruppen (Bartholomew et al., 1988).

Die parenterale Gabe von OH-Cbl führt häufig zu einer raschen Verbesserung der metabolischen Auffälligkeiten sowie einer Normalisierung der hämatologischen und klinischen Parameter (Carrillo-Carrasco et al., 2009; Van Hove et al., 2002).

Auch die Mortalitätsrate kann durch eine frühzeitige Therapie gesenkt werden.

Die neurologischen Symptome sprechen hingegen wesentlich schlechter auf eine Behandlung mit OH-Cbl an (Rosenblatt et al., 1997). So bleibt das Langzeitoutcome

der neurologischen, aber auch ophthalmologischen Symptomatik häufig therapierefraktär (Koenig et al., 2015).

1.7. MMACHC-Spleißmutationen mit Verlust des 2. Exons

Bereits 1990 berichteten Brandstetter und Kollegen über einen Säugling mit CbIC und akutem Cor pulmonale (Brandstetter, Weinhouse, Splaingard, & Tang, 1990). Kömhoff und Kollegen beschrieben 2013 fünf weitere Kinder mit der seltenen pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) in Kombination mit einer renalen thrombotischen Mikroangiopathie (rTMA) (Kömhoff et al., 2013).

Laborchemische sowie genetische Analysen dieser Patientengruppe konnten eine CbIC als Grunderkrankung nachweisen. Darüber hinaus zeigten die genetischen Analysen der Patienten, dass die zugrundeliegenden Mutationen durch fehlerhaftes Spleißen in der Deletion des 2. Exons des MMACHC-Gens münden, wobei das Leseraster erhalten bleibt. Aus der verkürzten mRNA resultiert ein verkürztes MMACHC-Protein von 217 Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp (wt) MMACHC-Protein mit 282 Aminosäuren.

Insgesamt konnte für vier unterschiedliche Mutationen im MMACHC-Gen das Herausspleißen des 2. Exons experimentell bestätigt werden: zwei Mutationen, die als Spleiß-Akzeptorstelle am 5'Ende des 2. Exons lokalisiert sind: *c.82-9_12delTTTC*, *c.82-7_82-5delGTT* und zwei Mutationen, die auf dem letzten Nukleotid des 2. Exons liegen: *c.276G>A*, *c.276G>T* (Kömhoff et al., 2013).

Eine chinesische Arbeitsgruppe aus Beijing (Liu et al., 2017, 2020) berichtet über weitere 14 CbIC-Patienten mit einer PAH in Kombination mit renalen Auffälligkeiten (Hämaturie, Proteinurie, CKD). Alle Patienten wiesen compound-heterozygote Mutationen im MMACHC-Gen auf, mit der Mutation *c.80A>G* auf einem Allel und in der Mehrzahl der Fälle der in China vorherrschenden *c.609G>A*-Mutation auf dem zweiten Allel.

Abbildung 5 verdeutlicht schematisch die Lage der unterschiedlichen Mutationen auf dem MMACHC-Gen und das gemeinsame Resultat der verschiedenen Δ Ex2-Spleißmutationen auf mRNA-Ebene.

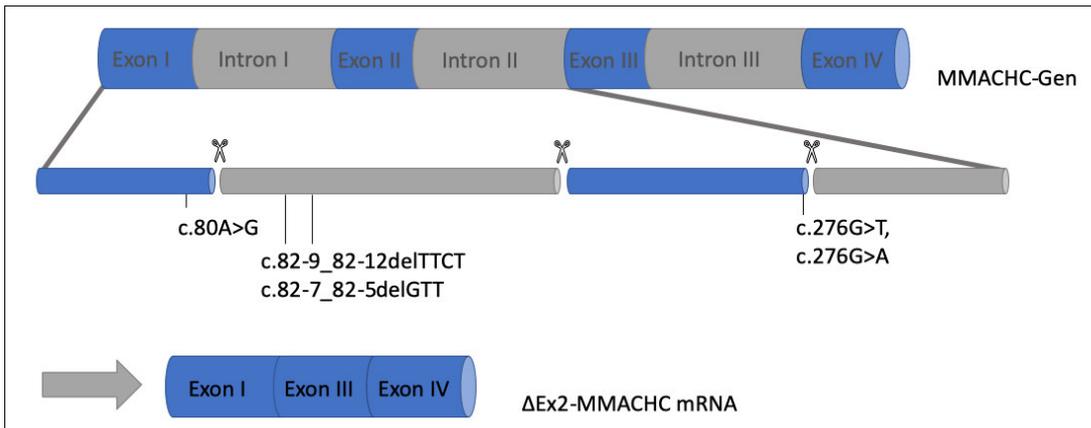


Abbildung 5: MMACHC-Spleißmutationen mit Verlust des 2. Exons. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem MMACHC-Gen (Exon I- Exon IV). Die zweite Zeile zeigt den Ausschnitt zwischen Exon I und Intron II auf Ebene der heterogenen nukleären RNA (hnRNA), die zur mRNA gespleißt wird. Die Scheren stehen für das Spliceosom, das die Introns aus der hnRNA entfernt. Die eingezeichneten Mutationen stellen Spleißmutationen dar, die zu einem Herausspleißen des 2. Exons führen. Die letzte Zeile zeigt die entstehende mRNA bei Δ Ex2-Spleißmutationen. Darstellung in Anlehnung an Beck et al., 2017.

1.7.1. Pulmonal-arterielle Hypertonie

Die PAH wird definiert durch einen mittleren pulmonal-arteriellen Druck in Ruhe von ≥ 25 mmHg in der Rechtsherzkatheteruntersuchung. Pathophysiologisch führt der erhöhte arterielle Druck in der Lunge zu einer zunehmenden Rechtsherzbelastung, die sich in den klinischen Manifestationen der Erkrankung wie einer zunehmenden Luftnot, Stauungsödemen, Brustschmerzen sowie Hämoptyse und zyanotischen Veränderungen widerspiegelt. Unbehandelt führt sie schließlich zum Rechtsherzversagen. Die 5-Jahres-Überlebensrate der familiären und idiopathischen PAH wird unter Therapie mit 66% bis 75% angegeben (Barst et al., 2012; Van Loon et al., 2010).

Gemäß der Nizza-Klassifikation (2013) wird die pulmonale Hypertonie in fünf Klassen unterteilt. Die erste Klasse bildet die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), welche sich wiederum in vier Klassen untergliedert, darunter die idiopathische, die hereditäre und die medikamenten- und toxininduzierte PAH. Die pulmonal veno-okklusive Erkrankung (PVOD) bildet eine eigene Untergruppe innerhalb der ersten Gruppe der PAH (Montani et al., 2016).

Die PVOD stellt eine äußerst seltene Ursache der PAH dar. Im Vergleich zu anderen Formen der PAH geht sie mit einer noch schlechteren Prognose einher. So wird eine

1-Jahres-Sterblichkeit bei Erwachsenen von 88 % (n = 11) beschrieben (Holcomb, Loyd, Ely, Johnson, & Robbins, 2000).

Histopathologisch kennzeichnend ist eine Intimafibrose der postkapillären Venolen und kleinen Venen, welche zu einer Obstruktion des Gefäßlumens führen (Simonneau et al., 2004). Veränderungen treten auch in der arteriellen Strombahn auf: so weisen knapp 90 % der Patienten mit PVOD eine Intimafibrose und/ oder Mediahypertrophie der Pulmonalarterien auf und in der Mehrzahl der Patienten konnte eine kapilläre Proliferation sowie kapilläre Stauungszeichen beobachtet werden (Lantouéjoul, Sheppard, Corrin, Burke, & Nicholson, 2006). Vor diesem Hintergrund wird die PVOD zur Gruppe der PAH-Erkrankungen gezählt.

Zugrundeliegende Prozesse, die zu einer PVOD führen, sind größtenteils unbekannt. Als monogenetisch Ursachen konnten biallelische Mutationen im EIF2AK4-Gen identifiziert werden (Eyries et al., 2014). Zudem wurde eine enge Assoziation zur CbIC-Erkrankung aufgezeigt (Kömhoff et al., 2013).

Bei der Behandlung stehen die kardialen Komplikationen im Vordergrund. Medikamente, die bei der Behandlung der PAH gewöhnlich angewendet werden, wie Calciumkanalblocker, Prostacyclin-Analoga (z.B. Epoprostenol), Phosphodiesterase-5-Inhibitoren (z.B. Sildenafil, Tadalafil) oder Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Bosentan, Sitaxsentan) können bei Patienten mit PVOD zu erheblichen Verschlechterungen der Erkrankung bis hin zum Tod führen (Holcomb et al., 2000; Palmer et al., 1998).

1.7.2. Renale thrombotische Mikroangiopathie und atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom

Bei der TMA kommt es infolge von Endothelschäden zu Thrombosen in den Kapillarendstromgebieten. Nachfolgend führt die Verengung der Blutstrombahn zu einer mechanischen Hämolyse und Thrombozytopenie. Definiert wird die TMA folglich durch den Nachweis einer Thrombozytopenie, einer Coombs-negativen hämolytischen Anämie und einer akuten ischämischen Endorganschädigung (Bommer, Wölfle-Guter, Bohl, & Kuchenbauer, 2018).

Die Ursachen einer TMA sind mannigfaltig, wobei zunächst die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP, Moschcowitz-Syndrom) von dem hämolytisch

urämischen Syndrom (HUS) unterschieden wird. Beim TTP stehen dabei schwere Thrombozytopenien und eine neurologische Symptomatik, beim HUS Nierenschäden im Vordergrund. Eine klare Abgrenzung von TTP und HUS ist mitunter schwierig, sodass auch von TTP/HUS gesprochen wird.

Klassischerweise tritt das HUS nach einer Gastroenteritis mit blutigen Diarrhoen auf, die durch bestimmte darmpathogene Bakterien verursacht wurde. Hier bedingen die Toxine der Bakterien (Shigatoxin, Shiga-like Toxin) die Endothelschäden. Daneben existiert eine heterogene Gruppe von genetischen und erworbenen Erkrankungen, die mit einem HUS einhergehen, bei denen jedoch keine Toxine ursächlich an der Erkrankung sind. Sie werden unter dem Begriff des atypischen HUS (aHUS) subsumiert und machen bei Kindern etwa 5 – 10 % der HUS-Fälle aus (Fakhouri, Zuber, Frémeaux-Bacchi, & Loirat, 2017).

Etwa die Hälfte der Fälle eines aHUS sind auf eine übermäßige Aktivierung des alternativen Komplementwegs zurückzuführen (z.B. Faktor-H-Defizienz), daneben tritt es bei Störungen im Gerinnungssystem sowie der CblC auf (Fakhouri et al., 2017; George & Nester, 2014).

Die Prognose des aHUS ist abhängig von der zugrundeliegenden Ursache, fällt insgesamt jedoch mäßig aus. Vor der Einführung des monoklonalen Antikörpers Eculizumab in die Therapie des aHUS führte die erste Erkrankungsepisode innerhalb eines Jahres bei 16 % der Kinder zum terminalen Nierenversagen und 6,7 % der Kinder verstarben. Bei Erwachsenen lag die 1-Jahres-Sterblichkeitsrate bei nur 0,8 %, demgegenüber führte die erste aHUS-Episode bei 46 % zum terminalen Nierenversagen (Frémeaux-Bacchi et al., 2013). Die Einführung von Eculizumab konnte die renale Prognose deutlich verbessern und die Sterberate entscheidend reduzieren (Fakhouri et al., 2017). Bei CblC-Patienten hat sich Eculizumab in der Therapie des aHUS bisher als unwirksam erwiesen (Beck et al., 2017; Cornec-Le Gall et al., 2014).

1.7.3. Vorüberlegungen zur Pathogenese vaskulopathiespezifischer MMACHC-Mutationen

Als potentielle Auslöser der berichteten Gefäßschädigungen der Niere und der Lunge bei vaskulopathiespezifischen MMACHC-Mutationen kommen drei Besonderheiten der CblC-Erkrankung in Betracht:

- 1.) Hohe intrazelluläre Konzentrationen an Homocystein
- 2.) Hohe intrazelluläre Konzentrationen an Methylmalonsäure
- 3.) Verringerte Methioninwerte

Ein Einfluss erhöhter Homocysteinwerte auf die Pathogenese renaler und pulmonaler Vaskulopathien bei CblC-Patienten liegt aufgrund der vielfach beschriebenen endothelschädigenden Wirkung von Homocystein nahe (Jakubowski, 2013, 2019; Lawrence De Koning et al., 2003). Endothelzellen sind besonders anfällig für erhöhte intrazelluläre Homocysteinkonzentrationen, da sie Homocystein nicht über den Weg der Transsulfuration abbauen können (Perna et al., 2003).

Da die Homocysteinwerte jedoch bei allen CblC-Patienten, auch jenen ohne Δ Ex2-Spleißmutationen, erhöht sind und in der überwiegenden Mehrheit weder mit einer rTMA noch einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks einhergehen, kann das erhöhte Homocystein allein nicht für die Endothelschäden verantwortlich gemacht werden. Dies wird auch durch Beobachtungen von Patienten mit klassischer Homocystinurie deutlich. Durch den Defekt der Cystathionin- β -Synthase (CBS) kann das Homocystein bei dieser Patientengruppe nicht über den Weg der Transsulfurierung abgebaut werden. Die Folge sind sehr hohe Homocysteinwerte im Blut und im Urin, die deutlich über den durchschnittlich beobachteten Werten bei CblC-Patienten liegen. Im Gegensatz zu der CblC sind auch die Methioninwerte erhöht. Patienten mit klassischer Homocystinurie leiden zwar an einem hohen Risiko für Osteoporose, Linsenveränderungen und auch Thromboembolien, eine rTMA oder PAH gehören aber nicht zu den charakteristischen Symptomen der Stoffwechselerkrankung (Mullikin et al., 2018; Sacharow, Picker, & Levy, 2017).

Der Mangel an dem Kofaktor Ado-Cbl führt bei CblC-Patienten durch die Beeinträchtigung der mitochondrialen MCM zu erhöhten Werten der neurotoxischen Methylmalonsäure (MMS). Eine bedeutsame pathophysiologische Rolle erhöhter

MMS-Werte in der Genese der rTMA und PAH bei CblC-Patienten erscheint weniger wahrscheinlich: So kommt es bei Patienten mit CblA, CblB oder *mut* (alle drei einhergehend mit einer isolierten MMA) nicht zum Auftreten renaler oder pulmonaler Vaskulopathien. Wohl aber wird über ein kombiniertes Auftreten einer rTMA und PAH bei einem Patienten mit CblG (isolierte HCU durch Defekt der MS) berichtet (Labrune et al., 1999).

Zusammengenommen deuten die Beobachtungen dieser Krankheitsbilder auf eine mögliche Rolle verminderter Methioninwerte in der Pathogenese der Vaskulopathien hin (Mullikin et al., 2018). Ein Methioninmangel und subsequenter Mangel an SAM geht mit einer verminderten Methylierungskapazität der Zelle einher und führt zu einer globalen DNA-Hypomethylierung. So wird u.a. über eine homocystein-induzierte Promotor-Hypomethylierung des p66shc-Gens berichtet, welche zu einer erhöhten Transkription des p66shc-Gens führt. Das p66shc-Protein erhöht das Level an reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) in der Zelle und fördert über den erhöhten oxidativen Stress die Entstehung einer endothelialer Dysfunktion (Kim et al., 2011).

Auch diese Erkenntnisse lassen jedoch die Frage offen, warum nur ein Bruchteil der CblC-Patienten renale und pulmonale Vaskulopathien aufweist (Mullikin et al., 2018). Eine Wechselwirkung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit Homocystein, inaktiven Cbl-Derivaten oder weiteren Zellproteinen, unter der es zu einer spezifischen Schädigung des renalen und pulmonalen Endothels kommt, sind ebenso denkbar wie direkte gefäßschädigende Eigenschaften des trunkierten Proteins.

1.8. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die beobachtete Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen Δ Ex2-Spleißmutationen im MMACHC-Gen und renal-pulmonalen Vaskulopathien näher zu beleuchten und ein tieferes Verständnis der Auswirkungen des Verlustes des 2. Exons auf Proteinebene zu erlangen.

Insbesondere sollen durch die Charakterisierung des trunkierten Proteins Anhaltspunkte für die Entstehung der vaskulopathiespezifischen Manifestationen (rTMA, PVOD) gefunden werden. Aus den im Zellmodell gewonnenen Erkenntnissen, insbesondere in der Behandlung mit Cbl-Derivaten, werden neue therapeutische Optionen für Δ Ex2-Spleißmutationsträger erhofft.

Aufgrund der dargelegten Überlegungen zur Pathophysiologie der MMACHC-Spleißmutationen wird sich hierbei auf den zytoplasmatischen Weg des MMACHC-Proteins konzentriert.

Folgende vier Fragen sollen im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden:

- 1.) Führt der Verlust des 2. Exons zu einer veränderten Lokalisation des MMACHC-Proteins innerhalb der Zelle (z.B. erhöhter Abbau, Einschleusung in bestimmte Zellorganellen?)
- 2.) Welche Auswirkungen hat der Verlust des 2. Exons auf die Interaktion des MMACHC-Proteins mit seinen Interaktionspartnern ABCD4, LMBD1, MMADHC, MS und MSR?
- 3.) Welche Auswirkungen hat der Verlust des 2. Exons auf die Fähigkeit des Proteins verschiedene Cbl-Derivate zu binden? Kann ein Überangebot von Cbl mögliche Schwächen abmildern, bzw. ganz aufheben?
- 4.) Interagiert das trunkierte Protein mit sich anhäufenden Stoffwechselederivaten wie dem für seine gefäßschädigenden Eigenschaften bekannten Homocystein?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Tabellarische Übersicht über verwendete Chemikalien, Kits, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Programme sowie die Zusammensetzung in dieser Arbeit eingesetzter Puffer. In Klammern sind die jeweiligen Referenznummern bestimmter Materialien vermerkt.

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
10x Rn Puffer	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim (200518)</i>
25 mM dNTPs	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Agar	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Ampicillin	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
APS 10 %	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Bacto Hefeextrakt	<i>Becton, Dickinson ans Company, France</i>
Bacto Tryptone	<i>Becton, Dickinson ans Company, France</i>
BSA Purified	<i>New England BioLabs Inc., Frankfurt a.M.</i>
CHAPS	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Clarity™ Western ECL Substrate	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond; USA</i>
DAKO Blockpuffer	<i>Agilent, Santa Clara, USA (S3022)</i>
DMSO 100 %	<i>New England BioLabs Inc., Frankfurt a.M.</i>
DNA Loading Dye (6X)	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot (R0611)</i>
Dulbeccos PBS, w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red	<i>Capricorn Ltd, Fordingbidge, UK</i>
Duolink Mounting Media mit DAPI	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim (DUO82040)</i>
EDTA	<i>Serva, Heidelberg</i>
Essigsäure	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
FCS	<i>BioChrom GmbH, Berlin</i>
GelRed™ Nucleid Acid Gel Stain	<i>Biotium Inc., Fremont, USA (41003)</i>
Glukose	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

Glycerol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glycin	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
HEPES	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Isopropanol	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Lipofectamin RNAiMAX	<i>Thermo Scientific (13778)</i>
Lipofectamin™ 3000	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Methanol	<i>Honeywell, New Jersey; USA</i>
Milchpulver	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
NE Buffer II	<i>New England BioLabs Inc., Frankfurt a.M. (B7002S)</i>
OptiMEM	<i>Gibco, Darmstadt (31985047)</i>
P3000™	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Page Ruler Prestained Protein Ladder	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot (26617)</i>
Paraformaldehyd	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Penicillin (1000 U/ml) /Streptomycin (10 mg/ml)	<i>Capricorn Ltd, Fordingbidge, UK</i>
peqGOLD 1kb Ladder Orange G	<i>PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen</i>
Ponceau S Lösung	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Proteinaseinhibitor	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Rotiphorese-NF Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
SDS	<i>AppliChem, Darmstadt</i>
SeaKem® LE Agarose	<i>Lonza, Basel; Switzerland</i>
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
TEMED	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Trans-Blot Turbo Transferblotter	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, USA (10026938)</i>
Tris(hydroxymethyl) aminomethan	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Triton X-100	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Tripanblau	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Trypsin-EDTA 10 x, 0,5 %/ 0,2 % in PBS	<i>PAA The Cell Culture Company</i>
Tween ^R 20	<i>Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe</i>
Vectashield Antifade Mounting Medium	<i>Vector Laboratories, Kalifornien, USA</i>

2.1.2. Kommerzielle Kits

Tabelle 3: kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
Duolink® PLA in situ Red Starter Kit	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim (DUO92101)</i>
E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I	<i>Omega Bio-tek Inc., Norcross; USA (D6942)</i>
Pierce™ BCA™ Protein-Assay Kit	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot (23225)</i>
Plasmid Plus Midi Kit (100)	<i>Qiagen, Hilden (12943)</i>
PrepEase Gel Extraction Kit	<i>Affymetrix, Inc., Ohio, USA (78756)</i>
Quick Change site-directed mutagenesis Kit	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim (200518)</i>
TGX Fast Cast Acrylamid Kit, 10 %,	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond; USA (161-0171)</i>

2.1.3. Geräte und Programme

Tabelle 4: Geräte und Programme

Geräte	Hersteller
Adventurer™ Waage	<i>Ohaus GmbH, Gießen</i>
Biofuge fresco gekühlte Mikroliterzentrifuge	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
BLAST Software	<i>National Center for Biotechnology Info, Bethesda, USA</i>
ChemiDoc MP Imaging System	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, USA</i>
ChemDraw Version 19.1	<i>PerkinElmer, Waltham, USA</i>
DNA 5	<i>Harvard, Cambridge, USA</i>
IBM SPSS Statistics	<i>Armonk, USA</i>
ImageJ (1.52a)	<i>US National Institut of Health</i>
Inkubator	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Infinite M 200 Pro Photometer	<i>Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz</i>
EASY-CAST™ Electrophoresis System	<i>Owl Scientific Inc., Woburn, USA</i>
Geldokumentation System	<i>Vilber Lourmat, Collégien; Frankreich</i>
GeneAmp PCR System 9700	<i>Thermo Scientific, St. Leon-Rot</i>
Heizblock Thermomixer 5436	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
LabCycler	<i>SensoQuest, Göttingen</i>
Magellan Software	<i>Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz</i>
Microsoft Office Version 16.16.25	<i>Microsoft, München</i>

Mini-Protean Tetra Cell Casting Stand & Clamps	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, USA
Multi Axle-Rotating-Mixer RM5 - V 80	Kobe KG, Marburg
Multitron	Infors GmbH, Bottmingen, Schweiz
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
NanoDrop2000c Software	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
pH-Meter MP220	Kobe KG, Marburg
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Tischzentrifuge FVL-2400	Kobe KG, Marburg
Trans-Blot Turbo Blotter	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, USA
Transferpette (10, 100, 1000 µl)	Brand GmbH, Wertheim
EZ-Vac™ Vaccum Manifold	ZymoResearch, Freiburg
Varifuge 3.0 RS	Kobe KG, Marburg
Wasserbad, thermostatisches	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Zeiss Axio Apotom Mikroskop	Carls Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Zeiss AxioVision rel. 4.8 Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6-Well-Platten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
8-Well-Kammerobjektträger, Glas	Nunc LAB-TEK, Naperville, US
96-Well-Mikrotestplatten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Amershan Protran™ 0,45 µm Nitrocellulose Membran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Blottingpapier, 1,5 mm	Kobe KG, Marburg
Deckgläser (Menzel, superfrost)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Falcons (15/50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Filter Paper Grade 2	GE Healthcare, Buckinghamshire, US
Filterspitze Millex™	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mikroreaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pasteurpipetten (230 mm)	Kobe KG, Marburg
Perfusorspritze	Braun, Melsungen
PCR Folie, stark klebend	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipette (serologisch) (5/10/25 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen Fintip (10/100/1000 µl)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Pipettenspitzen mit Filter 10 – 200 µl	Stralab GmbH, Ahrensburg

Zellkulturflasche (TC- Flask, T75 Standard)

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

Zellschaber (16cm)

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

2.1.5. Puffer

Tabelle 6: Ansatz 10x TAE Puffer, pH 7,6

Chemikalien	Menge
TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan	48,4 g
Essigsäure	11,42 ml
EDTA	4,5 g
dest. H ₂ O	auf 1 Liter

Tabelle 7: 10x Laufpuffer, pH 7,9 - 8,3

Chemikalien	Menge
TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	35 mM
H ₂ O	auf 1 Liter

Tabelle 8: SOC-Medium, pH 7,3

Chemikalien	Menge
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM
Bacto Hefeextrakt	2 %
Bacto Trypton	0,5 %
H ₂ O	auf 1 Liter

Tabelle 9: LB-Medium

Chemikalien	Menge
NaCl	10 g
Bacto Hefeextrakt	5 g
Bacto Trypton	10 g
Ampicillin	1 ml
H ₂ O	auf 1 Liter

Tabelle 10: 10x PBS Puffer, pH 7,6

Chemikalien	Menge
NaCl	85 g
NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O	13,8 g
H ₂ O	auf 1 Liter

Tabelle 11: Tris-SDS Puffer, pH 6,8 und pH 8,8

Chemikalien	pH 6.8	pH 8.8
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	7,88 g	23,64 g
SDS	0,4 g	0,4 g
ddH ₂ O	auf 200 ml	auf 200 ml

2.2. Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten dienen der Bereitstellung der DNA-Konstrukte wt-MMACHC-flag, wt-MMACHC-myc, ΔEx2-MMACHC-flag und ΔEx2-MMACHC-myc. Die entsprechenden Plasmidkarten sind dem Anhang entnehmbar.

2.2.1. Gezielte Mutagenese

Die gezielte Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) bedient sich der Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei neben der bloßen Vervielfältigung von DNA das gezielte Einbringen von Mutationen in die DNA-Sequenz im Vordergrund steht. Dies gelingt mittels spezifischer Primer, welche neben den notwendigen homologen Sequenzen für die Primerhybridisierung die einzubringenden Mutationen enthalten, bzw. so binden, dass bestimmte Bereiche des Templates ausgespart und im Folgenden nicht weiter amplifiziert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde die gezielte Mutagenese verwendet, um Plasmide, die als Insert das MMACHC-Konstrukt enthielten, gezielt von allen zusätzlichen Tags zu trennen und die beiden Konstrukte wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC jeweils neu mit einem Flag-Tag und in einem weiteren Ansatz mit einem Myc-Tag zu versehen. Dazu wurde das *Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit* genutzt.

Tabelle 12 zeigt den Ansatz für die gezielte Mutagenese. Unter Berücksichtigung der verwendeten Primer (siehe Tabelle 13), der Polymerase und der Template-Längen wurden die in Tabelle 14 aufgelisteten Einstellungen des Thermocyclers vorgenommen. Zunächst erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA und Aktivierung der Pfu-Polymerase bei 96°C. Zur Hybridisierung der Primer-Oligonukleotide mit der Template-DNA (*Primer Annealing*) wurde eine Temperatur von 55°C eingestellt. Das Hinzufügen von DMSO diente hierbei der Herabsetzung der Annealing-Temperatur, was eine bessere Einarbeitung der vollständigen Tags fördert, da sowohl der Flag-Tag (24bp) als auch der Myc-Tag (30 bp) für die gezielte Mutagenese recht lange Sequenzen darstellen. Die gebundenen Primer werden von der Pfu-Turbo-Polymerase erkannt, welche den Schritt der Elongation einleitet, indem sie die komplementären DNA-Stränge vervollständigt. Damit die Pfu-Turbo-Polymerase optimal arbeiten kann, wurde die Temperatur auf 68°C erhöht. Die Pfu-Turbo-Polymerase entstammt dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*. Sie ist thermostabil und verfügt über eine Korrekturlesefunktion, um die Anzahl fehlerhafter Amplikons möglichst gering zu halten. Aus der erwarteten Länge des Plasmids von ca. 6000 bp ergab sich eine Elongationslänge von 12 Minuten (Arbeitsgeschwindigkeit der Pfu-Turbo-Polymerase: 500 bp/ Min.). Nach Ablauf der Elongation wurde die Temperatur wieder auf 90°C erhöht, um die Denaturierung der frisch gebildeten Doppelstränge herbeizuführen und eine neue Phase der Elongation einzuleiten. So wurde die exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenzen erreicht. Um eine möglichst hohe Amplifikation zu erreichen, wurden 25 Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt, worauf eine zweiminütige terminale Elongation folgte. Bis zur Entnahme der PCR-Produkte wurden diese bei 4°C im Thermocycler aufbewahrt.

Tabelle 12: Ansatz gezielte Mutagenese

Bestandteile	Menge/ Volumen	Beschreibung
Template DNA	200 ng	MMACHC-wt MMACHC-ΔEx2
Primer forward	0,8 µl	MMACHC-c-myc-sdm-F / MMACHC-c-flag-sdm-F
Primer reverse	0,8 µl	MMACHC-c-myc-sdm-R / MMACHC-c-flag-sdm-R /
10 X Rn Puffer	2,5 µl	
25 mM dNTPs	0,5 µl	
Pfu Turbo Polymerase	0,5 µl	
DMSO	0,5 µl	
Destilliertes, nukleasefreies H ₂ O	19 µl	

Tabelle 13: Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
MMACHC-c-myc-sdm-F	5'GCATCCCCTGGCCCTGAGCAAAAGCTGATTC TGAGGAGGATCTGTAAGCGGCCGCGACT	Sigma-Aldrich, Steinheim
MMACHC-c-myc-sdm-R	5'AGTCGCGGCCGCTTACAGATCCTCCTCAGAAA TCAGCTTTTGCTCAGGGCCAGGGGATGC	Sigma-Aldrich, Steinheim
MMACHC-c-flag-sdm-F	5'GCATCCCCTGGCCCTGACTACAAAGACGATGA CAAGTAAGCGGCCGCGACT	Sigma-Aldrich, Steinheim
MMACHC-c-flag-sdm-R	5'AGTCGCGGCCGCTTACTTGTCATCGTCTTTGTA GTCAGGGCCAGGGGATGC	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tabelle 14: Einstellungen des Thermocyclers

Ablauf	Temperatur	Zeit	Zyklen
Polymerase Aktivierung	96°C	30 Sek.	1
Denaturierung	96°C	30 Sek.	25
Primerhybridisierung	55°C	1 Min.	○
Elongation	68°C	12 Min.	
Terminale Elongation	68°C	2 Min.	1
Aufbewahrung	4°C	bis zur Entnahme	

2.2.2. Restriktionsverdau mit Dpn1

Um die ursprünglichen Template-DNA-Stränge zu entfernen, wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym Dpn1 für 1h bei 37°C durchgeführt. Dabei wurde dem gesamten PCR-Produkt der gezielten Mutagenese 1 µl des Dpn1 Enzyms (2000 U/ ml) zugefügt. Dpn1 schneidet spezifisch methylierte DNA, nicht aber die unmethylierten Stränge der neu entstandenen PCR-Produkte, sodass die MMACHC-DNA mit dem neu eingebrachten Tag nicht verdaut wird.

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Produkte der gezielten Mutagenese und des Restriktionsverdaus wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Vorgehen zum Gießen eines 1 %-igen TAE-Agarosegels (TAE = *Tris-acetic acid- EDTA*) kann Abschnitt 2.2.3.1. entnommen werden. Zum Laden des Gels wurden 15 µl aus dem fertigen Restriktionsverdau entnommen und mit 5 µl DNA Loading Dye zur visuellen Kontrolle der Migration der Proben während der Elektrophorese versehen. Die Proben, sowie der Größenmarker (*peqGOLD 1kb Ladder Orange G*) wurden auf ein 1 %-iges TAE-Agarosegel, versetzt mit GelRed™ geladen. Als Puffer wurde 1x TAE-Puffer mit einem pH-Wert von 7,6 verwendet. Die genaue Zusammensetzung des TAE-Puffers kann Tabelle 6 entnommen werden. Adjustierungen des pH-Wertes erfolgten durch 25 %-ige Salzsäure.

Während der Gelelektrophorese wandert die negative geladene DNA durch das Agarosegel von der Kathode zur Anode, wobei sie mit dem im Gel enthaltenen Gelred™ interkaliert. Wird das Gel an UV-Licht exponiert, leuchten die mit dem Gelred™ interkalierenden DNA-Banden. Mithilfe des Markers konnte so die Größe des Inserts und des Vektors überprüft werden. Zur UV-Licht Exponierung wurde das *Chemi-Doc MP Imaging System* herangezogen.

2.2.3.1. Gießen der Agarosegele

Für diese Arbeit wurden ausschließlich 1 %-ige TAE-Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt bis zur vollständigen Auflösung der Agarose. Vor dem Gießen des Gels wurde der Agaroselösung das interkalierende Nukleinsäurefärbemittel GelRed™ zugesetzt. Für

ein 40 ml Agarosegel wurden dabei 2 µl GelRed™ für eine schnelle Kontrolle der Bandengröße, 7 µl GelRed™ für eine Geldokumentation und 10 µl GelRed™ für eine nachfolgende Extraktion und Purifikation verwendet.

2.2.4. Transformation in XL 1 Blue Strain E.coli Bakterien

Bei positiver Bandenkontrolle in der Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.3.) erfolgte die Transformation der PCR-Produkte der gezielten Mutagenese in E.coli Bakterien (XL 1 Blue Strain), welche zuvor mittels Rubidiumchlorid-Methode chemisch kompetent gemacht wurden. Ein 100 µl Aliquot der kompetenten E.coli wurde dem Stickstofftank entnommen und mit 5 µl des PCR-Produkts gemischt. Es folgte ein 45-sekündiger Hitzeschock bei 37°C und die sofortige Inkubation auf Eis für weitere 5 Minuten. Anschließend wurde 1 ml antibiotikafreies SOC-Medium hinzugefügt (Zusammensetzung siehe Tabelle 8). Die entstandene Suspension wurde für 45 Minuten unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert und anschließend bei 5000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Nach Beseitigung des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl LB-Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) resuspendiert, auf einer Agarplatte mit Ampicillinzusatz (35 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin in die Agarplatte können nur solche Bakterien wachsen, die erfolgreich das neue Plasmid, welches eine Ampicillinresistenz enthält, aufgenommen haben. Am nächsten Tag wurden 4 – 5 Einzelkolonien gepickt und 5 ml flüssiges, ampicillinhaltiges LB-Medium mit jeweils einem positiven E.coli-Klon beimpft. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator (*Multitron*). Die entstandene Bakterienkultur wurde abschließend bei 10.000 x g für eine Minute zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet für die Plasmid-DNA Extraktion und Purifikation entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5. Plasmidisolierung und Aufreinigung

Nach erfolgreicher Transformation mussten die Plasmide aus den E.coli Bakterien extrahiert werden. Hierzu wurden zwei Verfahren angewendet: die Mini- und die Midi-Präparation. Bei der Mini-Präparation wird eine eher geringe Menge an Plasmid-DNA gewonnen (bis zu 25 µg Plasmid DNA aus 1 – 5 ml Bakterienkultur),

welche vor der weiteren Nutzung mittels Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.2.8.) auf ihre Fehlerfreiheit überprüft wird. Bei der Midi-Präparation werden größere Mengen (bis zu 250 µg Plasmid DNA aus 25 – 50 ml Bakterienkultur) aufgereinigter DNA gewonnen.

2.2.5.1. Minis

Zur Extraktion und Aufreinigung der Plasmide aus der Bakterienkultur wurde das *E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit* entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Das gewonnene Bakterien-Pellet wurde ein zweites Mal bei 10.000 x *g* für zwei Minuten zentrifugiert und nach Abschütten des Überstandes in 250 µl der RNase A enthaltenden Lösung I resuspendiert. Als nächstes wurden 250 µl Lösung II hinzugegeben, welche die Zellmembran lysiert und deren alkalischer pH-Wert die Denaturierung von Proteinen und chromosomaler DNA einleitet, wovon die Plasmid-DNA jedoch unbeeinträchtigt bleibt. Die Zugabe von 350 µl der acetathaltigen Lösung III neutralisierte den pH-Wert, sodass die denaturierten Proteine, chromosomale DNA und andere Zellreste präzipitierten. Diese wurden im nächsten Schritt bei 13.000 x *g* für zehn Minuten abzentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA musste im Folgenden aufgereinigt werden. Dies geschah mithilfe der im Kit enthaltenden *HiBind DNA Mini Columns*, welche an einer Vakuumpumpe angeschlossen wurden. Der Überstand wurde auf die Säulen gegeben und die Plasmid-DNA durch eine mit Silica-Gel beschichtete Membran aufgefangen. Durch Zugabe des stark salzhaltigen HBC-Puffers mit Isopropanol wurde die aufgefangene Plasmid-DNA purifiziert. Die chaotropen Salze denaturieren dabei ungewollte, an die DNA bindende Proteine. Anschließend erfolgten Waschschriffe zur Beseitigung der hohen Salzkonzentrationen (*DNA Wash Buffer* mit Ethanol). Zum Schluss wurde das Ethanol durch zweiminütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit entfernt und die an der Membran fixierte DNA durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer/Säule und zehnminütiger Inkubation bei RT von der Säule befreit.

2.2.5.2. Midis

Midis funktionieren nach dem gleichen Prinzip wie Minis, nur dass sie eine höhere Ausbeute an DNA liefern (etwa 1 – 3 µg/ µl). Zur Durchführung von Midis kam das kommerzielle *Plasmid Plus Midi Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben zum Einsatz.

2.2.6. Quantifizierung gewonnener DNA-Mengen

Die gewonnene DNA-Konzentration wurde mithilfe des NanoDrop 2000c Spektrophotometers gemessen und mittels der zugehörigen Software *NanoDrop2000* analysiert. Die Auswertung durch die Software erfolgte nach dem Lambert-Beer'sche Gesetz, wobei das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt.

2.2.7. Subklonierung

Um etwaige Mutationen im Vektor, die durch die hohe Amplifikationsrate entstehen können, zu beseitigen, wurde eine Subklonierung vorgenommen. Dabei wurden die Inserts zunächst aus dem Plasmid durch die passenden Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels eines DNA-Gel-Extraktionkits dem Agarosegel entnommen und aufgereinigt. Abschließend wurden die aufgereinigten Inserts in einen neuen, fehlerfreien pcDNA3.1.+ Expressionsvektor kloniert. Auch dieser wurde mittels Restriktionsverdau durch die gleichen Restriktionendonukleasen linearisiert. Mithilfe der Ligation wurden abschließend Vektor und Insert miteinander in einem Plasmid vereint.

2.2.7.1. Restriktionsverdau

Mithilfe der passenden Restriktionsenzyme Not I und Hind III kann im Restriktionsverdau das durch die gezielte Mutagenese erworbene Insert aus dem Vektor gelöst werden. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die verwendeten Komponenten sowie Volumina des Restriktionsverdaus. Der Vektor pcDNA3.1+ wurde über die Firma Thermo Fisher bezogen und ebenfalls durch die gleichen Restriktionendonukleasen geschnitten. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C angesetzt.

Tabelle 15: Ansatz Restriktionsverdau

Vektor-Ansatz		Insert-Ansatz	
pcDNA3.1+	10 µg	Insert	3 µg
Buffer 2	5 µl	Buffer 2	5µl
Not I	6 µl	Not I	2µl
Hind III	5 µl	Hind III	1,5µl
BSA	0,5 µl	BSA	0,5µ
ddH ₂ O	auf 50 µl	ddH ₂ O	auf 50µl

2.2.7.2. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Der gesamte Ansatz des Restriktionsverdau (50 µl) wurde auf ein 1 %-iges TAE-Agarosegel aufgetragen und die entsprechenden Banden ausgeschnitten, gewogen und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt (pcDNA 3.1+ Vektor: 5428bp, MMACHC-myc: 876 bp + MMACHC-flag: 870 bp).

Die Aufreinigung der DNA aus dem *PrepEase Gel Extraction Kit* erfolgte nach Herstellerangaben. Pro 100 mg Agarosegel wurden 200 µl NT Buffer in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und für zehn Minuten bei 50°C inkubiert mit zwischenzeitlichen leichten Vortexen bis sich das Gel komplett auflöste. Anschließend wurde eine *PrepEase Cleanup* Säule auf ein 2 ml Sammelgefäß platziert und mit maximal 700 µl der Probe beladen, für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert und, nachdem der Inhalt des Sammelgefäßes entfernt wurde, mit der restlichen Probe beladen und abermals zentrifugiert. Die DNA haftete nun an der Silica-Membran der *Cleanup* Säule. Zur Reinigung wurden zwei Waschschriffe mit 700 µl ethanolhaltiger *NT3 Buffer* durchgeführt. Es folgte das Trocknen der Membran durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 x g, um das gesamte Ethanol zu entfernen. Abschließend erfolgte die Elution der DNA aus der Membran in ein frisches Mikroreaktionsgefäß mithilfe von 30 µl *NE Buffer*. Nach zehnminütiger Inkubation bei RT wurde die Säule abschließend eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert.

2.2.7.3. Ligation

Die aufbereitete Insert-DNA aus dem Agarose-Gel, mit den Konstrukten: wt-MMACHC-flag, wt-MMACHC-myc, ΔEx2-MMACHC-flag, ΔEx2-MMACHC-myc, wurde

mithilfe der Ligation jeweils in einen neuen pcDNA3.1.+ Vektor eingebaut. Tabelle 16 gibt Auskunft über die Zusammensetzung des Ligationsansatzes. Dieser wurde auf Eis zusammen pipettiert und bei 16°C über Nacht inkubiert. Anschließend folgte die Transformation in kompetente E.coli Zellen (siehe Abschnitt: 2.2.4.), die Gewinnung von aufgereinigter DNA mittels Midi (siehe Abschnitt 2.2.5.2.) und, nach Prüfung der Fehlerfreiheit der Sequenzen, die Herstellung von Glycerolstocks (siehe Abschnitt 2.2.9.).

Tabelle 16: Ansatz Ligation

Bestandteil	Volumen
Insert-DNA	6 μ l
pcDNA3.1+ Vektor	2 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
T4 Ligase Puffer	1 μ l

2.2.8. Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch die Firma Microsynth SeqLab (Göttingen) nach der Sanger Methode vorgenommen. Vorbereitend wurde ein 12 μ l Ansatz aus 1 μ g DNA, 3 μ l des jeweiligen Primers (CMV for, Sequenz: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG) und destilliertem H₂O hergestellt. Ergebnisse wurden mithilfe der Software *DNA 5* (Harvard) und der Datenbank *BLAST* (NCBI) ausgewertet.

2.2.9. Herstellung von Glycerinkulturen

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurde eine 1:1 Verdünnung der jeweiligen Bakterienkultur mit 50%-igem Glycerin vorgenommen und die Kulturen bei -80°C eingefroren.

2.3. Zellkultur

Ausgangspunkt aller Experimente dieser Arbeit bildete die Zellkultur. Im Folgenden werden die verwendete Zelllinien sowie die eingesetzten Methoden innerhalb der Zellkultur vorgestellt.

2.3.1. Zelllinien

Zur Durchführung der Experimente kamen drei verschiedene adhärenz Zelllinien zum Einsatz: human embryonic kidney cell line 293 (HEK293), human liver cancer cell line G2 (HepG2) und COS-7-Zellen. Die Kultivierung erfolgte in T-75 Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 %-iger Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) für HEK293- und COS-7-Zellen, sowie das Minimum Essential Media (MEM) für HepG2-Zellen verwendet. Beide Nährmedien wurden mit 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 10% fötalem Kälberserum versetzt. Die genaue Zusammensetzung der Nährmedien ist Tabellen 17 und 18 zu entnehmen. Alle Zelllinien wurden regelmäßig, mindestens 1x/ Woche gesplittet und das Nährmedium nach spätestens drei Tagen durch neues ersetzt. Das Splitten erfolgte unter Verwendung von 0,05 %-igen Trypsin-EDTA (HEK293-, COS-7-Zelllinie), bzw. 0,5 %-igem Trypsin-EDTA (HepG2-Zellen).

2.3.1.1. Humane embryonale Nierenzellen: HEK293

Bei HEK293-Zellen handelt es sich um eine adhärenz wachsende, menschliche embryonale Nierenzelllinie. Die Immortalisierung der HEK293-Zellen erfolgte durch die Transformation mit fragmentierten DNA-Teilen des Adenovirus Typ 5, welche im Einbau eines 4,5 kbp langen, viralen Segments in Chromosom 19 mündete (Louis, Eveleigh, & Graham, 1997; Russell, Graham, Smiley, & Nairn, 2008). HEK293-Zellen sind für ihre leichte Handhabung, ihr schnelles Wachstum und gute Transfektionseffizienz bekannt (Thomas & Smart, 2005).

2.3.1.2. Humane Leberzelllinie: HepG2

Die HepG2-Zelllinie ist eine immortalisierte Zelllinie aus Gewebe eines hepatozellulären Karzinoms. Sie zeigen eine epithelial-ähnliche Ausdifferenzierung

und wachsen in Monolayer mit Tendenz zur Koloniebildung. Aufgrund ihrer karzinogenen Abstammung enthalten sie einen hyperdiploiden Karyotyp mit 55 Chromosomenpaaren. HepG2-Zellen sind in der MMACHC-Forschung eine etablierte Zelllinie, da sie die Proteine des Cbl-Stoffwechsels in großen Mengen produzieren.

2.3.1.3. Simiane Nierenzellkarzinomzellen: COS-7

COS-Zellen (COS = CV-1 in Origin with SV40 genes (Gluzman, 1981)) sind adhärent wachsende Zellen, die ursprünglich dem Nierengewebe des afrikanischen grünen Affen (*Ceropithecus aethiops*) entstammen. Der Klon 7 wurde verwendet, da er sich aufgrund seiner guten Ausdifferenzierung, seines großen Plasmavolumens im Verhältnis zum Zellkern und seiner guten Haftung auf Glas gut für immunozytologische Untersuchungen sowie dem Proximity Ligation Assay (PLA) eignet.

2.3.2. Zubereitung supplementierter Nährmedien

Nährmedien wurden mit Cobalaminderivaten und Homocystein supplementiert. Eine Auflistung der verwendeten Derivate und Konzentrationen gibt Tabelle 19. Die Zubereitung der angereicherten Medien erfolgte je nach verwendeter Zelllinie mit DMEM (HEK293, COS-7) oder MEM (HepG2) als Lösungsmedium. Die supplementierten Medien wurden vor jedem Versuch frisch zubereitet.

2.3.2.1. Cobalaminhaltige Nährmedien

Zur Vorbereitung eines 100 μM Cbl-haltigen Mediums wurden 6,8 mg CN-Cbl, bzw. 7 mg OH-Cbl mit der Analysenwaage abgewogen und in 50 ml Vollmedium suspendiert. Um die vollständige Lösung des Cbls sicherzustellen, wurde die Suspension für 30 Min. bei 37°C in einem thermostatischen Wasserbad erhitzt. Anschließend erfolgte die sterile Filtration mittels Perfusorspritze mit Filteraufsatz (*Filterspitze Millex™*). Das steril filtrierte Medium mit 100 μM CN-/ OH-Cbl wurde in neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen mit dem jeweiligen Vollmedium verdünnt, sodass die finalen Konzentrationen von 50 μM , 10 μM und 5 μM vorlagen.

2.3.2.2. Homocysteinhaltige Nährmedien

Die Zubereitung der homocysteinhaltigen Medien erfolgte nach dem gleichen Prinzip: nach Abwiegen von 2,7 mg L-Homocystein mit der Analysenwaage und der Lösung im Vollmedium wurde das 400 μ M homocysteinhaltige Nährmedium steril filtriert und auf die finalen Konzentrationen von 100 μ M und 200 μ M verdünnt.

Tabelle 17: Nährmedium HEK293- und COS-7-Zelllinien

Chemikalien	Konzentration	Hersteller
DMEM High Glucose + D-Glucose (4,5 g/l) + L-Glutamin + Natriumpyruvat (110mg/l)		Gibco, Darmstadt (10566016)
Fötale Kälberserum, FBS Superior	10%	Biochrom, Berlin (S0615)
Penicillin/Streptomycin	1%	Gibco, Darmstadt (15070-063)

Tabelle 18: Nährmedium HepG2-Zelllinie

Chemikalien	Konzentration	Hersteller
MEM mit Earle's Salts		Capricorn, Ebsdorfergrund (MEM-Xa)
Fötale Kälberserum, FBS Superior	10 %	Biochrom, Berlin (S0615)
L-Glutamin	1 %	Capricorn, Ebsdorfergrund (STA-B)
Penicillin/Streptomycin	1 %	Gibco, Darmstadt (15070-063)

Tabelle 19: Zusätze ins Nährmedium

Zusatz	Konzentrationen	Hersteller
Cyanocobalamin	5 μ M, 10 μ M, 50 μ M	Sigma-Aldrich, Steinheim (C3607-500MG)
Hydroxycobalamin acetat	5 μ M, 10 μ M, 50 μ M	Sigma-Aldrich, Steinheim (H8017-250MG)
L-Homocysteine	100 μ M, 200 μ M	Sigma-Aldrich, Steinheim (69453-10MG)

2.3.3. Transfektion

Zur Untersuchung der Eigenschaften des Δ Ex2-MMACHC-Proteins wurden die beschriebenen Zelllinien mit der DNA des trunkierten Proteins sowie der DNA des wt-MMACHC-Proteins und dessen Interaktionspartner transfiziert.

2.3.3.1. Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Zum zeitweiligen Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryontische Zelllinien wurde das Prinzip der Lipofektion angewendet. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamin™ 3000, dessen kationische Lipide im wässrigen Milieu Liposomen bilden. Treffen Liposomen auf freie Nukleinsäuren entstehen Lipid-Nukleinsäure-Komplexe, sogenannte Lipoplexe, die aktiv durch Endozytose über die negativ geladene Zellmembran ins Zellinnere transportiert werden können (Felgner et al., 1987). Damit das Plasmid in den Zellkern gelangen kann, muss die Zelle sich teilen, da nur so die Zellkernschranke überwunden werden kann. Folglich ist es für eine hohe Transfektionseffizienz unerlässlich, dass die Zellen genug Platz und optimale Bedingungen zur Ausbreitung haben. Die jeweils verwendete Zellzahl nach Kulturplattengröße kann Tabelle 20 entnommen werden.

Tabelle 20: Aussaat nach Zelllinie und Kulturplattengröße

Kulturplatte	Zelldichte
6-Well-Platte	6x 10 ⁵ HEK293 Zellen/ Well
	10 x 10 ⁵ HepG2 Zellen/ Well
	6x 10 ⁵ COS-7 Zellen/ Well
8-Well-Kammerobjektträger	0,25 x 10 ⁵ HEK293 Zellen/ Well
	0,3 x 10 ⁵ HepG2 Zellen/ Well
	0,25 x 10 ⁵ COS-7 Zellen/ Well

2.3.3.2. Transfektion für Western Blot Analysen

Am Vortag in einer 6-Well-Platte ausplattierte Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 – 80% transfiziert. Die bei der Aussaat verwendeten Zellzahlen können Tabelle 21 entnommen werden. Die Transfektion wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Vorarbeiten zur Expressionsanalyse von wt-MMACHC und ΔEx2-MMACHC im Western Blot machten deutlich, dass die zehnfache Menge ΔEx2-MMACHC-DNA transfiziert werden muss, um annähernd die gleiche Bandenintensität wie das wt-MMACHC-Protein zu erlangen. Bei Versuchen, bei denen wt- und ΔEx2-MMACHC-Proteine auf einer Membran dargestellt werden, wurde die Menge der transfizierten wt-MMACHC-DNA auf ein Zehntel reduziert und die fehlende Menge mit leerem pcDNA3.1+ Vektor aufgefüllt. Bei Kotransfektion von wt-MMACHC und

Δ Ex2-MMACHC wurde die Gesamt-DNA zu einem Zehntel aus wt-MMACHC-DNA und zu neun Zehnteln aus Δ Ex2-MMACHC-DNA zusammengestellt.

Zu Beginn jeder Transfektion wurde ein Mikroreaktionsgefäß mit serumfreiem OptiMEM Medium und Lipofectamin™ 3000 vorbereitet. Des Weiteren wurde die zu transfizierende DNA und das P3000™ Reagenz in weitere Mikroreaktionsgefäße mit serumfreiem OptiMEM Medium pipettiert. Mit Zugabe des Lipofectamin-Mix in den DNA-Mix begann eine 15-minütige Inkubation bei RT, währenddessen ein Mediumwechsel der zu transfizierenden Zellen mit OptiMEM vorgenommen wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektions-Mix in kleinen Tröpfchen auf die Zellen pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken der Platte gleichmäßig über die Zellen verteilt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Spätestens sechs Stunden nach Transfektion erfolgte die Zugabe des jeweiligen Vollmediums, je nach Experiment mit supplementierten CN-Cbl, OH- Cbl oder Homocystein. Zelllysate wurden 24 h bis 48 h nach Transfektion gewonnen.

Tabelle 21: transiente Transfektion mit Lipofectamin 3000

Kulturplatte	DNA-Mix/ Well	Lipofectamin-Mix / Well	Mediumwechsel OptiMEM	Finales Volumen mit Nährmedium
6-Well-Platte	125 μ l OptiMEM 2,5 μ g DNA 5 μ l P3000	125 μ l OptiMEM 5 μ l Lipofectamin	750 μ l/ Well	2 ml
8-Well Kammer- objektträger	10 μ l OptiMEM 200 ng DNA 0,4 μ l P3000	10 μ l OptiMEM 0,4 μ l Lipofectamin	130 μ l/ Well	300 μ l

2.3.3.3. Transfektion Immunocytoologie und Proximity Ligation Assay

Immunozytologische Färbungen, sowie der Proximity Ligation Assay (PLA) wurden in 8-Well-Kammerobjektträgern aus Glas an COS-7- und HepG2-Zellen durchgeführt. 24 h nach dem Ausplattieren erfolgte die Transfektion bei etwa 60 %-iger Konfluenz.

Um den unterschiedlichen Expressionsniveaus des wt-MMACHC-Proteins und Δ Ex2-MMACHC-Proteins gerecht zu werden, wurden bei Kotransfektionen für die PLA folgende Verteilungen der Gesamtmenge (200 ng) an DNA vorgenommen:

- 100 ng Δ Ex2-MMACHC + 100 ng weiteres Konstrukt

- 10 ng wt-MMACHC + 90 ng leerer Vektor pcDNA3.1(+) + 100 ng weiteres Konstrukt

Eine Übersicht über die eingesetzten Konstrukte liefert Tabelle 22. Zwei Stunden nach der Transfektion wurden 150 µl Vollmedium auf das OptiMEM mit dem enthaltenden Transfektions-Mix gegeben. Am nächsten Morgen erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel mit frischem Vollmedium.

Tabelle 22: Konstrukte

Insert	Vektor	C-terminaler Tag	Hersteller
MMACHC-wt	pcDNA3.1(+)	flag	
MMACHC-wt	pcDNA3.1(+)	myc	
MMACHC-ΔEx2	pcDNA3.1(+)	flag	
MMACHC-ΔEx2	pcDNA3.1(+)	myc	
MTR	pcDNA3.1(+)/C-(K)DYK	flag	GenScript, Leiden, Niederlande
MTRR	pcDNA3.1(+)/C-(K)DYK	flag	GenScript, Leiden, Niederlande
MMADHC	pcDNA3.1(+)/C-(K)DYK	flag	GenScript, Leiden, Niederlande
ABCD4	pcDNA3.1(+)/C-(K)DYK	flag	GenScript, Leiden, Niederlande
LMBRD1	pcDNA3.1(+)/C-(K)DYK	flag	GenScript, Leiden, Niederlande

2.3.3.4. Reverse Transfektion von siRNA

Ziel der Transfektion von siRNA (*short interfering RNA*) ist es, die endogene Expression eines Proteins einer Zelle zu unterdrücken und so eine Gen-Stillegung (*gene silencing*) zu erreichen. Man macht sich dabei das Prinzip der RNA-Interferenz zunutze: Kurze, doppelsträngige RNA-Oligonukleotide (21 – 22 bp lang) werden komplementär zur endogen exprimierten mRNA des Zielproteins designed. Durch Lipofektion werden sie ins Zytoplasma geschleust, wo sie vom RISC-Komplex (*RISC = RNA induced silencing complex*) gebunden werden. Der RISC-Komplex spaltet den RNA-Doppelstrang auf. Binden nun komplementäre mRNA-Stränge an den RISC-Komplex, werden sie von diesem abgebaut. Folglich wird weniger Zielprotein translatiert und es kommt zu einem Knockdown der Genaktivität (Elbashir et al., 2001). Durch Kombination mehrerer siRNAs, die sich gegen unterschiedliche Abschnitte im Zielgen richten, kann die Effektivität des Knockdowns deutlich erhöht werden.

Bei der reversen Transfektion erfolgt die Zugabe von siRNA und Transfektionsreagenz in die leere Kulturplatte. Erst nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen auf die Kulturplatte gegeben, woraus der Name *reverse* Transfektion ableitbar ist. Die Antisense siRNA-Oligonukleotide wurden von Herrn Prof. Dr. Kömhoff designed und bei der Firma Dharmacon bestellt. Die Sequenzen können Tabelle 23 entnommen werden. Beide Antisense-Oligonukleotide richten sich gegen das 2. Exon im MMACHC-Gen, sodass die gleichzeitige Transfektion von Δ Ex2-MMACHC-DNA von der siRNA-Transfektion unbeeinflusst bleibt und so sichergestellt wurde, dass nur endogenes (wt-) MMACHC unterdrückt wird.

Experimente mit siRNA-Transfektionen wurden in HEK293-, sowie HepG2-Zellen durchgeführt. Jeweils 2,5 μ l Oligo MMACHC-1 und 2,5 μ l MMACHC-2 wurden in ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und mit 600 μ l OptiMEM verdünnt, worauf die Zugabe von 7,5 μ l Lipofectamin RNAiMAX folgte. Durch Schwenken der Platte wurde sichergestellt, dass das gesamte Well mit dem siRNA-OptiMEM-RNAiMAX-Gemisch bedeckt wurde. Da es sich um Arbeiten mit RNA handelte, wurden Filterpipetten verwendet und besondere hygienische Vorsichtsmaßnahmen eingehalten. Nach Ablauf einer 20-minütigen Inkubationszeit bei RT wurde die für Transfektionen übliche Zellzahl (siehe Tabelle 19) in die 6-Well-Platte ausplattiert. Das Zellnährmedium enthielt 10 % FBS. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet, um mögliche Interferenzen mit dem Transfektionsgemisch zu verhindern.

Tabelle 23: siRNA-Zielsequenzen und Kontrollen

siRNA	Sequenz	Hersteller
MMACHC-1	GGCAUGGUACAAUGAACUCUUGC	Dharmacon, Lafayette, USA
MMACHC-2	AGUGGACCAGUGUGUGGCCUACCAUC	Dharmacon, Lafayette, USA
Kontrollen	UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGUUUACAUGUUUUCUGA UGGUUUACAUGUUUCCUA	Dharmacon, Lafayette, USA (D-001810-10-05)

2.3.4. Cycloheximide Chase Experiment

Cycloheximid ist ein Translationshemmer, der in eukaryontischen Zellen die ribosomale Translokation hemmt (Obrig, Culp, McKeehan, & Hardesty, 1971). Durch Hemmung der Proteinbiosynthese kann die Degradation eines zytosolischen Proteins

im Laufe einer bestimmten Zeit sichtbar gemacht und so Rückschlüsse auf die Halbwertszeit (HWZ) eines Proteins gezogen werden.

Zur Untersuchung der Stabilität des Mutanten wurden HepG2-Zellen mit dem Δ Ex2-MMACHC-myc Konstrukt transfiziert und für 24 h im jeweiligen Nährmedium (MEM ohne Cbl-Zusatz, mit 10 μ M CN-Cbl, mit 10 μ M OH-Cbl) inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel mit frischem Nährmedium und den jeweiligen Cbl-Zusätzen plus dem Zusatz von 50 μ g/ml Cycloheximid. Die anschließende Lysatherstellung fand jeweils zum Zeitpunkt 0 h, 3 h, 6 h und 12 h nach Cycloheximidzugabe statt. Nach 6 h wurde das gesamte Medium einmal gewechselt und mit frischem Cycloheximidhaltigen Medium versehen.

2.3.5. Assays zur Prüfung der Zytotoxizität und Zellviabilität

Zytotoxische Effekte der Supplementation von Cbl und Homocystein wurden mittels MTT-Assay und Trypanblau Färbung untersucht.

2.3.5.1. MTT-Assay

Zur Prüfung einer möglichen zelltoxischen Wirkung der Cbl-haltigen Medien wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Der gelbliche Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) wird dabei von lebendigen eukaryotischen Zellen aufgenommen und durch deren mitochondriale Reduktase mithilfe von NADH und NADPH zu dem violetten Formazan reduziert. Mittels Spektrophotometer kann die Absorption des Formazans bei 570 nm ermittelt werden. Da tote Zellen MTT nicht in Formazan umwandeln können, steht die Menge des gebildeten Formazans direkt proportional in Beziehung zur Anzahl lebender Zellen (Berridge & Tan, 1993). Weil das MTT-Assay auf dem Nachweis einer enzymatischen Aktivität basiert, handelt es sich um einen Zellviabilitätsnachweis.

Das MTT Reagenz wurde im Verhältnis 1:10 mit dem Vollmedium der HEK293-(DMEM) und HepG2-Zellen (MEM) gemischt und jeweils 100 μ l auf jedes Well der 96-Well-Platte gegeben. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C erschienen lebendige Zellen als schwarze, griesförmige Kristalle auf dem Boden der Platte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 0,1 ml Isopropanol mit 0,4 molarem HCl auf jedes Well gegeben. Das Isopropanol sorgte dafür, dass das Formazan sich

aus den Zellen löste und sich in eine homogene blaue Lösung umwandelte. Die Salzsäure wandelte das Phenolrot des Nährmediums in eine gelbe Farbe um, die nicht mit der Messung interferierte.

2.3.5.2. Trypanblau Färbung

Zum Nachweis der möglichen zytotoxischen Wirkung von Homocystein im Nährmedium der Zellen wurde eine Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Dazu wurde 0,4 % Trypanblau in die Nährmedien der Zellen gegeben, welche zuvor mit folgenden Konzentrationen von Homocystein supplementiert worden waren: 50 μM , 100 μM , 200 μM . Der Farbstoff gelangt durch Diffusion in perforierte, tote Zellen und färbt Proteine im Zytoplasma dunkelblau an. Von Zellen mit intakter Zellmembran wird er nicht aufgenommen (Tennant, 1964). Durch Auszählen des Verhältnisses toter zu lebender Zellen unter dem Lichtmikroskop wurde ermittelt, wieviel Prozent der Zellen nach 24 h und 48 h noch lebten.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

Zur Proteinanalyse wurden die Proteine aus den gewonnenen Zelllysaten extrahiert und ihre Konzentration mittels BCA-Assay bestimmt, um sie nachfolgend per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Mittels Western Blot wurden die im Gel separierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend mit ihrem spezifischen Primärantikörper markiert und über den passenden Sekundärantikörper visualisiert.

2.4.1. Proteinextraktion

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellen auf Eis gesetzt, mit eiskaltem PBS gewaschen und für 4 Min. mit Lysepuffer (CHAPS oder Triton X-100, siehe Tabellen 24 und 25) inkubiert. Für eine 6-Well-Platte wurden 100 μl Lysepuffer pro Well verwendet. Zur Verhinderung einer Degradierung der Proteine durch freigesetzte Proteasen wurde dem Lysepuffer ein Proteinaseinhibitor (Verhältnis 1 : 50) hinzugefügt. Im Anschluss wurden die lysierten Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und für 45 Minuten bei

4°C auf einem Rotator drehend inkubiert. Um die gelösten Proteine vom restlichen Zelldebris zu trennen, wurden die Proben anschließend bei 4°C für 10 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Das gewonnene Lysat wurde entweder bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren oder die Proteinmenge direkt mittels BCA-Assay quantifiziert.

Tabelle 24: Triton X-100 Lysepuffer

Chemikalien	Menge
Tris HCl (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 %
EDTA (MW 292,24 g/mol)	5 mM
ddH ₂ O	auf 100%

Tabelle 25: CHAPS Lysepuffer, pH 7,4

Chemikalien	Menge
KCl	150 mM
HEPES	50 mM
CHAPS	0,1 %
ddH ₂ O	auf 100%

2.4.2. Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels BCA-Assay

Zur quantitativen Bestimmung der gewonnenen Proteinmenge wurde das *Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit* benutzt. Der Assay bedient sich einer kalorischen Methode, bei der Kupferionen in einem stark alkalischen Milieu an Peptidbindungen binden und daraufhin mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen Chelatkomplex bilden, der als blau-violette Farbe wahrnehmbar ist. Dieser Farbumschlag ist mittels ELISA messbar und weist ein maximales Absorptionsspektrum bei einer Wellenlänge von OD = 562 nm auf. Die Gesamtproteinmenge einer Probe wird nachfolgend anhand einer Standardkurve bekannter Proteinkonzentrationen errechnet.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte auf Eis in einer 96-Well-Platte. Zum Ausgleich von Pipettierungenauigkeiten wurden alle Proben in Doppelbestimmung ausgewertet. Die Herstellung der Standardreihe erfolgte aus einem Albuminstock als Verdünnungsreihe mit sieben Konzentrationsstufen zwischen 25 µg/ ml – 1 mg/ ml. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1 : 6 mit CHAPS-, bzw. Triton X-100 Puffer,

(entsprechend dem bei der Zellyse verwendeten Lysepuffer) verdünnt und jeweils 25 µl der Proben und der Standardreihe in die 96-Well-Platte pipettiert.

Es folgte die Zugabe von 200 µl des grünen BCA-Farbreagenz (BCA Reagenz A : B, 50 : 1) in jedes Well und die Abdeckung der Platte mit einer Folie, um einem Volumenverlust durch Verdunstung entgegenzuwirken. Zur Durchmischung wurde die Platte für 30 Sek. auf den Schüttler gestellt und anschließend im vorgeheizten Inkubator bei 37°C für 30 Min. zur Beschleunigung der Farbreaktion inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte für 5 Min. abgekühlt, die Folie entfernt und die Adsorption mittels *Infinity M200 Pro Photometer* bestimmt. Die Umrechnung der ermittelten Adsorptionskoeffizienten anhand der Standardkurve in die Proteinkonzentrationen übernahm das Programm *Magellan*.

2.4.3. Vorbereitung der Proben

Je nach Experiment wurden 5 – 20 µg Protein pro Probe geladen, das restliche Volumen wurde mit dem jeweils verwendeten Lysepuffer (CHAPS/ Triton-X-100) aufgefüllt. Zur Vergleichbarkeit der Proteinbanden wurden die Taschen innerhalb eines Gels mit der gleichen Proteinmenge befüllt. Zusätzlich wurde den Proben ein Ladepuffer zugesetzt. Hierbei kamen verschiedene Ladepuffer zum Einsatz, deren genaue Zusammensetzung Tabelle 26 entnommen werden kann. Es wurde unterschieden zwischen reduzierenden Ladepuffern, welche Reduktionsmittel wie DTT oder β-Mercaptoethanol enthalten und nicht reduzierenden Ladepuffern, die die gleiche Zusammensetzung aufweisen, jedoch auf die Reduktionsmittel verzichten. Nach Zugabe des Ladepuffers wurden die Proben für 10 Min. bei 95°C im Heizblock erhitzt.

Tabelle 26: Ladepuffer

Chemikalien	Nicht reduzierend	DTT	β-Mercaptoethanol
EDTA (MW 292.24 g/mol)	25 mM	25 mM	25 mM
Bromphenol Blau	0,25 mg/ml	0,25 mg/ml	0,25 mg/ml
SDS	10 %	10 %	10 %
Glycerol	50 %	50 %	50 %
Reduktionsmittel	-	500 mM DTT	10 % β-Mercaptoethanol
ddH ₂ O	Zu 100 %	Zu 100 %	Zu 100 %

2.4.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der im Proteingemisch enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (*SDS = sodium dodecyl sulfate*) denaturiert Proteine. Dies geschieht besonders effektiv nach vorausgehender Reduktion der Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol oder DTT. Das Anlagern der Sulfatgruppe aus dem SDS an die Proteine sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung, sodass die Proteine sich gegenseitig abstoßen und im elektrischen Feld vom Minus-Pol (Kathode) zum Plus-Pol (Anode) wandern. Das diskontinuierliche Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 150 – 200 Volt konzentrieren sich die einzelnen Probenladungen zunächst im Sammelgel und wandern dann im Trenngel durch die porigen Polyacrylamidmaschen. Je kleiner die Proteine, desto geringer der Widerstand und desto schneller kommen sie voran, während großen Proteinen der Weg durch die Poren erschwert wird. Die Laufgeschwindigkeit ist somit abhängig vom Molekulargewicht der Proteine. Durch Variationen des Acrylamidgehalts im Gel kann die Porengröße variiert und an das Molekulargewicht des Proteins von Interesse angepasst werden. Zur visuellen Kontrolle der Laufgeschwindigkeit wird den Proben ein niedermolekularer, anionischer Farbstoff, das Bromphenolblau, zugesetzt. Fertige Gele (Zubereitung siehe Abschnitt 2.4.4.1.) wurden in die Gelelektrophorese-Apparatur eingeklemmt, die Dichtigkeit der Apparatur überprüft und der Laufpuffer (siehe Tabelle 7) hinzugegeben. Nach Entfernen des Kamms konnten die Taschen mit den Proben sowie einem Referenzmarker (*Page Ruler Prestained Protein Ladder* oder *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*) befüllt werden. Nach zehnminütigem Einlaufen der Proben in das Sammelgel bei 100 V und 25 mA wurde die Spannung auf 200 V bei 25 mA erhöht. Mit Heraustreten des blauen Farbstoffs wurde die Elektrophorese beendet.

2.4.4.1. Polyacrylamidgele und Tris-Glycin-eXtended (TGX) Gele

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit Ethanol wurden die Platten in die Gießapparatur geklemmt, die Dichtigkeit mit Wasser überprüft und zunächst das

Trenngel vorbereitet. Mit Zugabe des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethyldiamid (TEMED) und des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) wurde das sofortige Gießen des Gels erforderlich. Auf das frisch gegossene Trenngel wurde 1 ml Isopropanol pipettiert, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erzeugen. Nach Aushärtung des Trenngels und Abgießen des Isopropanols wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm mit 10 – 15 Taschen in das noch flüssige Gel platziert.

Für die selbstgegossenen Polyacrylamidgele wurden 10 % Acrylamid verwendet, um eine optimale Auftrennung im Bereich 20 – 70 kDa zu erreichen. Eine Auflistung der verwendeten Substanzen und Volumina kann der Tabelle 27 entnommen werden. TGX-Stainfree Gele wurden entsprechend den Herstellerangaben gegossen (*TGX Fast Cast Acrylamid Kit, 10 %*). Ein Vorteil der TGX-Stainfree Gele besteht darin, dass das Stainfree-Reagenz mit den Tryptophanresten der geladenen Proteine reagiert, wodurch diese unter UV-Licht starke Fluoreszenzsignale aussenden und so mittels *ChemiDoc MP Imager* sichtbar gemacht werden können. Dies ermöglicht eine genaue Überprüfung des Proteintransfers vor und nach dem Blotten ohne weitere Färbungen (Posch, Kohn, Oh, Hammond, & Liu, 2013). Hierzu wurden die TGX-Stainfree Gele direkt nach der Gelelektrophorese durch eine 45-sekündige UV-Strahlung aktiviert.

Tabelle 27: Zubereitung der Polyacrylamidgele

Chemikalien	Trenngel	Sammelgel
NF-Acrylamid/Bis Lösung 30% (Rotiphorese)	2,3 ml	600µl
Tris-SDS, pH 6,8	-	2 ml
Tris-SDS, pH 8,8	3,4 ml	-
H ₂ O	1,2 ml	1,6 ml
TEMED	10 µl	6 µl
APS	40 µl	20 µl

2.4.5. Western Blot

Durch das Blotten werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran (*Amersham™ Protran™ 0,45 µm Nitrocellulose Membran*) übertragen. Zum Blotten wurde der *Trans-Blot Turbo Blotter* verwendet. Die Membranen und Filterpapiere wurden für mindestens 10 Min. vor dem Blotten in *Trans-Blot Turbo Transferpuffer* bei RT inkubiert. Das Gel wurde auf die Membran platziert, von beiden

Seiten mit Filterpapier umschlossen und für 3 Min. bei 25 V und 2,5 A geblottet (TGX-Stainfree Gele), bzw. für 7 Min. bei 25 V und 1,3 A (alle anderen Gele). Der Erfolg des Blottens wurde durch Ponceau S Färbung, bzw. bei TGX-Stainfree Gelen durch entsprechende Aufnahmen mittels Imager, überprüft. So wurde die Gesamtheit der übertragenen Proteine auf der Membran sichtbar gemacht, die nachfolgend als Ladekontrolle zur Normalisierung gewonnener Bandenintensitäten genutzt wurde.

2.4.6. Immunodetektion

Zur Identifikation der auf der Membran gebundenen Proteine wurden spezifische Antikörper verwendet. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen geblockt, indem die Membran für 45 Min. mit 5 %-igen Milchpulver (in PBST gelöst) schüttelnd bei RT inkubiert wurde. Die Herstellung von PBST erfolgte durch Zugabe von 1 ml Tween in 1x PBS. Ebenfalls in Blocklösung gelöste Primärantikörper wurden auf die Membranen gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem *Multi-Axel-Rotations Mixer* drehend inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen 5x für jeweils 5 Min. mit PBST gewaschen und für eine Stunde bei RT mit dem Sekundärantikörper schüttelnd inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden sowohl HRP (horseradish peroxidase)-markierte Antikörper als auch Fluoreszenzantikörper verwendet. Bei HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte zur Auslösung der Chemolumineszenzreaktion eine dreiminütige Inkubation unter Lichtausschluss mit 500 µl *Clarity™ Western ECL Substrate*. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper und die jeweiligen Verdünnungen geben Tabellen 28 und 29. Abschließend wurden die Membranen 5 x für 5 Min. mit PBST gewaschen und im *ChemiDoc MP Imager* entwickelt.

Tabelle 28: Primärantikörper Western Blot

Primärantikörper	Spezie	Verdünnung	Hersteller
α- Flag	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich, Steinheim (F3165)
α- Flag	Kaninchen	1.1000	Sigma-Aldrich, Steinheim (F7425)
α- MMACHC	Maus	1:200	Neuro Mab, Davis, USA (75-239)
α- MMADHC	Kaninchen	1:500	Sigma-Aldrich, Steinheim (SAB2105970)
α- Myc	Maus	1:500	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (MA1-21316)
α- Myc	Kaninchen	1:500	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (PA5-85185)

Tabelle 29: Sekundärantikörper Western Blot

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α- mouse IgG Peroxidase conjugated	Ziege	1:1000	Sigma-Aldrich, Steinheim (A4416)
α- mouse IgG StarBright Blue 700	Ziege	1:5000	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, USA (12004158)
α- rabbit IgG StarBright Blue 520	Ziege	1:2000	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, USA (12005869)
α- rabbit IgG HRP conjugated	Ziege	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA (SC-2004)

2.5. Immunzytologie

Immunzytologische Fluoreszenzuntersuchungen erfolgten zur Visualisierung intrazellulärer Kompartimente (Lysosom, Mitochondrium, Proteasom und Peroxisom) sowie des wt-MMACHC-Proteins und des ΔEx2-MMACHC-Proteins, um Rückschlüsse auf deren intrazelluläre Lokalisation ziehen zu können. Des Weiteren wurden Voruntersuchungen für den PLA durchgeführt, um einzusetzende Antikörperkonzentrationen zu eruieren.

COS-7- und HepG2-Zellen wurden in 8-Well-Kammerobjektträger ausplattiert und wie im Abschnitt 2.3.3.3. beschrieben transfiziert. Nach Fixation, Blocken und Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tabelle 30) erfolgte die Visualisierung mittels fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (siehe Tabelle 31) im Zeiss Axio Apotom Mikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung in Ölsuspension.

Mikroskopierte Bilder wurden mit dem *ZEISS AxioVision Imaging System* aufgenommen und bearbeitet.

2.5.1. Kolokalisationsstudien

Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation wurden in COS-7-Zellen durchgeführt. 24 h nach Transfektion mit wt-/ΔEx2-MMACHC-DNA wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und zur Fixation mit 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 Min. bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBS und eine fünfminütige Inkubation mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl), um Hintergrundstörungen durch freie Aldehydgruppen des PFA zu reduzieren. Nach weiteren drei Waschschrten mit PBS wurden die Zellen für 4 Min. mit Triton X-100 permeabilisiert, 3x mit PBS gewaschen und für 30 Min. mit 150 µl *DAKO* Blockpuffer bei RT inkubiert. In 100 µl *DAKO* Blockpuffer gelöste Primärantikörper, bzw. gekoppelte Antikörper (siehe Tabelle 29 und 30) wurden als nächstes für 2 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgten 3 Waschschrte mit PBS und die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (siehe Tabelle 30, Verdünnung 1:1000, in *DAKO* gelöst) für eine weitere Stunde bei RT unter Ausschluss von Licht. Nach abschließenden 3 Waschschrten mit PBS wurden die Kammern plus das verschließende Gummi der Kammerobjektträger vorsichtig abgelöst und die auf dem Objektträger verbliebenen Zellen mit *Vectashild Antifade Mounting Media* eingedeckt. Das Eindeckmedium enthielt den Nukleusfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI).

2.5.2. Proximity Ligation Assay

Mithilfe des PLA gelingt die *in situ* Visualisierung zweier Proteine, die sich in enger räumlicher Nähe zueinander befinden (< 40 nm). Aufgrund der erforderlichen starken räumlichen Nähe wird das PLA als Hinweis auf Protein- Protein-Interaktionen genutzt, auch wenn die Methode strenggenommen keine direkten Interaktionen nachzuweisen vermag. Das PLA zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität aus. Im Vergleich zu Koimmunopräzipitation sind dabei auch schwächere Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachweisbar (Gustafsdottir et al., 2005).

Die Durchführung des PLA erfolgte nach Herstellerangaben (*Duolink® PLA In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit*). COS-7-Zellen, bzw. HepG2-Zellen wurden auf einem 8-Well-Kammerobjektträger ausplattiert, nach 24 h mit wt-MMACHC-myc/ Ex2-MMACHC-myc und deren Interaktionspartnern ABCD4, LMBRD1, MMADHC, MTR, MTRR kotransfiziert und 48 h nach Transfektion nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 4 %-igem PFA für 20 Min. bei RT fixiert.

Die im Folgenden angegebenen Schritte wurden alle durch dreimaliges Waschen mit PBS gefolgt: Permeabilisation mit 0,1 %-igem Triton X-100 und Inkubation für eine Stunde mit *Duolink Blocking Solution* bei 37°C, gefolgt von einer zweistündigen Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern bei RT: Für die MMACHC-Proteine wurde Anti-Myc (Maus) verwendet, die Markierung der Interaktionspartner erfolgte durch die jeweiligen Antikörper: Anti-ABCD4, Anti-LMBRD1, Anti-MMADHC, Anti-MTR, Anti-MTRR (alle Kaninchen). Nach abgeschlossener Bindung der Primärantikörper sowie dreimaligem Waschen mit PBS zur Entfernung überschüssiger Antikörper, wurden 40 µl/ Well des Duolink-PLA-Sonden-Mixes auf die fixierten Zellen gegeben (8 µl PLUS Sonde, 8 µl MINUS Sonde, 24 µl Diluent) und diese 1 h bei 37°C inkubiert.

Bei den DNA-Sonden handelt es sich um Sekundärantikörper gegen Maus (PLUS) und Kaninchen (MINUS), welche an die jeweiligen Primärantikörper binden. Beide Sonden enthalten einen kurzen DNA-Strang. Befinden sich die an ihre Primärantikörper gebundenen PLUS- und MINUS-Sonden in einer räumlichen Nähe von unter 40 nm zueinander, so kann in einem nächsten Schritt die im Kit enthaltene Ligase die DNA-Stränge beider Sonden miteinander verbinden. Mithilfe einer Polymerase kann nachfolgend eine Rolling-Circle-DNA-Synthese initiiert werden, welche für eine hohe Amplifikation des Signals sorgt.

Für die Ligation wurden nach Entfernen der PLA Sonden und 2x 5-minütigem Waschen der Wells mit dem mitgelieferten Waschpuffer A, 39 µl Ligasepuffer mit 1 µl Ligase/ Well auf die Zellen gegeben und diese bei 37°C für 30 Min. inkubiert. Nach Entfernen des Ligasepuffers folgten zwei weitere 5-minütige Waschschrte mit Waschpuffer A. Die Amplifikation wurde durch die Zugabe von 39,5 µl Amplifikationspuffer und 0,5 µl Polymerase/ Well gestartet und für 100 Min. lichtgeschützt bei 37°C weitergeführt. Die im Kit enthaltene Polymerase translatiert

und amplifiziert das durch die Ligation entstandene Signal. Abschließend folgten Waschschrte mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer B und das Eindecken mithilfe des *Duolink Mounting Media*, welches den Nukleusmarker DAPI enthält. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20°C. Bildaufnahmen erfolgte innerhalb von 2 Tagen nach Durchführung des PLA.

Erzeugte Fluoreszenzsignale wurden durch das *Zeiss Axio Apotom* Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung unter Ölsuspension detektiert. Die Auswertung und Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm *AxioVision Rel. 4.8.* und dem frei verfügbaren Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* (1.52a) (Rasband, 1997-2018).

Tabelle 30: Primärantikörper Immunozytologie/ PLA

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α- ABCD4	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK (ab135480)
α- Flag	Kaninchen	1:200	Sigma-Aldrich, Steinheim (F3165)
α- LMBRD1	Kaninchen	1:50	Abcam, Cambridge, UK (ab105419)
α- MMACHC	Maus	1:100	Neuro Mab, Davis, USA (75-239)
α- MMADHC (α- C2ORF25)	Kaninchen	1:100	Sigma-Aldrich, Steinheim (SAB2105970)
α- MTR	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK (ab66039)
α- MTRR	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK (ab129159)
α- Myc	Maus	1:400	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (MA1-21316)
α- PSMA5	Kaninchen	1:50	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (PA5-17295)

Tabelle 31: gekoppelte Antikörper und Sekundärantikörper Immunozytologie

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
MitoTracker™ Red CMXRos	Kaninchen	1:1000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (M7512)
α- M6PR, Alexa Fluor 555	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, UK (ab203438)
α- mouse IgG H&L Alexa 488	Ziege	1:1000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
α- PMP70, Alexa Fluor 555	Kaninchen	1:200	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (PA1-650-A555)
α- rabbit IgG H&L Alexa 555	Ziege	1:1000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

2.6. Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen und die grafische Aufbereitung erfolgten mit dem Programm *IBM SPSS Statistics (Version 26)*, *GraphPad Prism (9.4.1)* und *Microsoft Excel (16.16.25)*. Für die deskriptive Datenauswertung der Literaturrecherche wurden die absoluten und prozentualen Häufigkeiten sowie Mittelwert und Standardabweichung berichtet.

Zur quantitativen Auswertung von Ergebnissen aus dem Western Blot erfolgte zunächst die Normalisierung der gewonnenen Bandenintensitäten an der total geladenen Proteinmenge. Der Referenzbande (Medium ohne Zusatz) wurde der Wert 100 % zugewiesen und die übrigen Banden wurden an ihr normiert. Anschließend erfolgte die Signifikanztestung mittels t-Test oder einer zweifaktoriellen Varianzanalyse bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Mittels Bonferroni-Korrektur wurde für eine α -Fehlerkumulation korrigiert. Gerichtete Hypothesen wurden einseitig getestet. Zum paarweisen Vergleich wurden im Anschluss an die Varianzanalyse post-hoc Tests vorgenommen. Alle Experimente wurden mindestens in dreifacher Ausführung durchgeführt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Literaturrecherche sowie der laborexperimentellen Untersuchungen vorgestellt.

3.1. Literaturrecherche

Eine systematische Literaturrecherche in der biomedizinischen Datenbank Pubmed mit den Stichwörtern „*MMACHC*“, „*CbIC*“, „*methylmalonic aciduria homocystinuria*“ kombiniert mit den Wörtern „*TMA*“, „*HUS*“, „*PAH*“ und „*PVOD*“ sowie das Suchen nach weiteren Fällen in den Quellenverweisen der jeweiligen Paper, lieferte 49 Paper mit Fallbeschreibungen von insgesamt 84 Patienten mit einer genetisch nachgewiesenen *CbIC* und dem Phänotyp eines aHUS, bzw. einer renalen TMA (rTMA) und/oder einer PAH, bzw. der histologisch gesicherten Diagnose einer pulmonal veno-okklusiven Erkrankung (PVOD).

Das Erstdiagnosealter der 84 Patienten reichte von 12 Tagen bis 45 Jahren mit einem Median bei 4 Jahren und einem mittleren Alter von 7,4 ($\pm 8,7$) Jahren.

Insgesamt wiesen 61,9 % ($n = 52 / 84$) der Patienten eine Δ Ex2-Spleißmutation auf mindestens einem Allel auf. Als Δ Ex2-Spleißmutation wurden dabei folgende fünf Mutationen gewertet: *c.80A>G*, *c.82-9_12delTTCT*, *c.82-7_82-5delGTT*, *c.276G>T*, *c.276G>A*.

Die Mutation *c.80A>G* trat fast ausschließlich bei chinesischen, bzw. einem japanischen, Patienten auf. Die übrigen vier Δ Ex2-Spleißmutationen wurden in westlichen Bevölkerungsgruppen sowie die Mutation *c.276G>A* in homozygoter Ausprägung zusätzlich bei einem nordafrikanischen Kind berichtet (Martínez de Compañón et al., 2018).

In der Gruppe der Δ Ex2-Spleißmutationsträger befanden sich 52 Patienten ($n = 27$ Jungen, $n = 24$ Mädchen, $n = 1$ ohne Angabe) im Alter von 3 Monaten bis 25 Jahren mit einem mittleren Alter von 6,9 ($\pm 5,4$) Jahren.

In der Gruppe der CbIC-Patienten mit rTMA oder PAH ohne Δ Ex2-Spleißmutationen befanden sich 32 Patienten (n = 18 Jungen und n = 13 Mädchen, n = 1 ohne Angabe) im Alter von 12 Tagen bis 45 Jahren, mit einem mittleren Alter von 8,1 (\pm 12,5) Jahren. Das Auftreten eines kombinierten Phänotyps aus rTMA und PVOD wurde bei 14,3 % (n = 17/ 84) der ausgewerteten CbIC-Patienten berichtet.

Dies war zu 76,5 % (n = 13 / 17) mit einer Δ Ex2-Spleißmutation assoziiert. Bei vier Patienten mit kombinierten reno-pulmonalen Phänotyp (23,5 %, n = 4/ 17) wurde eine Mutation in einem anderen Bereich des MMACHC-Gens berichtet (*hom c.484G>T*, *hom c.464G>A*, *hom 565C>A* und *c.271-272dupA/c.347T>C*).

Bei weiteren 21 chinesischen Patienten mit der Mutation *c.80A>G* auf mindestens einem Allel wurden neben einer PH/PAH renale Komplikationen (Hämaturie, Proteinurie, CKD) berichtet. Hämatologische Parameter konnten der Studie nicht entnommen werden, wodurch die Diagnose eines rTMA nicht explizit gestellt werden konnte (vgl. Liu et al., 2017). Demgegenüber steht ein indischer Patient aus der Gruppe der CbIC-Patienten ohne Δ Ex2-Spleißmutationen mit PAH und renalen Auffälligkeiten (Proteinurie, Hämaturie), Genotyp: *c.271dupA*, *c.347T>C* (Gupta et al., 2021)). Rechnet man die Patienten mit PH/PAH plus renalen Auffälligkeiten den kombinierten Erkrankungsformen zu, so trat der kombinierte Phänotyp zu 87,2 % (n = 34/ 39) in der Gruppe der Δ Ex2-Spleißmutationsträger auf. Gleichzeitig waren 65,4 % (n = 34/ 52) der Δ Ex2-Spleißmutationsträger von einem kombinierten reno-pulmonalen Phänotyp betroffen.

Von den Δ Ex2-Spleißmutationsträgern wiesen 69,2 % (n = 36/ 52) eine PH/PAH auf, in zwei Fällen war diese nicht von einer rTMA begleitet. In der Gruppe der CbIC-Patienten ohne Spleißmutationen wurde eine isolierte PAH in zwei Fällen beobachtet. Insgesamt wurden sechs Patienten mit einer PAH identifiziert, die keine Δ Ex2-Spleißmutation trugen.

Ein isolierte rTMA/aHUS lag bei 30,8 % (n = 16/ 52) der CbIC-Patienten mit einer Δ Ex2-Spleißmutation vor sowie bei 78,1 % (n = 25/ 32) der CbIC-Patienten ohne Δ Ex2-Spleißmutation.

Tabelle 32 gibt eine Übersicht über die absoluten Häufigkeiten einer isolierten rTMA/aHUS, einer isolierten PAH/PVOD oder eines kombinierten Phänotyps bei

Patienten mit einer Δ Ex2-Spleißmutation auf mindestens einem Allel. Tabelle 33 gibt dies für CbIC-Patienten ohne Spleißmutationen wieder.

Eine Übersichtstabelle über alle in die Auswertung aufgenommenen Patienten, deren demografischen Daten, sowie Literaturangaben ist im Anhang 2 abgebildet.

Tabelle 32: Übersicht der absoluten Häufigkeiten des Auftretens eines isolierten aHUS/ rTMA, einer isolierten PAH/ PVOD oder eines kombinierten Phänotyps bei Patienten mit Δ Ex2-Spleißmutation

Allel 1	Allel 2	Erkrankung			
		aHUS/ rTMA	PAH/ PVOD	kombiniert	PAH + renale Komplikationen*
c.80A>G	c.1A>G	1	-	-	-
	c.331C>T	-	-	-	1
	c.331G>T	-	-	-	1
	c.394C>T	-	-	-	1
	c.440G>A	-	-	-	1
	c.609G>A	7	2	2	14
	c.656_658del	-	-	-	2
	c.658_660del	2	-	-	1
	c.82-7_82-5del	c.82-7_82-5del	-	-	1
c.82-9_82-12del	c.271dupA	5	-	2	-
c.276G>A	c.14_24del	-	-	1	-
	c.271dupA	1	-	-	-
	c.276G>A	-	-	1	-
c.276G>T	c.271dupA	-	-	3	-
	c.442_444delinsA	-	-	2	-
	c.276G>T	-	-	1	-
Gesamt		16	2	13	21

* Liu et al. (2017a + b), Liu et al., (2020), Liu et al. (2022), Liu et al. (2023), Chen et al. (2018), Yoshizawa et al. (2019) und Wen et al. (2020) berichten nicht von einem aHUS/ rTMA, sondern einer Hämaturie/Proteinurie, z.T. mit chronischem Nierenversagen. Zhao et a. (2021) berichtet über eine IgA Nephropathie und PH.

Tabelle 33: Übersicht der absoluten Häufigkeiten des Auftretens eines isolierten aHUS/ rTMA, einer isolierten PAH/ PVOD oder eines kombinierten Phänotyps bei Patienten ohne Δ Ex2-Spleißmutation

Allel 1	Allel 2	Erkrankung			
		aHUS/ rTMA	PAH/ PVOD	kombiniert	PAH + renale Komplikationen*
c.217C>T	c.609G>A	1	-	-	-
c.271dupA	c.271dupA	8	-	-	-
	c.347T>C	-	-	1	1
	c.388T>C	1	-	-	-
	c.389A>G	3	1	-	-
	c.556G>A	1	-	-	-
	c.565C>A	2	-	-	-
	c.666C>A	1	-	-	-
c.220delA	c.395_397del	1	-	-	-
c.328_331del	c.328_331del	1	-	-	-
c.365A>T	c.609G>A	1	-	-	-
c.365A>G	c.457C>T	1	-	-	-
c.464G>A	c.464G>A	-	-	1	-
c.481C>T	c.481C>T	1	-	-	-
	c.457C>T	1	-	-	-
c.484G>T	c.484G>T	1	1	1	-
c.565C>A	c.565C>A	1	-	1	-
Gesamt		25	2	4	1

* Gupta et al. (2021) berichten über eine PAH und Hämaturie, Proteinurie.

Im Falle eines Therapiebeginns wurde über beide Gruppen hinweg in 81,8 % der Fälle parenterales OH-Cbl verabreicht (n = 63/ 77), in sieben Fällen wurde CN-Cbl verabreicht (5x i.m., 1x p.o., 1x ohne Angabe). In allen sieben Fällen kam es zu einer Symptomverbesserung.

Eine Behandlung der CblC erfolgte in der Gruppe der Spleißmutationsträger bei 48 von 52 Patienten. Alle vier Patienten, die keine Behandlung erfuhren, verstarben. Die Diagnose einer CblC wurde bei ihnen post mortem gestellt. Zwei weitere Patienten verstarben trotz i.m. Verabreichung von OH-Cbl. Sechs Patienten wurden mit CN-Cbl therapiert, ein Patient mit oralem CN-Cbl.

In der Gruppe von Patienten ohne Spleißmutationen verstarben sieben: drei ohne vorherige Therapie, vier nach vorausgegangener Behandlung mit i.m. OH-Cbl. Zwei Patienten wurden zur Akuttherapie mit i.v. OH-Cbl behandelt, 21 weitere mit i.m. OH-Cbl und einer Patientin wurde CN-Cbl i.m. verabreicht. Bei 25 Patienten kam es daraufhin zur Stabilisierung der Symptomatik bishin zur kompletten Remission.

Zusätzlich wurde bei fast allen Patienten, unabhängig von der Art der Mutation, Folsäure, Carnitin und Betain verabreicht, zum Teil ergänzt durch Vitamin B₆. Eine tabellarische Übersicht der Behandlung und des Outcomes gibt Tabelle 34.

Tabelle 34: Übersicht der durchgeführten Cobalamin-Behandlung und des erreichten Outcomes bei Patienten mit und ohne Δ Ex2-Spleißmutation

Behandlung	Δ Ex2-Spleißmutation		Keine Spleißmutation	
	Verbesserung	verstorben	Verbesserung	verstorben
keine	-	4	-	3
OH-Cbl i.m.	25	2	21	4
OH-Cbl i.v.	-	-	2	-
OH-Cbl s.c.	5*	-	-	-
OH-Cbl parenteral	4	-	-	-
OH-Cbl (k.A.)	3	-	-	-
CN-Cbl i.m.	4	-	1	-
CN-Cbl oral	1	-	-	-
CN-Cbl (k.A.)	1	-	-	-
VitB ₁₂ i.m. **	3	-	1	-
gesamt	46	6	25	7

* Bei drei der Patienten zunächst i.m.-Gaben des OH-Cbl, nach Stabilisierung s.c.-Gabe

** Autoren beschreiben i.m. Gabe von Vitamin B₁₂ ohne genaue Angabe des Cbls-Derivats

Legende: i.m. = intramuskulär, i.v. = intravenös, s.c. = subkutan, k.A. = keine Angabe über die Darreichungsform.

3.2. Einbringen eines Flag- und Myc-Tags mittels gezielter Mutagenese

Um endogenes MMACHC von transfizierten MMACHC unterscheiden zu können sowie zur gemeinsamen Expression von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen mit unterschiedlichen Tags, wurden die Konstrukte wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC mittels gezielter Mutagenese jeweils mit einem Flag-Tag, bzw. einem Myc-Tag am N-Terminus versehen. Folgende vier Konstrukte entstanden: wt-MMACHC-flag, wt-MMACHC-myc, Δ Ex2-MMACHC-flag, Δ Ex2-MMACHC-myc.

Durch erneute Subklonierung der Inserts in den Vektor pcDNA3.1(+) wurde sichergestellt, dass die Expressionsvektoren frei von etwaigen Amplifikationsfehlern sind.

Abbildung 7 A zeigt die Ergebnisse der gezielten Mutagenese mit dem deutlich erkennbaren Shift zwischen wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC von etwa 200 bp, welcher der erwarteten Größe des 2. Exons des MMACHC-Gens von 195 bp entspricht.

3.3. Expression von wt- und Δ Ex2-MMACHC in HEK293- und HepG2-Zellen

Die erfolgreiche Expression der wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC-Proteine und deren Detektion im Western Blot anhand ihrer Tags ist in Abbildung 6 unter B, C und D dargestellt. Das wt-MMACHC-Protein ließ sich konstant auf einer Bandenhöhe entsprechend eines Molekulargewichts von 37 kDa detektieren. Das um 65 Aminosäuren verkürzte Δ Ex2-MMACHC-Protein wies erwartungskonform einen Shift von ca. 7 kDa auf und ist folglich bei 30 kDa detektierbar.

Abbildung 6 D zeigt die mittels Western Blot gewonnenen Bandenintensitäten der wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteine in Abhängigkeit der transfizierten DNA-Menge in HEK293-Zellen. Um ein vergleichbares Expressionsniveau von wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen zu erzeugen, musste bei gleicher Konzentration der Primär- und Sekundärantikörper im Vergleich zur wt-MMACHC-DNA mindestens das Zehnfache an Δ Ex2-MMACHC-DNA transfiziert werden. Abbildung 6 D zeigt dies exemplarisch in HEK293-Zellen. Vergleichbare Ergebnisse konnten in HepG2- sowie in COS-7-Zellen erzielt werden (Daten nicht dargestellt).

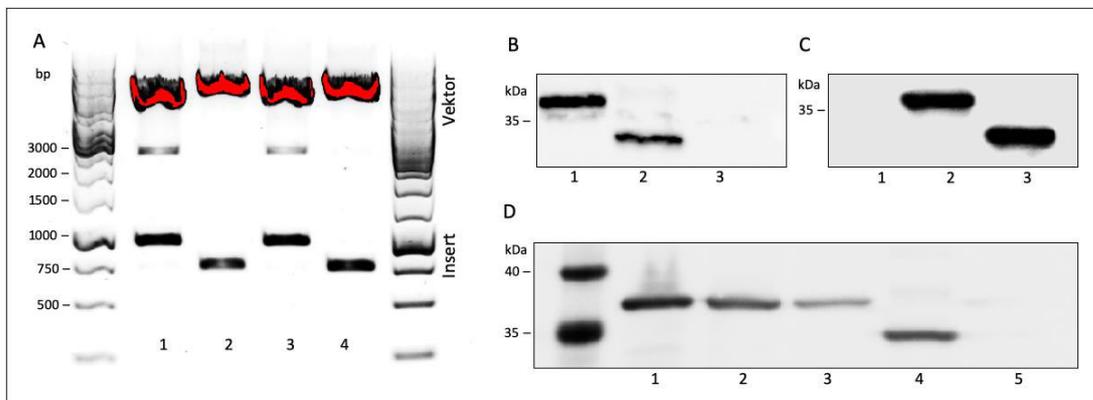


Abbildung 6: Einbringen eines Flag- und Myc-Tags. **A** Insert Release nach Einbringen eines Flag-, bzw. Myc-Tags in die Konstrukte wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC und Subklonierung in den Vektor pcDNA3.1+. In Rot eingefärbt ist der Vektor pcDNA3.1+. Legende: 1 = wt-MMACHC-flag, 2 = Δ Ex2-MMACHC-flag, 3 = wt-MMACHC-myc, 4 = Δ Ex2-MMACHC-myc, bp = Basenpaare. 1%-iges Agarose-Gel, Ladevolumen Proben: 15 μ L, Marker peqGOLD 1 kb Ladder Orange G: 5 μ L. **B** Western Blot: Nachweis des Flag-Tags, Anti-Flag (1:500, Kaninchen). 1 = wt-MMACHC-flag, 2 = Δ Ex2-MMACHC-flag, 3 = Kontrolle, untransfiziertes HEK293-Zelllysat **C** Western Blot: Nachweis des Myc-Tags, Anti-Myc (1:500, Kaninchen), 1 = Kontrolle, untransfiziertes HEK293-Zelllysat, 2 = wt-MMACHC-myc, 3 = Δ Ex2-MMACHC-myc. **D** DNA-Mengenexperiment, Western Blot, Anti-Myc (1:500, Kaninchen). 1 - 3 wt-MMACHC-myc, 4 = Δ Ex2-MMACHC-myc, 5 = HEK293-Zelllysat. Transfizierte DNA-Mengen: 1 = 250 ng, 2 = 100 ng, 3 = 50 ng, 4 = 2500 ng, 5 = keine.

3.4. Knockdown des endogenen MMACHCs

Mittels zweier siRNA-Antisense-Oligonukleotide, die sich beide gegen das 2. Exon des MMACHC-Gens richteten, gelang ein Knockdown des endogenen MMACHC-Proteins. Bei einer Transfektion von 150 pmol siRNA konnte die im Western Blot detektierbare Proteinmenge um über 80 % gegenüber der Ausgangsmenge reduziert werden. Abbildung 7 veranschaulicht dies in HepG2-Zellen. In Abbildung 7 A sind die Bandenintensitäten des endogenen MMACHC-Proteins in Abhängigkeit von der transfizierten Menge an siRNA abgebildet. Zum Ausgleich etwaiger Ladungsungenauigkeiten wurden die densitometrisch gewonnenen Intensitäten an der gesamten Proteinmenge (visualisiert über Ponceau S Färbung, Abb. 7 B) normalisiert. Die grafische Darstellung der gewonnenen Werte kann der Abbildung 7 C entnommen werden. Der orangene Pfeil verdeutlicht die sinkende Bandenintensität des endogenen MMACHC-Proteins unter Erhöhung der transfizierten siRNA-Menge.

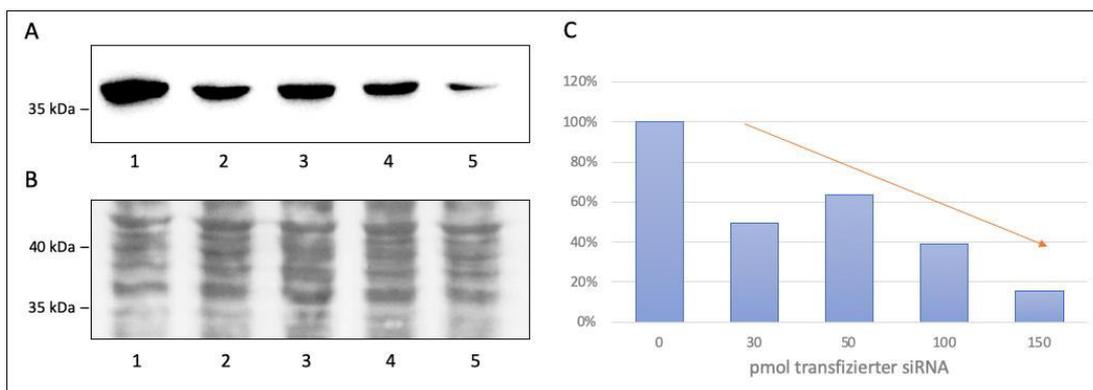


Abbildung 7: Knockdown des endogenen MMACHCs in HepG2-Zellen in Abhängigkeit der Menge transfizierter siRNA. **A** Western Blot, Anti-MMACHC (1:200, Maus). Endogene Expression von MMACHC: 1 = siRNA-Kontrolle, nicht gegen MMACHC gerichtet, 2 = 30 pmol, 3 = 50 pmol, 4 = 100 pmol, 5 = 150 pmol. **B** Ausschnitt der mit Ponceau S gefärbten Membran zur Darstellung der gesamten geladenen Proteinmenge. **C** Grafische Darstellung der normalisierten Daten. Die x-Achse zeigt die Gesamtmenge transfizierter siRNA (zwei RNA Oligonukleotide (21 bp, 26 bp) gerichtet gegen das 2. Exon des MMACHC-Gens). Die pmol Angaben beziehen sich auf die Gesamtmenge transfizierter siRNA, welche zu gleichen Teilen auf beide Oligonukleotide verteilt wurde. Die y-Achse gibt die Bandenintensität der MMACHC-Banden in Prozentwerten zum Ausgangswert von 100 % (Transfektion siRNA-Kontrolle) an. Der orangene Pfeil verdeutlicht die zunehmende Genstilllegung des endogenen MMACHC-Proteins bei steigender siRNA-Transfektion.

3.5. Homo-/Heterodimere

Zur Untersuchung der Auswirkungen des Verlustes des 2. Exons im MMACHC-Protein auf die Fähigkeit zur Dimerisierung wurden zwei Methoden angewendet: Western Blot Analysen unter nicht reduzierenden Bedingungen sollten zeigen, ob eine Disulfidbrücken-vermittelte Dimer-, bzw. Multimerbildung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit sich selbst, dem wt-MMACHC-Protein oder dem Interaktionspartner MMADHC nachweisbar ist.

Ergänzend wurde auf immunzytologischer Ebene mittels PLA untersucht, ob wt-MMACHC- und Δ Ex2-MMACHC-Proteine miteinander Heterodimere, bzw. untereinander Homodimere bilden. Ein Nachweis erfolgte dabei unabhängig von der Art der Bindung.

3.5.1. Dimerbildung unter nicht reduzierenden Bedingungen

Zur Untersuchung der Dimer-/ Multimerbildung wurde das Δ Ex2-MMACHC-Protein in HEK293- sowie HepG2-Zellen überexprimiert und anschließend im Western Blot unter nicht reduzierenden Bedingungen detektiert.

Wie Abbildung 8 zu entnehmen ist, führte das Weglassen reduzierender Agenzien im Ladepuffer zu einer Dimerbande des Δ Ex2-MMACHC-Proteins bei ca. 60 kDa (Spalte 1, grüner Stern) sowie einer schwächeren Monomerbande bei ca. 30 kDa (roter Stern). Zudem konnte eine weitere Bande auf der Höhe von 100 kDa nachgewiesen werden. In Spalte 2 ist ein Aliquot desselben Zelllysats wie in Spalte 1 verwendet worden. Hier wurde dem Ladepuffer das reduzierende Agens β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Erwartungskonform zeigte sich eine starke Monomerbande, jedoch keine Dimerbande.

Durch den Einsatz eines direkt gegen das MMACHC-Protein gerichteten Primärantikörpers wurde auch das endogene (wt-) MMACHC-Protein schwach sichtbar (in Abb. 8 mit einem blauen Stern markiert). Ebenso wurde eine Bande bei ca. 80 kDa sichtbar, die als Dimer endogener MMACHC-Proteinen interpretiert wird (Abb. 8, Spalte 3, orangener Stern).

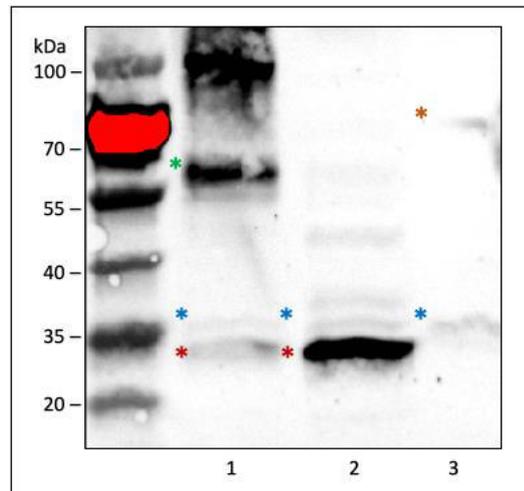


Abbildung 8: Δ Ex2-MMACHC-Dimerbildung unter nicht reduzierenden Bedingungen. Western Blot Membran, Anti-MMACHC (1:200, Maus). HepG2-Zelllysate. Legende: 1 = Δ Ex2-MMACHC-flag, nicht reduzierender Ladepuffer, 2 = Δ Ex2-MMACHC-flag, reduzierender Ladepuffer (β -Mercaptoethanol), 3 = untransfiziertes HepG2-Zelllysate, nicht reduzierender Ladepuffer. Blauer Stern (*) = endogenes MMACHC-Protein, roter Stern (*) = Δ Ex2-MMACHC-Monomer, grüner Stern (*) = Dimer mit Δ Ex2-MMACHC-Protein, orangener Stern (*) = Dimer mit endogenem MMACHC. Ladung: 15 μ g/Tasche.

Zum Nachweis möglicher wt-/ Δ Ex2-MMACHC-Heterodimere wurden HEK293-Zellen mit wt-MMACHC-flag + Δ Ex2-MMACHC-myc kotransfiziert und anhand ihrer Tags im Western Blot detektiert. Abbildung 9 C veranschaulicht die fehlende Heterodimerbildung zwischen wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen. Sekundäre Fluoreszenzantikörper ermöglichten die gleichzeitige Detektion des Δ Ex2- und wt-MMACHC-Proteins über ihre jeweiligen Tags (Δ Ex2-myc = grün, wt-flag = rot). Im Falle einer Heterodimerbildung wäre ein gelbes Fluoreszenzsignal zu erwarten gewesen.

Die Überexpression des wt-MMACHC-flag-Konstrukts führte zu einer starken Monomerbande bei ca. 37 kDa. Dimer- oder Multimerbanden waren beim wt-MMACHC-Protein in keiner Bedingung nachweisbar (siehe Abb. 9 A).

Auch in Abbildung 9 B sind kräftige Banden bei ca. 60 kDa erkennbar, die von der starken Ausbildung von Disulfidbrücken der Δ Ex2-MMACHC-Proteine zeugen, bei gleichzeitig kaum detektierbaren Monomeren. Zudem wurde auch hier auf einer Höhe von ca. 100 kDa eine weitere spezifische Bande sichtbar, die das Δ Ex2-MMACHC-Protein enthält.

Eine Disulfidbrückenbindung von Δ Ex2-MMACHC-Proteinen mit dem MMADHC-Protein konnte dabei nicht beobachtet werden (siehe Abb. 10).

Die Dimerbildung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins sowie die ausschließliche Monomerbildung des wt-MMACHC-Proteins wurde auch durch die Supplementation von CN-Cbl oder OH-Cbl nicht beeinflusst.

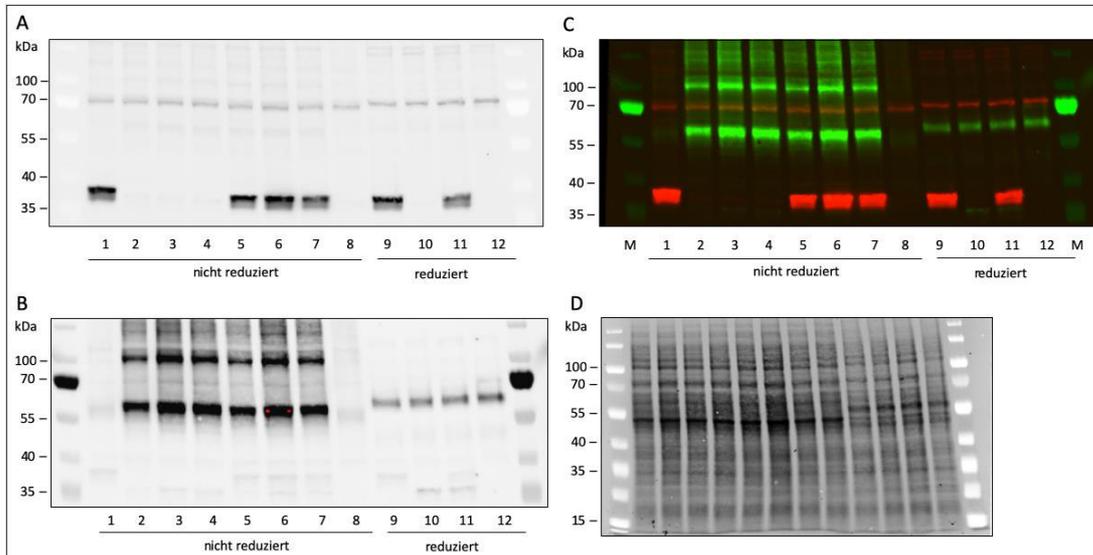


Abbildung 9: MMACHC-Monomere und Dimere. Western Blot Membran zur Detektion von Dimeren in HEK293-Zellen transfiziert mit wt- und Δ Ex2-MMACHC-DNA. Die Abbildungen zeigen drei Mal dieselbe Membran, entwickelt mit unterschiedlichen Antikörpern: **A** Anti-Flag (1:500, Kaninchen) **B** Anti-Myc (1:500, Maus) **C** Anti-Flag + Anti-Myc, Sekundäre Fluoreszenzantikörper grün = Anti-Maus (StarBright 700) und rot = Anti-Kaninchen (StarBright 520). Ladung: 15 μ g/ Tasche. **D** Darstellung der Proteingesamtladung (TGX-Technik). Legende: Bedingungen 1 - 8 = nicht reduziert, 9 - 12 = reduziert mit β -Mercaptoethanol. 1 = wt-MMACHC-flag, 2 - 4 = Δ Ex2-MMACHC-myc (2 = ohne Cbl-Zusatz, 3 = 10 μ M CN-Cbl, 4 = 10 μ M OH-Cbl), 5-7 = wt-MMACHC-flag + Δ Ex2-MMACHC-myc, (5 = ohne Cbl-Zusatz, 6 = 10 μ M CN-Cbl, 7 = 10 μ M OH-Cbl), 8 = untransfiziertes HEK293-Zelllysate, 9 = wt-MMACHC-flag, 10 = Δ Ex2-MMACHC-myc, 11 = wt-MMACHC-flag + Δ Ex2-MMACHC-myc, 12 = untransfiziertes HEK293-Zelllysate, M = Marker.

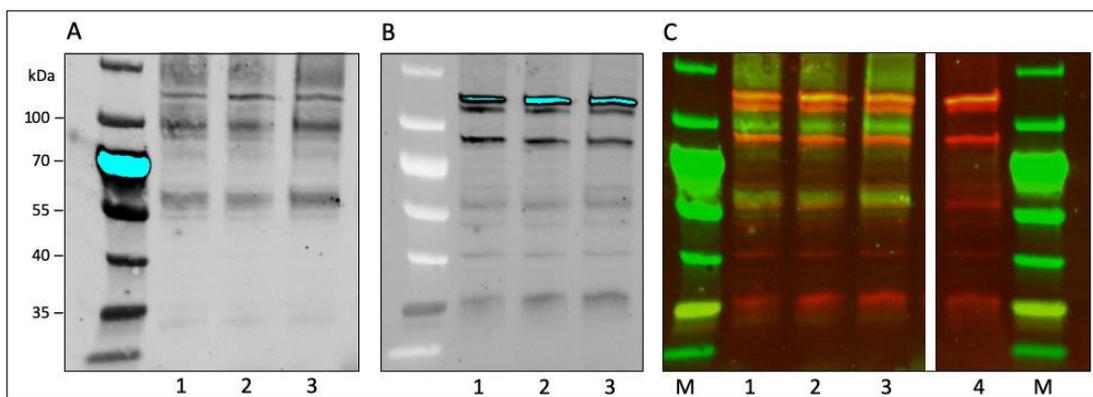


Abbildung 10: Keine Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen MMACHC und MMADHC. Ausschnitt aus einer Western Blot Membran zur Detektion von Dimeren in HEK293-Zellen transfiziert mit Δ Ex2-MMACHC und entwickelt mit **A** Anti-MMACHC (1:200, Maus) **B** Anti-MMADHC (1:500, Kaninchen) **C** Anti-MMACHC + Anti-MMADHC entwickelt mit sekundären Fluoreszenzantikörper grün = Anti-Maus (StarBright700) und rot = Anti-Kaninchen (StarBright520). Ladung 15 μ g/ Tasche. Den Proben wurde kein reduzierendes Agens zugesetzt. Legende: 1 = Δ Ex2-MMACHC-flag ohne Cbl-Zusatz, 2 = Δ Ex2-

MMACHC-flag mit 10 μ M CN-Cbl, 3 = Δ Ex2-MMACHC-flag mit 10 μ M OH-Cbl, 4 = Kontrolle, untransfiziertes HEK293-Zelllysate, M = Marker.

Zur Klärung, ob die Banden bei ca. 60 kDa endogenes MMACHC-Protein enthält (wt/ Δ Ex2-Heterodimere), wurde das endogene MMACHC durch siRNA-Knockdown weitgehend stillgelegt. Gleichzeitig erfolgte die Transfektion von Δ Ex2-MMACHC in die verwendeten HEK293-Zellen. Vergleicht man Banden, welche kein endogenes MMACHC enthalten (Bedingung 1 - 3) mit Kontrollbanden, bei denen das endogene MMACHC nicht beeinflusst wurde (Bedingung 4 - 6) kann kein Shift in der Bandenhöhe festgestellt werden. Das endogene MMACHC-Protein bildete folglich keine Disulfidbrücken mit dem trunkierten Δ Ex2-MMACHC-Protein aus. Die Dimerbanden sind somit am ehesten als Homodimere des Δ Ex2-MMACHC-Proteins zu werten.

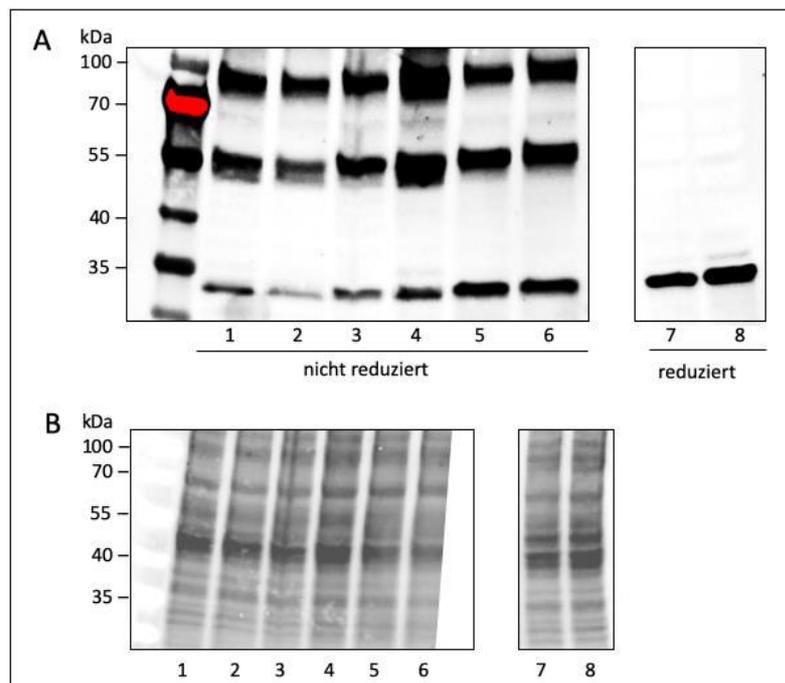
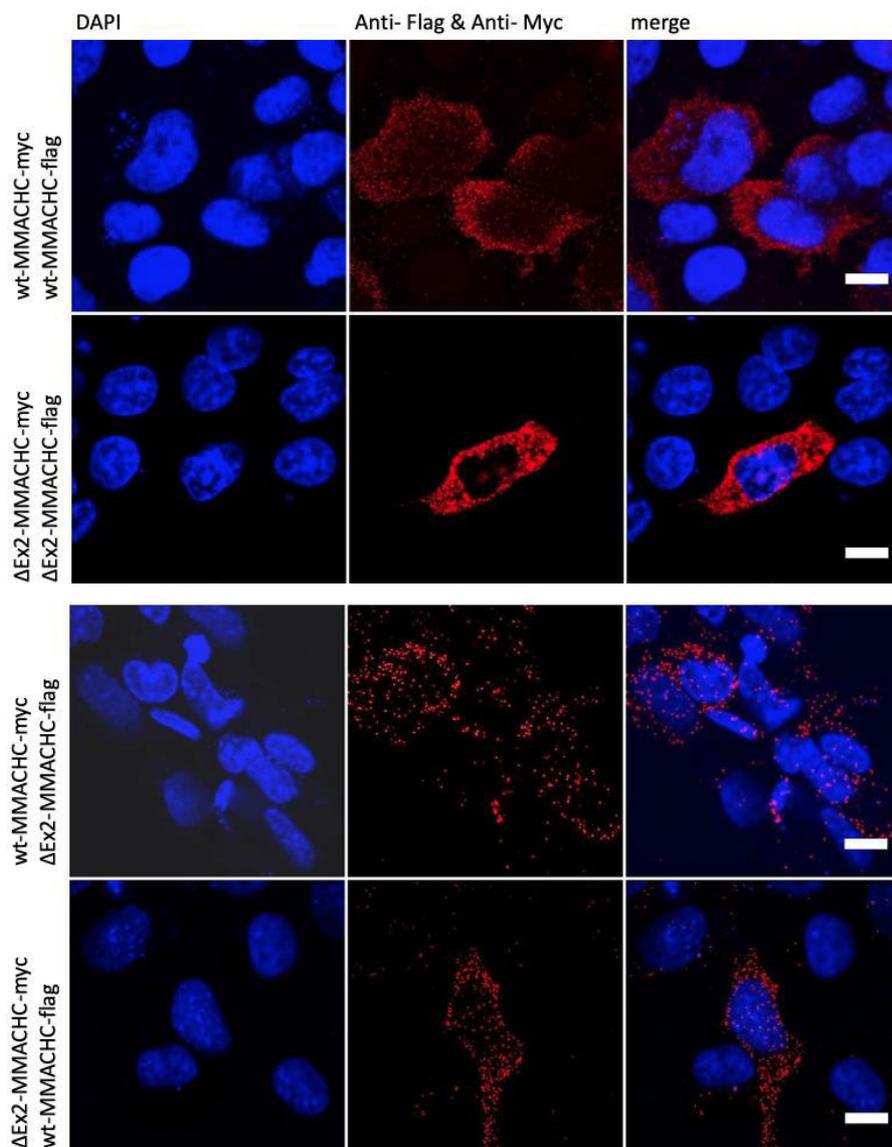


Abbildung 11: Homodimerbildung Δ Ex2-MMACHC. Keine Veränderung der Bandenhöhe durch Knockdown des endogenen MMACHC-Proteins. **A** Western Blot, Anti-MMACHC (1:200, Maus). HEK293-Zelllysate. Legende: 1 – 6 = nicht reduziert, 7 – 8 = reduziert mit β -Mercaptoethanol. 1 - 3 = siRNA-Knockdown des endogenen MMACHCs + Transfektion von Δ Ex2-MMACHC-myc (1 = ohne Cbl-Zusatz, 2 = 5 μ M CN-Cbl, 3 = 5 μ M OH-Cbl), 4 - 6 Transfektion von Δ Ex2-MMACHC-myc ohne Knockdown des endogenen MMACHCs (4 = ohne Cbl-Zusatz, 5 = 5 μ M CN-Cbl, 6 = 5 μ M OH-Cbl), 7 = siRNA-Knockdown + Transfektion von Δ Ex2-MMACHC-myc, 8 = Δ Ex2-MMACHC-myc ohne Knockdown des endogenen MMACHCs. Ladung: 15 μ g/Tasche **B** Darstellung der Proteingesamtladung (TGX-Technik).

3.5.2. Homo- und Heterodimerbildung im Proximity Ligation Assay

Auf immunzytologischer Ebene konnte eine starke räumliche Nähe zwischen wt-/wt-MMACHC, Δ Ex2-/ Δ Ex2-MMACHC, sowie wt-/ Δ Ex2-MMACHC mittels PLA nachgewiesen werden. Starke Signale wurden in den Homodimerbedingungen wt-/wt-MMACHC und Δ Ex2-/ Δ Ex2-MMACHC detektiert. Auch in der Heterodimerbedingung wt-/ Δ Ex2-MMACHC ist ein deutliches Fluoreszenzsignal detektierbar, wenngleich schwächer ausgeprägt als in den Homodimerbedingungen. Eine Auswahl der mittels Konvokalmikroskop gewonnenen Bilder kann Abbildung 12 entnommen werden.



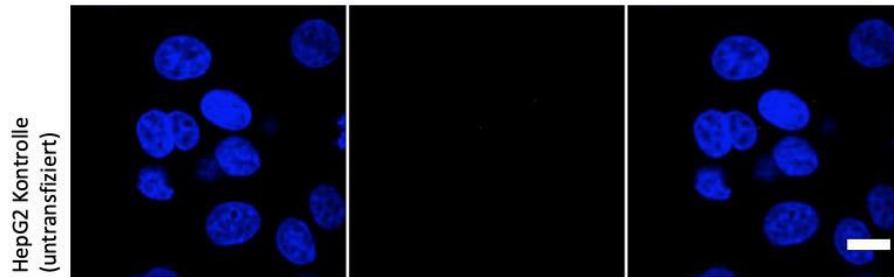


Abbildung 12: Homo-/ Heterodimerbildung der MMACHC-Proteine mittels PLA. Das erste Bild in jeder Reihe zeigt die mit DAPI gefärbten Zellkerne der HepG2-Zellen. Das mittlere Bild zeigt die roten Fluoreszenzsignale, die bei einer räumlichen Nähe < 40 nm der zu untersuchenden Proteine erzeugt wurden. Die transfizierten Konstrukte sind links vertikal abgebildet, verwendete Antikörper mittig oben. Rechts sind beide Bilder übereinandergelegt (merge). Maßstab Balken = 10 µm.

3.6. Einfluss von Cobalamin

Positive Effekte einer Cbl-Supplementation auf das Δ Ex2-MMACHC-Protein konnten sowohl in Western Blot Untersuchungen als auch in der Immunozytologie beobachtet werden.

3.6.1. Cobalaminsupplementation in HEK293- und HepG2-Zellen

Die Zugabe von 10 µM CN-Cbl in das Nährmedium mit Δ Ex2-MMACHC transfizierter Zellen bewirkte sowohl in der HEK293-Zelllinie als auch in der HepG2-Zelllinie eine erhöhte Proteinexpression des Δ Ex2-MMACHC-Proteins im Vergleich zu transfizierten Zellen in Nährmedien ohne Cbl-Zusatz (t -Test für abhängige Stichproben, einseitige Testung: HEK293: $t(4) = -4,237$, $p < 0,05$, HepG2: $t(5) = -2,62$, $p < 0,05$). Eine Erhöhung der Konzentration auf 50 µM führte in beiden Zelllinien zu keiner verstärkten Detektion von Δ Ex2-MMACHC-Proteinen.

Die Zugabe von OH-Cbl bewirkte sowohl in einer Konzentration von 10 µM als auch 50 µM keine bedeutsame Erhöhung der detektierbaren Menge an Δ Ex2-MMACHC-Proteinen.

Die Proteinexpression des wt-MMACHC-Proteins wurde durch die Supplementation von CN-/ OH-Cbl in beiden Konzentrationsstufen nicht bedeutsam verändert. Die gewonnenen Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 13 A und B (HEK293-Zellen), sowie Abbildung 14 A und B (HepG2-Zellen) dargestellt.

Die an der geladenen Gesamtproteinmenge normalisierten Bandenintensitäten wurden als Maß für die exprimierte Proteinmenge des MMACHC-Proteins in Bezug zum Normalmedium gewertet. Abbildung 13 C und D, sowie 14 C und D stellen die ausgewerteten Daten aus mehreren Western Blots zusammenfassend graphisch dar. Untersuchungen zur Zelltoxizität mittels MTT-Assay konnten für beide Konzentrationsstufen weder für CN-Cbl noch OH-Cbl eine verringerte Zellviabilität feststellen.

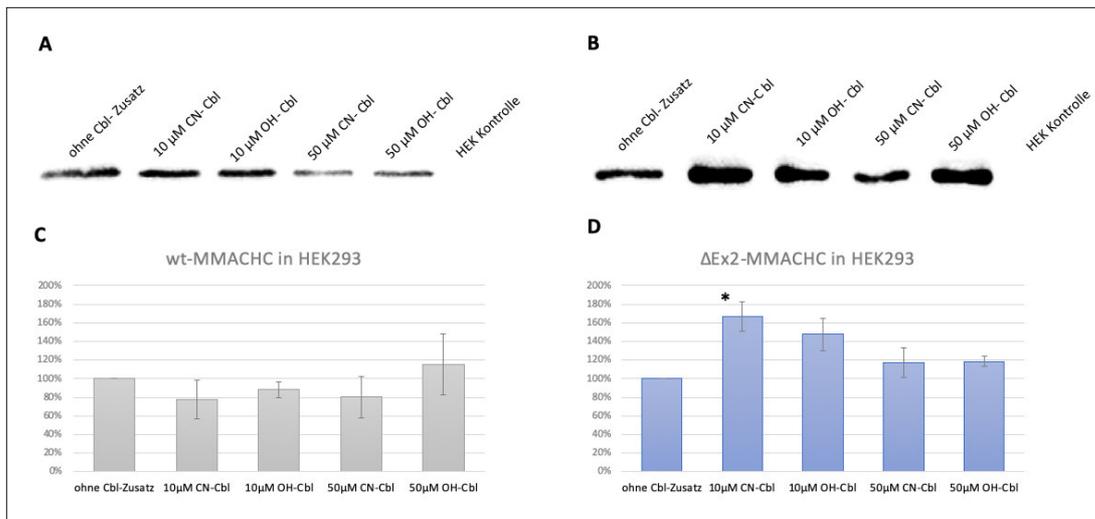


Abbildung 13: Veränderung der MMACHC-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Cobalaminzugabe in HEK293-Zellen **A** Western Blot, Anti-Flag (1:1000, Maus), HEK293-Zellen transfiziert mit wt-MMACHC-flag. Ladung: 5 µg/ Tasche. **B** Western Blot, Anti-Flag (1:500, Maus), HEK293-Zellen transfiziert mit ΔEx2-MMACHC-flag. Ladung 25 µg/ Tasche. **C** grafische Darstellung der an der geladenen Gesamtproteinmenge normalisierten Bandenintensitäten der wt-MMACHC-Banden. Auf der x- Achse sind die Cbl-Zusätze abgebildet. Die Säulenhöhe zeigt den Mittelwert der adjustierten Bandendichte. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder. In die Auswertung wurden n = 3 Blots einbezogen. t-Testungen für abhängige Stichproben ließen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen feststellen. **D** grafische Darstellung der an der geladenen Gesamtproteinmenge normalisierten Bandenintensitäten der ΔEx2-MMACHC Banden. In die Auswertung wurden n = 5 Blots einbezogen. Das Sternchen markiert den signifikanten Unterschied ($t(4) = -4,237$, $p < 0,05$, t-Test für abhängige Stichproben) zwischen Medium ohne Cbl-Zusatz und Nährmedium mit 10 µM CN-Cbl. Legende: CN-Cbl = Cyanocobalamin, OH-Cbl = Hydroxycobalamin.

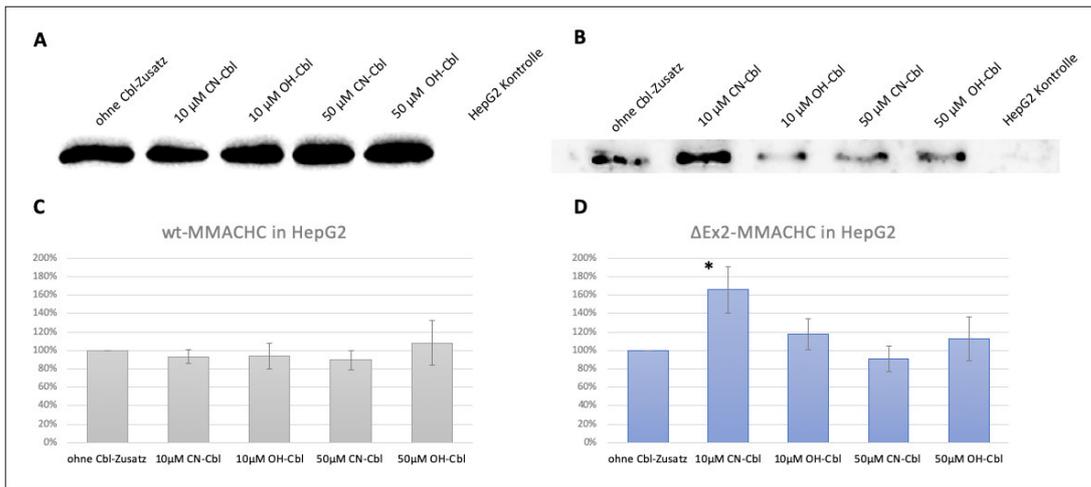


Abbildung 14: Veränderung der MMACHC-Proteinexpression in Abhängigkeit von der Cobalaminzugabe in HepG2-Zellen. **A** Western Blot, Anti-Flag (1:1000, Maus), HepG2-Zellen transfiziert mit wt-MMACHC-flag. Ladung: 5 µg/ Tasche. **B** Western Blot, Anti-Flag (1:500, Maus), HepG2-Zellen transfiziert mit Δ Ex2-MMACHC-flag. Ladung 25 µg/ Tasche. **C** grafische Darstellung der an der geladenen Gesamtproteinmenge normalisierten Bandenintensitäten der wt-MMACHC-Banden. Auf der x-Achse sind die Cbl-Zusätze abgebildet. Die Säulenhöhe zeigt den Mittelwert der adjustierten Bandendichte. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder. In die Auswertung wurden n = 4 Blots einbezogen. t-Testungen für abhängige Stichproben ließen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen feststellen. **D** grafische Darstellung der an der geladenen Gesamtproteinmenge normalisierten Bandenintensitäten der Δ Ex2-MMACHC Banden. In die Auswertung wurden n = 6 Blots einbezogen. Das Sternchen markiert den signifikanten Unterschied (t(5) = -2,62, p < 0,05, t-Test für abhängige Stichproben) zwischen Medium ohne Cbl-Zusatz und Nährmedien mit 10 µM CN-Cbl. Legende: CN-Cbl = Cyanocobalamin, OH-Cbl = Hydroxycobalamin.

3.6.2. Halbwertszeiten des Δ Ex2-MMACHC-Proteins unter Cobalamin einfluss

Zur Untersuchung der Stabilität des Δ Ex2-MMACHC-Proteins unter Einfluss von CN- und OH-Cbl wurden die HWZ mithilfe eines Cycloheximide Chase Assays bestimmt. Unter allen drei Bedingungen (Nährmedium ohne Cbl-Zusatz, mit 10 µM CN-Cbl, mit 10 µM OH-Cbl) zeigte sich sowohl auf Höhe der Monomere als auch der Dimere ein Rückgang der detektierbaren Proteinmenge über die Zeit (siehe Abb. 15). Für die Monomerbanden ergab sich eine HWZ von 6,38 h ohne Supplementierung von Cbl. Durch Zugabe von 10 µM OH-Cbl konnte die HWZ auf 7,31 h, durch Zugabe von 10 µM CN-Cbl auf 9,21 h erhöht werden. Für die Dimerbanden ergab sich ein ähnliches Bild: Ohne Cbl-Zusatz lag die HWZ bei 7,35 h. Durch Supplementierung von 10 µM OH-Cbl stieg sie auf 8,98 h an und eine Zugabe von 10 µM CN-Cbl bewirkte einen Anstieg der HWZ auf 10,55 h.

Folglich präsentierten sich die Dimere insgesamt stabiler als die Monomere, wobei die Stabilität durch eine Supplementierung von Cbl erhöht werden konnte. Hierbei

erwies sich CN-Cbl als effektiver als OH-Cbl. Die statistische Auswertung der Daten ergab zu allen drei Zeitpunkten (3 h, 6 h und 12 h) nach Translationsstopp eine signifikante Erhöhung der detektierbaren Proteinmenge von Δ Ex2-MMACHC-Monomeren und Dimeren im Vergleich zu Medium ohne Cbl-Supplementation. Am ausgeprägten stellte sich dieser Unterschied 3 h nach Translationsstopp dar ($p < 0,0001$). Die Supplementation von OH-Cbl führte hingegen zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinexpression der Δ Ex2-MMACHC-Monomeren oder Dimere (siehe Abb. 17).

Zur Ermittlung der HWZ wurden die Banden anhand der total geladenen Proteinmenge (TGX-Technik) normalisiert und der Zeitpunkt $t = 0$ der unterschiedlichen Bedingungen jeweils auf 100 % festgelegt. Die Degradierung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins wurde zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 12 h nach Translationsstopp bestimmt. Die Tabellen C und D in Abbildung 16 geben die Mittelwerte der einzelnen Zeitpunkte wieder. Unter Annahme eines Zerfalls erster Ordnung (first order decay) wurde mithilfe von Prism (GraphPad) die Geschwindigkeitskonstante (k) ermittelt und die HWZ durch die Formel $t_{(1/2)} = \ln 2 / k$ berechnet. Die gemittelten Daten aus $n = 7$ Blots sind in Abbildung 16 A (Monomere) und B (Dimere) graphisch aufgetragen.

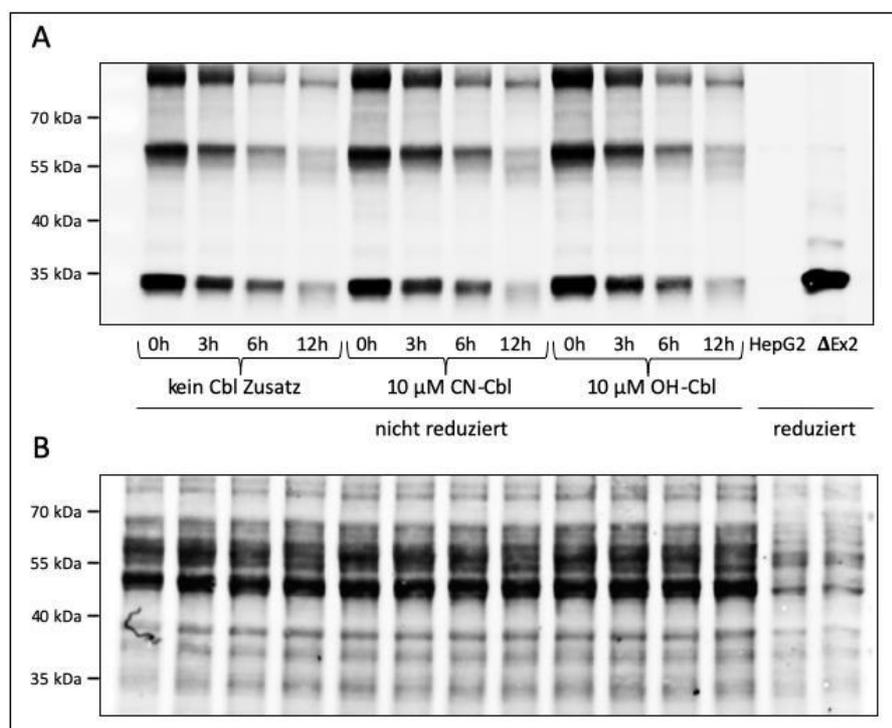


Abbildung 15: Western Blot: Einfluss der Cobalaminsupplementation auf die Halbwertszeit des Δ Ex2-MMACHC-Proteins. **A** Western Blot, Anti-Myc, (1:500, Kaninchen) Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen StarBright 520 (1:5000). Geladen wurden nicht reduzierte Proben aus HepG2-Zelllysaten, transfiziert mit Δ Ex2-MMACHC-myc und mindestens 24-stündiger Inkubation (Zeitpunkt: 0 h) mit den jeweiligen Nährmedien (kein Cbl-Zusatz, 10 μ M CN-Cbl, 10 μ M OH-Cbl). Die Herstellung von Zelllysaten erfolgte zum Zeitpunkt 0 h: 5 Minuten nach Zugabe von Cycloheximid, Zeitpunkt 3 h, 6 h und 12 h, jeweils 3 h, 6 h und 12 h nach Cycloheximidzugabe (Cycloheximide Chase Assay). Als Kontrollen dienten ein untransfiziertes HepG2-Zelllysate und ein Δ Ex2-MMACHC-myc Lysat, beide mit Zusatz von β -Mercaptoethanol im Ladepuffer (reduziert). **B** Darstellung der Proteingesamtladung (TGX-Technik). Ladung: 20 μ g/ Tasche. Legende: CN-Cbl = Cyanocobalamin, OH-Cbl = Hydroxycobalamin.

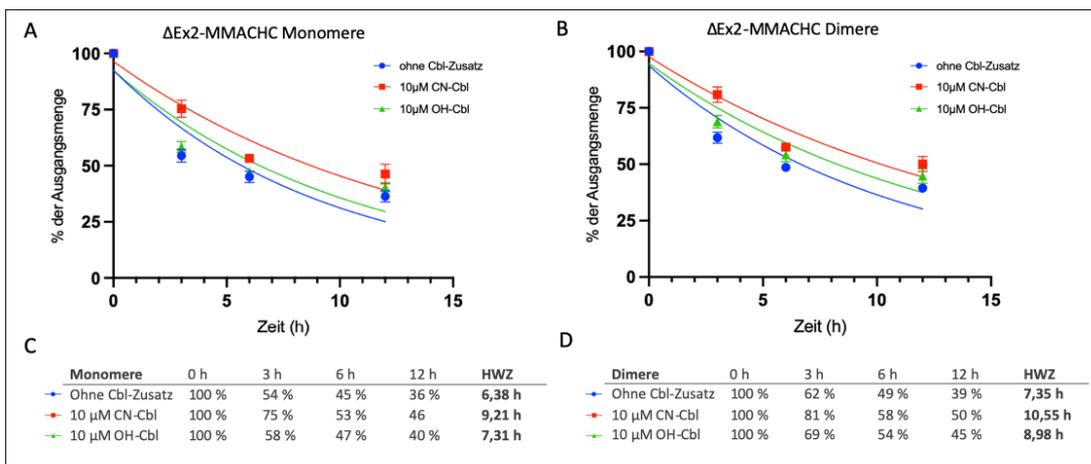


Abbildung 16: Auswertung: Einfluss der Cobalaminsupplementation auf die Halbwertszeit des Δ Ex2-MMACHC-Proteins in monomerer und dimerer Form. Die Symbole auf den Graphen in **A** und **B** zeigen die Mittelwerte der gemessenen Proteinexpressionen aus $n = 7$ Blots für die Δ Ex2-MMACHC-Monomere (**A**) bzw. Dimere (**B**) zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h und 12 h (X-Achse) nach Cycloheximidgabe. Die Y-Achse repräsentiert die prozentuale Proteinmenge vom Ausgangswert bei $X = 0$ h, welcher auf 100 % normiert wurde. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) wieder. Die Linien veranschaulichen die berechnete nonlineare Regression (first order decay) für die jeweiligen Bedingungen der Cobalaminbehandlung. In Tabellen **C** (Monomere) und **D** (Dimere) sind die in **A** und **B** abgebildeten prozentualen Werte numerisch aufgetragen. Zudem wurde die Halbwertszeit (HWZ) unter der Annahme eines first-order decays mithilfe der Formel $t(1/2) = \ln 2/k$ berechnet. (Berechnung und Graphik erstellt mittels GraphPad Prism Version 9.4 für Mac OS X, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com). Legende: CN-Cbl = Cyanocobalamin, OH-Cbl = Hydroxycobalamin. Linien: Blau = kein Cobalaminzusatz, Hellgrün = 10 μ M Hydroxycobalamin, Rot = 10 μ M Cyanocobalamin.

Zur Bestimmung der Signifikanz der deskriptiv gezeigten Unterschiede wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Es konnte ein hoch signifikanter Effekt der Cbl-Behandlung auf die Höhe der detektierbaren Proteinmenge an Δ Ex2-MMACHC-Monomeren nachgewiesen werden ($F(2,18) = 10,99$, $p < 0,001$). Durch Bonferroni-korrigierte post-hoc-Tests konnte dieser Haupteffekt erklärt werden durch die signifikante Erhöhung der Δ Ex2-MMACHC-Proteinmenge bei Zellen, die mit CN-Cbl behandelt wurden, zu allen Zeitpunkten nach Translationsstopp: 3h (kein Cbl-

Zusatz: $M = 54,48$, $SE = 7,53$; CN-Cbl (3h) $M = 75,35$, $SE = 10,1$, $p < 0,0001$), 6h (kein Cbl-Zusatz: $M = 45,04$, $SE = 6,53$; CN-Cbl (6h) $M = 53,63$ $SE = 3,97$, $p < 0,05$) und 12h (kein Cbl-Zusatz: $M = 36,34$, $SE = 6,73$; CN-Cbl (12h) $M = 46,29$ $SE = 11,57$, $p < 0,001$). Durch die Behandlung mit OH-Cbl konnte keine signifikante Erhöhung der detektierbaren Proteinmenge an Δ Ex2-MMACHC-Monomeren, unabhängig vom betrachteten Zeitpunkt, festgestellt werden (Daten siehe Tabellen 3.1. im Anhang). Zudem stellte sich die Interaktion der Behandlungsart und der Zeit als signifikant heraus ($F(6,54) = 4,56$, $p < 0,001$), was daraufhin weist, dass die Behandlung mit CN-Cbl einen unterschiedlichen Effekt auf die gemessene Proteinmenge ausübt in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Translationsstopp. Am höchsten war dabei der Einfluss von CN-Cbl auf die detektierbare Proteinmenge 3h nach Translationsstopp ($M_{\text{Diff}} = 20,87$, $SE_{\text{Diff}} = 3,41$).

Erwartungsgemäß zeigte sich ein hoch signifikanter Haupteffekt der Zeit auf die Höhe der detektierbaren Menge an Δ Ex2-MMACHC Protein ($F(3, 54) = 441,7$, $p < 0,0001$).

Auch für die Δ Ex2-MMACHC-Dimere konnte ein hoch signifikanter Effekt der Behandlung mit Cbl nachgewiesen werden ($F(2,18) = 8,42$, $p < 0,01$). Durch Bonferroni-korrigierte post-hoc Tests konnte dieser Haupteffekt wieder durch eine signifikante Erhöhung der Proteinmengen in den Dimerbanden 3h (kein Cbl-Zusatz: $M = 61,75$, $SE = 6,53$; CN-Cbl (3h) $M = 80,85$, $SE = 9,15$, $p < 0,0001$), 6h (kein Cbl-Zusatz: $M = 48,58$, $SE = 4,78$; CN-Cbl (6h) $M = 57,61$ $SE = 4,38$, $p < 0,05$) und 12h (kein Cbl-Zusatz: $M = 39,46$, $SE = 3,66$; CN-Cbl (12h) $M = 50,16$, $SE = 8,85$, $p < 0,01$) nach Translationsstopp bei Zellen, die mit CN-Cbl behandelt wurden, erklärt werden. Durch die Behandlung mit OH-Cbl wurde keine signifikante Erhöhung der detektierbaren Proteinmenge an Δ Ex2-MMACHC-Dimeren zu keinem Zeitpunkt festgestellt (Daten siehe Tabellen 3.2. im Anhang).

Auch hier erwies sich die Interaktion der Behandlungsart mit der Zeit als signifikant ($F(6,54) = 4,66$, $p < 0,001$). Der Einfluss von CN-Cbl auf die detektierbare Proteinmenge an Δ Ex2-MMACHC-Dimeren stellte sich auch hier 3h nach Translationsstopp ($M_{\text{Diff}} = -19,1$, $SE_{\text{Diff}} = 3,28$) am deutlichsten im Vergleich zur Bedingung ohne Cbl-Supplementation dar.

Erwartungsgemäß zeigte sich ein hoch signifikanter Haupteffekt der Zeit auf die Höhe der detektierbaren Menge an Δ Ex2-MMACHC-Dimeren ($F(3, 54) = 514,2, p < 0,0001$).

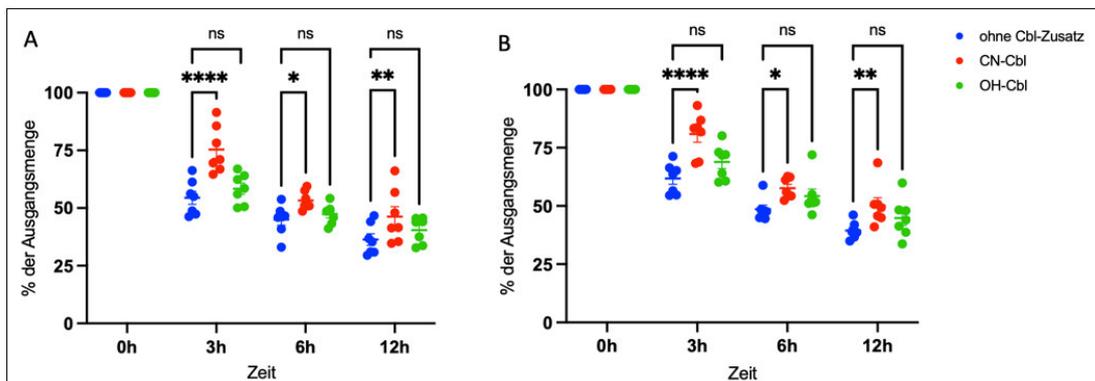


Abbildung 17: Vergleich der ermittelten Proteinmengen an Δ Ex2-MMACHC-Proteinen in Abhängigkeit von der Cobalaminsupplementation. **A** vergleicht die Proteinexpression der Δ Ex2-MMACHC-Monomere 3 h, 6 h und 12 h nach Cycloheximidgabe zwischen der Bedingung Medium ohne Cbl-Zusatz (Blau) und der Zugabe von 10 μ M Cyanocobalamin (in Rot), bzw. Hydroxycobalamin (in Grün). **B** zeigt dasselbe für die Δ Ex2-MMACHC-Dimerbanden. Es wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Im Anschluss wurden post-hoc Analysen durchgeführt und für multiples Testen korrigiert (Bonferroni-Korrektur). Legende: Die Sternchen markieren einen signifikanten Unterschied (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Ns = nicht signifikant. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) wider.

3.7. Einfluss von Homocystein

Die Anreicherung der Nährmedien von HepG2-Zellen mit 100 μ M sowie 200 μ M Homocystein führte zu einem signifikanten Rückgang der Bandenintensität der wt-MMACHC-Monomerbanden. Dabei bewirkte das höher konzentrierte Homocystein eine stärkere Abnahme der Proteinexpression (t-Test für abhängige Stichproben: 100 μ M Homocystein: $t(7) = 4,4; p < 0,01$. 200 μ M Homocystein: $t(7) = 3,83; p < 0,01$).

Die Menge an detektierten Δ Ex2-MMACHC-Proteinen nahm sowohl in der Monomer- als auch in der Dimerform unter Zugabe von 100 μ M Homocystein signifikant zu (Monomer 100 μ M Homocystein: $t(7) = -4,96; p < 0,05$; Dimer 100 μ M Homocystein: $t(7) = -3,26; p < 0,05$). Bei Zugabe von 200 μ M Homocystein unterschied sich dieser Zuwachs nicht mehr bedeutsam vom Medium ohne Homocystein. Eine Abnahme der Proteinexpression wie beim wt-MMACHC-Protein war jedoch nicht zu beobachten (Monomer 200 μ M Homocystein: $t(7) = 0,68; p = 0,52$; Dimer 200 μ M Homocystein: $t(7) = 1,75; p = 0,12$). Abbildung 18 zeigt exemplarisch eine Western Blot Membran (Abb. 18 A), die mittels TGX-Technik visualisierte Gesamtproteinmenge (Abb. 18 B)

und die graphische Auftragung der gemittelten Daten von n = 8 Western Blots zum Homocysteineinfluss auf das Δ Ex2-MMACHC-Protein.

Eine zuvor durchgeführte Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit von der Homocysteinkonzentration belegte zelltoxische Effekte der Homocysteinzugabe: Bei 200 μ M Homocystein waren nach 24 h noch 85 % und nach 48 h noch 70 % der Zellen vital, bei 100 μ M Homocystein waren es 95 % (24 h) und 90 % (48 h). Bei niedrigeren Konzentrationen (50 μ M) konnte keine erhöhte Zelltoxizität festgestellt werden.

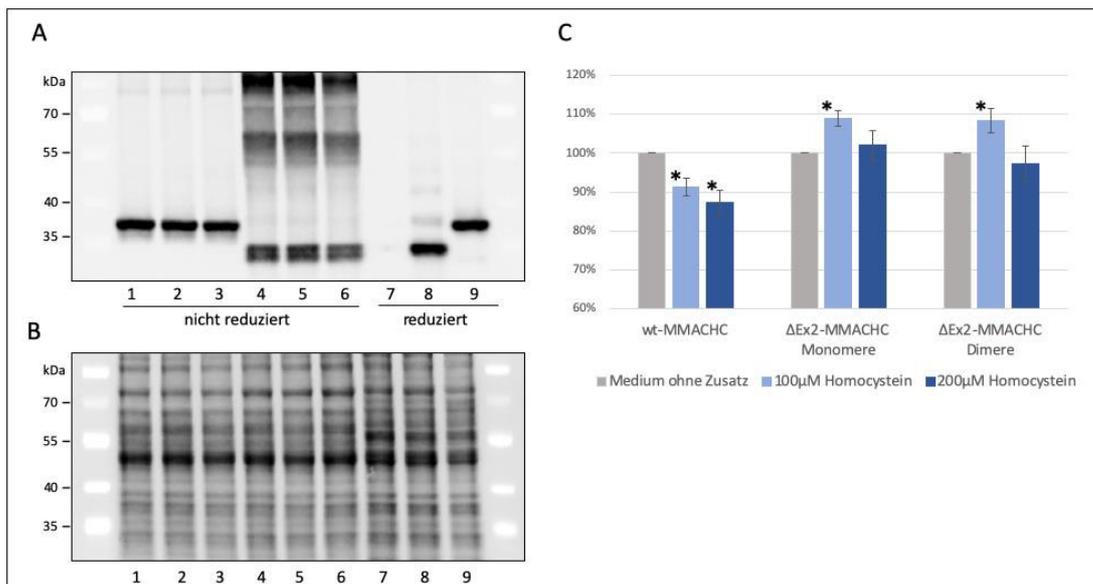


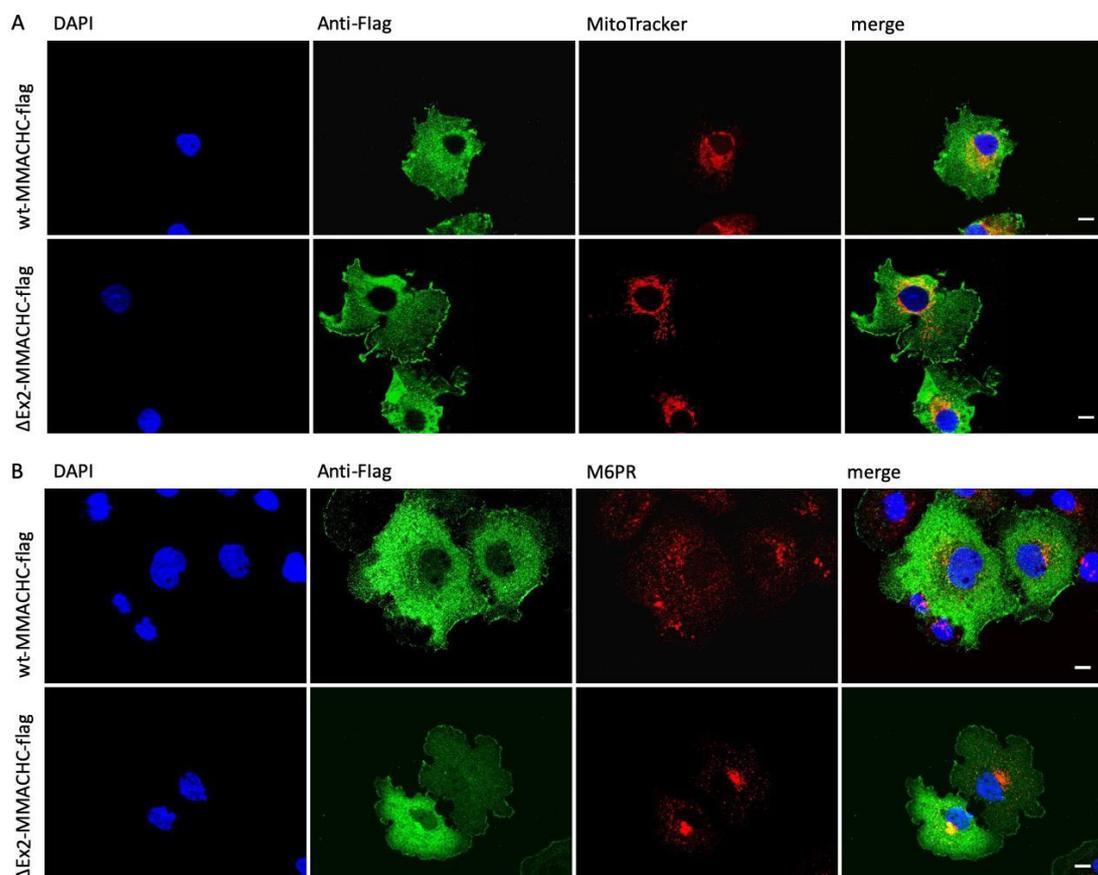
Abbildung 18: Einfluss von Homocystein auf die Expression von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen. **A** Western Blot, Anti-Myc (1:1000, Kaninchen). Legende: 1 – 3 = wt-MMACHC-myc: 1 = ohne Homocysteinzusatz, 2 = 100 μ M Homocystein, 3 = 200 μ M Homocystein, 4 – 6 = Δ Ex2-MMACHC-myc: 4 = ohne Homocysteinzusatz, 5 = 100 μ M Homocystein, 6 = 200 μ M Homocystein. Ladung: 15 μ g/Tasche, Proben 1 – 6 nicht reduziert, Proben 7 – 9 wurde β -Mercaptoethanol hinzugefügt (reduziert). **B** Nachweis der Proteing Gesamtmenge (TGX-Technik). **C** graphische Auftragung der Mittelwerte von n = 6 Membranen, normalisiert an der gesamt geladenen Proteinmenge. 100% entspricht der Bedingung ohne Homocysteinzusatz. Die Fehlerindikatoren spiegeln den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) wider. Sternchen markieren den signifikanten Unterschied zur Bedingung ohne Homocysteinzusatz ($p < 0,05$). Beim wt-MMACHC-Protein zeigte sich eine signifikante Abnahme der Bandenintensität. Bei Δ Ex2-MMACHC-Monomeren und Dimeren kam es zu einer signifikanten Zunahme unter Einfluss von 100 μ M Homocystein (wt-MMACHC: t-Test für abhängige Stichproben: 100 μ M Homocystein: $t(7) = 4,4$; $p < 0,01$. 200 μ M Homocystein: $t(7) = 3,83$; $p < 0,01$; Δ Ex2-MMACHC: t-Test für abhängige Stichproben: Monomer 200 μ M Homocystein: $t(7) = 0,68$; $p = 0,52$; Dimer 200 μ M Homocystein: $t(7) = 1,75$; $p = 0,12$).

3.8. Intrazelluläre Lokalisation

Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation zwischen wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC wurden immunozytologisch durch Fluoreszenzanfärbungen der jeweiligen Zellkompartimente sowie des MMACHC-Proteins untersucht. Es erfolgte eine Anfärbung folgender Kompartimente: Mitochondrium (Marker: MitoTracker), Lysosom (Marker: M6PR) und Proteasom (PSMA5). Als Negativkontrolle diente der peroxisomale Marker PMP70.

Wie der Abbildung 19 A – D zu entnehmen ist, zeigte das trunkierte MMACHC-Protein eine starke Kolokalisation mit PSMA5 sowie eine geringe Kolokalisation mit M6PR und MitoTracker. Das wt-MMACHC-Protein wies ebenfalls eine geringe Kolokalisation mit M6PR, MitoTracker und PSMA5 auf. Mit dem peroxisomalen Marker PMP70 war weder beim wt- noch beim Δ Ex2-MMACHC-Protein eine bedeutsame Kolokalisation erkennbar.

Im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein ist eine auffällig erhöhte proteasomale Lokalisation des Δ Ex2-MMACHC-Proteins zu vermerken. Die Auswertung erfolgte rein visuell.



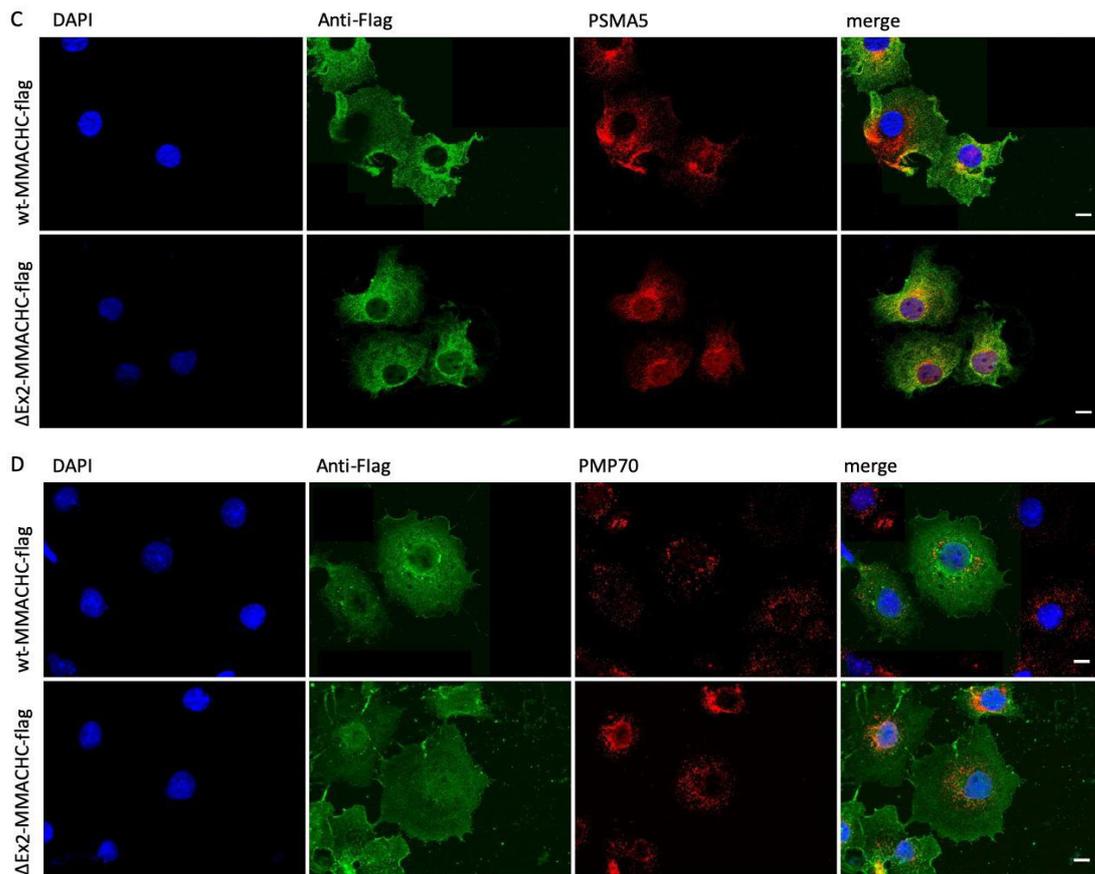


Abbildung 19: Intrazelluläre Lokalisation von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen. In Gelb dargestellt die Kolokalisation des wt-, bzw. Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit den zellulären Kompartimenten (rot): Mitochondrium = MitoTracker (A), Lysosom = M6PR (B), Proteasom = PSMA5 (C) und Peroxisom = PMP70 (D). In der oberen Zeile ist jeweils das über den Flag-Tag visualisierte wt-MMACHC-Protein, darunter das Δ Ex2-MMACHC-Protein dargestellt (grün). Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Maßstabballen = 20 μ M.

3.9. Wirkung von Cobalamin auf die proteasomale und lysosomale Lokalisation des MMACHC-Proteins

In COS-7-Zellen verringerte die Zugabe von 5 μ M CN-Cbl die proteasomale Lokalisation von wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen (siehe Abb. 20). Die Zugabe von 5 μ M OH-Cbl führte beim wt-MMACHC-Protein ebenfalls zu einer verringerten Kolokalisation mit dem proteasomalen Marker PSMA5. Beim Δ Ex2-MMACHC-Protein konnte keine Veränderung im Bezug zum Normalmedium unter Einfluss von 5 μ M OH-Cbl beobachtet werden.

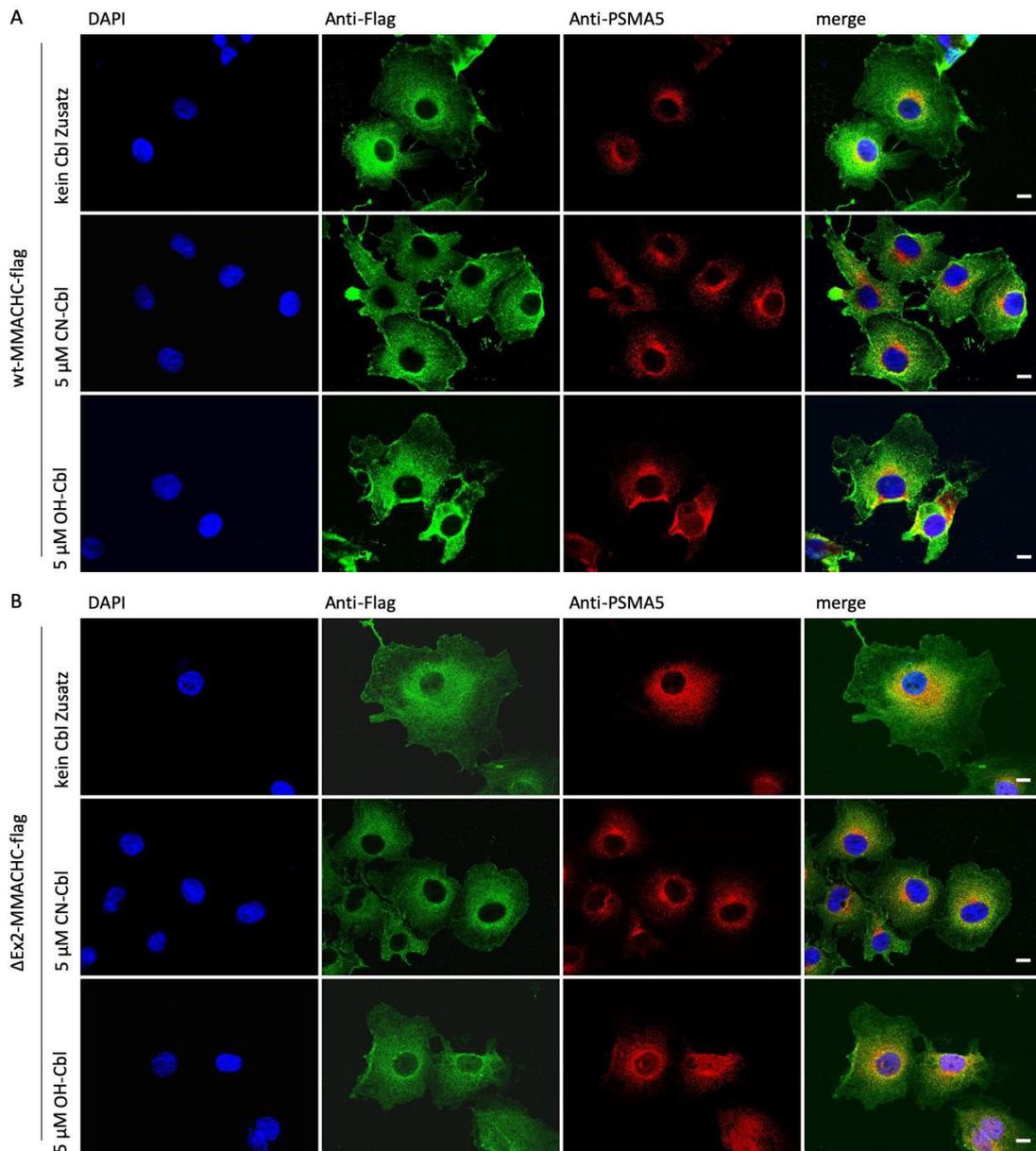


Abbildung 20: Proteasomale Lokalisation von wt- (A) und Δ Ex2- (B) MMACHC-Proteinen. In COS-7-Zellen exprimierte wt-/ Δ Ex2-MMACHC-Proteine wurden anhand ihres Flag-Tags visualisiert (grün). Der Nucleus wurde mit DAPI angefärbt (blau) und die Proteasome mit einem Antikörper gegen PSMA5 (rot) visualisiert. In der oberen Reihe wurde dem Zellnährmedium kein Cobalamin zugeführt, in der mittleren Reihe 5 μ M CN-Cbl, in der unteren Reihe 5 μ M OH-Cbl. A CN- und OH-Cbl verringerten die proteasomale Lokalisation von wt-MMACHC-Proteinen. B CN-Cbl verringerte die proteasomale Lokalisation von Δ Ex2-MMACHC-Proteinen. Legende: CN-Cbl = Cyanocobalamin, OH-Cbl = Hydroxycobalamin. Maßstabsbalken: 20 μ m

Das Δ Ex2-MMACHC-Protein wies eine erhöhte Kollokalisierung mit dem lysosomalen Marker M6PR unter Zugabe von 5 μ M CN-Cbl auf, nicht aber unter Zugabe von 5 μ M OH-Cbl. Die lysosomale Lokalisation des wt-MMACHC-Proteins zeigte eine leicht erhöhte Kollokalisierung mit M6PR unter Einfluss von CN- und OH-Cbl (siehe Abb. 21).

Der Vergleich bezieht sich immer auf Zellen, die keinem Zusatz von Cbl ausgesetzt waren. Die Auswertung erfolgte rein visuell.

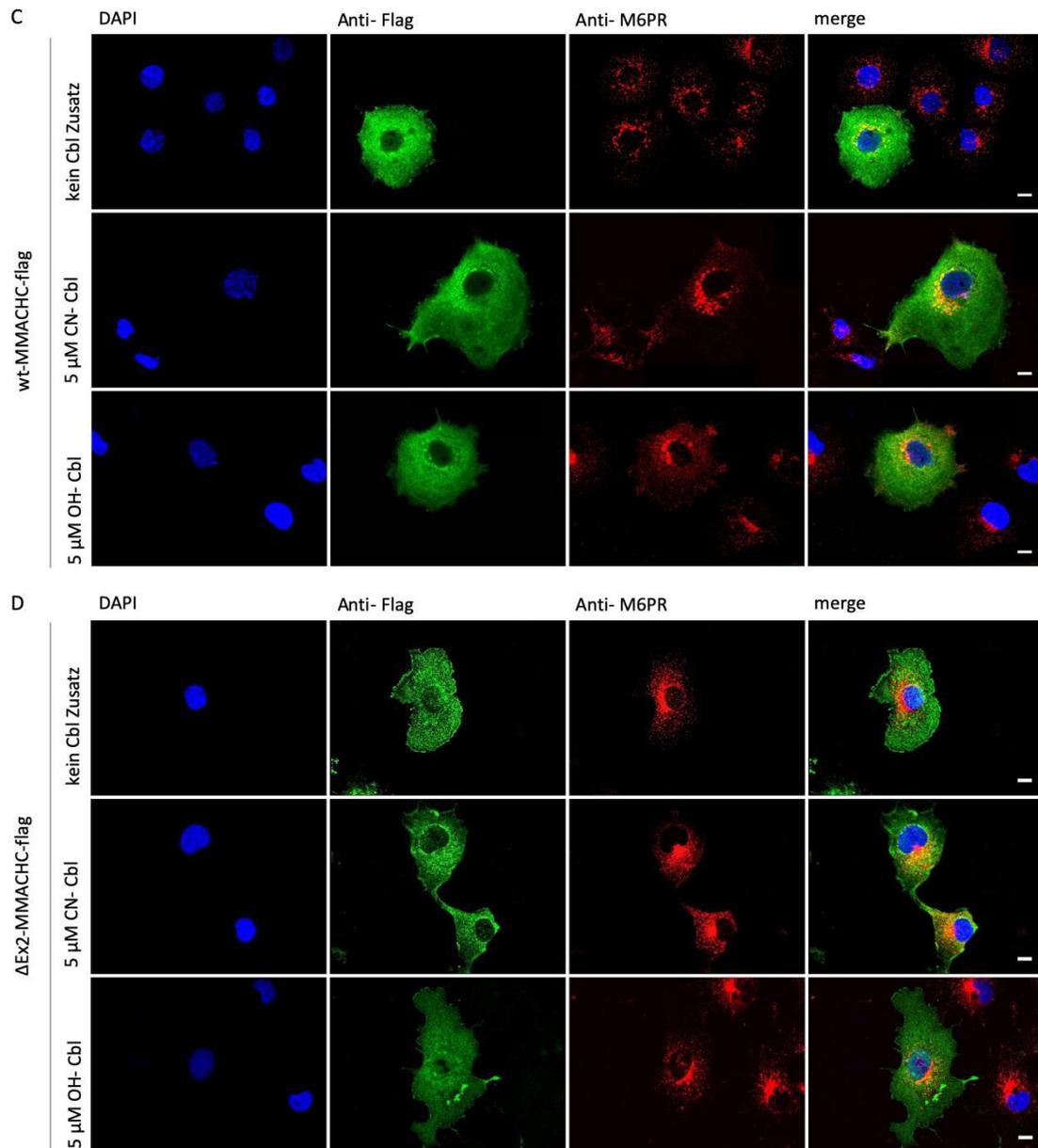
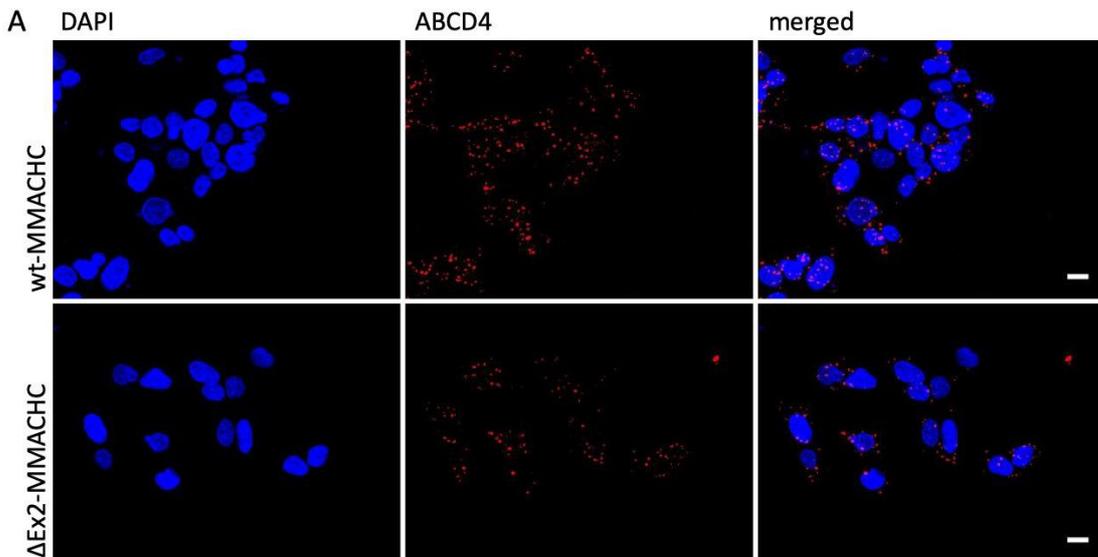


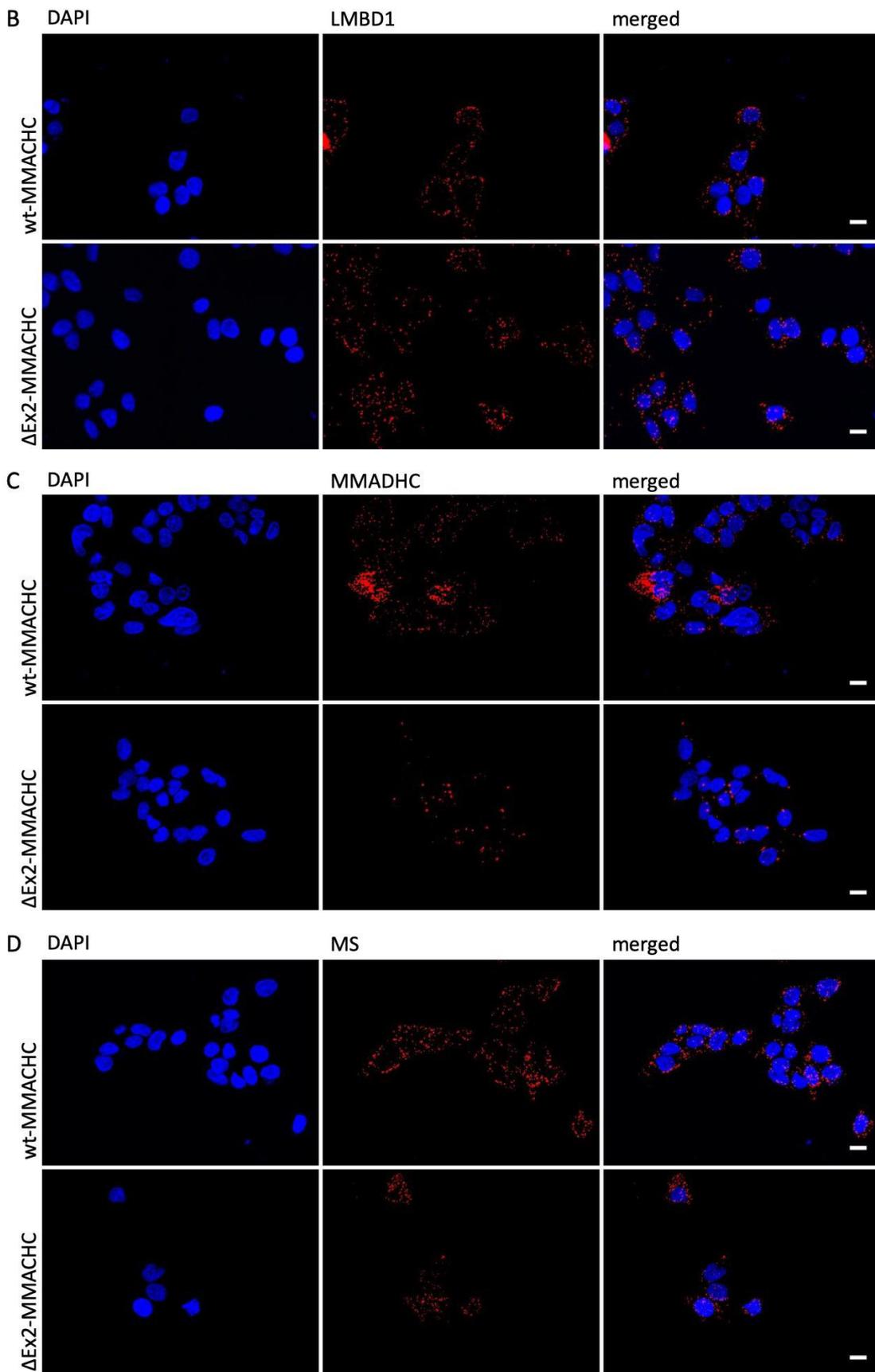
Abbildung 21: Lysosomale Lokalisation von von wt- (C) und Δ Ex2- (D) MMACHC-Proteinen. In COS-7-Zellen exprimierte wt-/ Δ Ex2-MMACHC-Proteine wurden anhand ihres Flag-Tags visualisiert (grün). Der Nukleus wurde mit DAPI angefärbt (blau) und die Lysosome mit einem Antikörper gegen M6PR (rot) visualisiert. In der oberen Reihe wurde dem Zellnährmedium kein Cobalamin zugeführt, in der mittleren Reihe 5 μ M CN-Cbl, in der unteren Reihe 5 μ M OH-Cbl. C CN- und OH-Cbl erhöhen die lysosomale Lokalisation von wt-MMACHC-Proteinen. D CN-Cbl erhöht die lysosomale Lokalisation von Δ Ex2-MMACHC-Proteinen. Legende: CN-Cbl = Cyanocobalamin, OH-Cbl = Hydroxycobalamin. Maßstabsbalken: 20 μ m

3.10. Interaktionspartner des MMACHC-Proteins

Sowohl das wt- als auch das Δ Ex2-MMACHC-Protein wiesen im PLA eine enge räumliche Nähe von < 40 nm mit den Proteinen ABCD4, LMBD1, MMADHC, MS und MSR auf. Dabei erzeugten die Δ Ex2-MMACHC-Proteine eine vergleichbare Anzahl roter Fluoreszenzsignale wie das wt-MMACHC-Protein mit den Proteinen ABCD4, LMBD1 und MS (siehe Abb. 22 A, B, D). Demgegenüber erschien die Anzahl der Signale in der kotransfizierten Probe mit Δ Ex2-MMACHC und MMADHC sowie MSR im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein reduziert (siehe Abb. 22 C, E).

Als Negativprobe dienten untransfizierte HepG2-Zelllysate, die mit Anti-Myc und Anti-Flag, sowie den jeweiligen Sekundärantikörpern aus dem PLA-Kit inkubiert wurden. Hier konnte lediglich ein sehr schwaches Hintergrundsignal detektiert werden (siehe Abb. 22 F). Die Bildaufnahmen erfolgten standardisiert. Für die Auswertung wurden mehrere Bilder pro Bedingung visuell analysiert.





4. Diskussion

Die Methylmalonazidämie mit Homocysteinurie vom Typ C (CbIC) ist die häufigste angeborene Störung des intrazellulären Vitamin B₁₂-Stoffwechsels. Sie wird durch Mutationen im MMACHC-Gen hervorgerufen und autosomal-rezessiv vererbt. Von den bisher 648 beschriebenen genetischen Varianten im MMACHC-Gen werden 117 als pathogen und 71 als wahrscheinlich pathogen von der *NCBI ClinVar Database* eingestuft (Stand: 22.05.2024). Von diesen gehen wiederum fünf überzufällig häufig mit Gefäßschädigungen der Niere und der Lunge einher. Diesen Mutationen gemeinsam ist, dass sie durch verändertes Spleißen zu einem Verlust des 2. Exons des MMACHC-Gens führen und es zur Bildung eines trunkierten Proteins kommt. Die vorliegende Arbeit hat den Zusammenhang des verkürzten MMACHC-Proteins mit vaskulopathiespezifischen Manifestationen analysiert und als bisher erste Untersuchung eine Charakterisierung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins vorgenommen.

4.1. Zusammenhang von Δ Ex2-Spleißmutationen im MMACHC-Gen mit renalen und pulmonalen Vaskulopathien

Von weltweit etwa 1000 berichteten Fällen (Wang et al., 2019) einer genetisch bestätigten CbIC konnten 84 Patienten ausfindig gemacht werden, bei denen über ein aHUS, eine rTMA, eine PAH oder PVOD berichtet wurde. Innerhalb dieser Patientengruppe wiesen 61,9 % eine Δ Ex2-Spleißmutation auf mindestens einem Allel auf.

In Anbetracht der Seltenheit des Auftretens einer PAH oder eines aHUS im Kindesalter sowie einer CbIC-Erkrankung ist diese Genotyp-Phänotyp-Assoziation bemerkenswert.

Noch deutlicher wurde der Zusammenhang bei Betrachtung der Patientengruppe mit einem kombinierten Auftreten eines aHUS/ rTMA und PAH. Unter Hinzunahme der chinesischen Patienten (c.80A>G-Mutation) mit renalen Auffälligkeiten und PAH, waren 87,2 % der kombinierten Erkrankungsfälle mit einer Δ Ex2-Spleißmutation assoziiert. Zudem wiesen über die Hälfte (65,4 %) der Δ Ex2-Spleißmutationsträger einen renal-pulmonalen Phänotyp auf.

Durch die äußerst geringe Wahrscheinlichkeit, an diesen beiden seltenen Erkrankungen unabhängig voneinander, gleichzeitig zu erkranken, ist die ursächliche Beteiligung des ΔEx2 -MMACHC-Proteins an der Pathogenese der Vaskulopathien dringlich anzunehmen.

Zudem scheint die PVOD, bzw. ihr symptomatisches Korrelat in Form einer PAH, charakteristisch für die Gruppe der ΔEx2 -Spleißmutationsträger zu sein und wurde trotz der immer häufigeren Berichte über late-onset Manifestationen nur sieben Mal bei CbIC-Patienten ohne ΔEx2 -Spleißmutation beschrieben. Gleichzeitig wiesen 36 der 52 ΔEx2 -Spleißmutationsträger (69,2 %) in dieser Recherche eine PAH/ PVOD auf.

Im Gegensatz zu den anderen berichteten Spleißmutationen wurde die *c.80A>G* Mutation bisher nicht experimentell als Spleißmutation bestätigt. Lerner-Ellis (2006) stufte in seinem Paper zur Entdeckung des MMACHC-Gens die *c.80A>G* bereits als potentielle Spleißmutation ein, Wang berichtet hingegen über eine Missense Mutation und der intronischen Spleißmutation auf *c.81+1A>G* (Wang et al., 2019). Aufgrund der engen Lage zum Exon-Intron-Übergang und den großen phänotypischen Ähnlichkeiten zu den bestätigten ΔEx2 -Spleißmutationen wurde die *c.80A>G*-Mutation in dieser Arbeit den ΔEx2 -Spleißmutationen zugerechnet. Eine experimentelle Prüfung der Auswirkungen der *c.80A>G*-Mutation, sowie der *c.81+1A>G*-Mutation bleibt Aufgabe nachfolgender Forschungsarbeiten.

In beiden Gruppen (mit/ ohne ΔEx2 -Spleißmutation) waren Jungen häufiger vertreten als Mädchen (männlich $n = 45$, weiblich $n = 37$, k. A. = 2). Dies deckt sich mit der bisher nicht eindeutig geklärten Beobachtung, dass Jungen insgesamt leicht häufiger an einer CbIC erkranken (Fischer et al., 2014).

Auch das mittlere Erstmanifestationsalter von 6,9 Jahren (ΔEx2 -Spleißmutation), bzw. 8,1 Jahren (ohne Spleißmutation) stimmt mit der Beobachtung überein, dass das aHUS und insbesondere die PAH Symptome des Vorschulalters darstellen (Huemer et al., 2014). Zu berücksichtigen bleibt dabei jedoch die große Heterogenität im Erstmanifestationsalter. So war der jüngste Patient mit aHUS bei Erkrankungsbeginn 12 Tage alt und bei dem ältesten CbIC-Patienten wurde mit 45 Jahren ein aHUS diagnostiziert.

Die häufigste Mutation in der westlichen Welt (*c.271dupA*, ca. 48 % (Wang et al., 2019)) sowie die häufigste Mutation im asiatischen Raum (*c.609G>A*, 43,6 % (Wang et al., 2019)), beide mit einem early-onset assoziiert, gehen in homozygoter Ausprägung nur sehr selten mit einer rTMA und so gut wie nie mit einer PAH einher. Renale und pulmonale Vaskulopathien stehen bei der Mehrheit der CbIC-Patienten folglich nicht im Vordergrund und werfen die Frage auf, warum MMACHC-Mutationen mit Verlust des 2. Exons eine so starke Assoziation zu dieser seltenen Symptomkonstellation aufweisen.

Einen möglichen Erklärungsansatz bietet das Erstmanifestationsalter der Patienten. Dieses liegt bei CbIC-Patienten mit aHUS/ rTMA und/oder PAH bei einem mittleren Alter von 8,7 Jahren und damit deutlich über dem mittleren Erstmanifestationsalter der Gesamtgruppe der CbIC-Patienten, das, abhängig von der betrachteten Studie, mit 0,91 Monaten (Fischer et al., 2014) bis 11 Monaten (Wang et al., 2019) angegeben wird.

Dieser Altersunterschied ließe sich bei den Spleißmutationsträgern durch das Vorhandensein einer Residualfunktion des trunkierten MMACHC-Proteins erklären. Ein teilweise funktionstüchtiges MMACHC-Protein könnte schwere Komplikationen der Erkrankung abwenden, die bei Manifestationen mit early-onset im Vordergrund stehen und teilweise mit dem frühzeitigen Versterben der Patienten einhergehen. Der verzögerte Erkrankungsbeginn könnte so Symptome in Erscheinung treten lassen, die sonst aufgrund der Schwere der Erkrankung bei early-onset Mutationen nicht die nötige Zeitspanne zur Entwicklung bekämen.

Für diese Hypothese spricht auch das mittlere Erstmanifestationsalter von 8,1 Jahren der berichteten Patienten ohne Spleißmutationen, bei denen es jedoch zu einem aHUS/rTMA oder PAH kam.

Auch Fischer und Kollegen berichten über ein gehäuftes Auftreten eines aHUS bei spätem Erstmanifestationsalter der Patienten: So trat es in der Neonatalperiode bei etwa 5 % aller CbIC Patienten auf, in der Gruppe der Patienten mit late onset (> 4 Jahre) bei etwa 25 % (Fischer et al., 2014).

Dagegen stehen Erfahrungsberichte von Patienten mit compound-heterozygoten Mutationen, die ebenfalls mit einem late-onset assoziiert sind (z.B. *c.394C>T*, *c.347T>C*, *c.440G>C*, *c.482G>A*). Sie gehen in der Mehrzahl der Fälle mit einer akuten

neurologischen Verschlechterung einher, ohne renale oder pulmonale Komplikationen aufzuweisen (Morel et al., 2006; Thauvin-Robinet et al., 2008).

Auch bleiben TMA und PAH nicht ausschließlich auf late-onset Manifestationen begrenzt. So ist der jüngste Patient mit PAH und renalen Auffälligkeiten bei Manifestationsbeginn erst 3 Monate alt und ein Viertel (n = 13) der Δ Ex2-Spleißmutationsträger mit renalen Auffälligkeiten und PAH sind bei Manifestationsbeginn jünger als 4 Jahre.

Erfahrungen von Patienten, die eine Δ Ex2-Spleißmutation auf beiden Allelen aufweisen, sprechen ebenfalls gegen das Erstmanifestationsalter als alleinigen Vermittler des beobachteten Zusammenhangs. Wang und Kollegen schildern den Fall eines männlichen Neugeborenen mit einem schweren Verlauf der CblC. Der Erkrankung zugrunde lag die compound heterozygote Mutation *c.80A>G/c.81+1G>A*. Die im ersten Intron lokalisierte *c.81+1G>A* Mutation wird dabei als Spleißdonorstelle gewertet (*National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000859433.1]*) und ist somit mit hoher Wahrscheinlichkeit den Δ Ex2-Spleißmutationen zuzurechnen. Bei dem beschriebenen Neugeborenen kam es am 24. Lebenstag zu schweren Komplikationen wie Schock, metabolischer Azidose, Herzversagen, Nierenversagen und respiratorischer Insuffizienz (Wang et al., 2019). Darüberhinaus sind drei weitere Patienten beschrieben, bei denen eine Δ Ex2-Spleißmutation auf beiden Allelen gefunden wurde. Auffällig ist, dass auch diese Patienten (2, 9 und 14 Jahre bei Manifestationsbeginn, alle mit kombiniertem aHUS + PAH/PVOD) einen schweren Erkrankungsverlauf aufwiesen. Zwei von ihnen verstarben trotz i.m. OH-Cbl-Therapie (Martinez de Compagnon, 2017, Kömhoff (unpublizierte Daten)).

Aus den dargestellten Befunden lässt sich die Hypothese ableiten, dass das trunkierte MMACHC-Protein selbst direkt oder indirekt gefäßschädigende Eigenschaften aufweist. Dies könnte erklären, warum der charakteristische renal-pulmonale Phänotyp bei Δ Ex2-Spleißmutationsträgern auftritt, bei der im europäischen Raum häufigsten Variante *c.271dupA*, die in homozygoter Ausprägung mit einem totalen Funktionsverlust des MMACHC-Proteins einhergeht, hingegen nicht vorkommt.

Zwar konnte gezeigt werden, dass Eltern erkrankter Kinder, die neben der heterozygoten Mutation *c.276G>T*, eine normale Wildtypform des MMACHC-Gens tragen, völlig asymptomatisch sind (Kömhoff et al., 2013), hier wäre jedoch eine Herunterregulierung des fehlerhaften Gens zugunsten des unbeeinträchtigten MMACHC-Genallels denkbar.

4.2. Charakterisierung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins

Die herabgesetzte Stabilität des Δ Ex2-MMACHC-Proteins im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein trat bereits bei den Vorarbeiten dieser Arbeit deutlich in Erscheinung. So musste mindestens die zehnfache Menge an Δ Ex2-MMACHC-DNA transfiziert werden, um eine vergleichbare Proteinexpression im Western Blot zu erhalten. Der Expressionsunterschied ließ sich dabei konstant in drei verschiedenen Zelllinien nachweisen.

Untersuchungen zur HWZ des Δ Ex2-MMACHC-Proteins im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein bestätigten diese Vermutung. So lag die HWZ des wt-MMACHC-Proteins mit 20 h deutlich über der des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit 2,5 h (Josch Richter, unpublizierte Daten). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden zur Thermostabilität des MMACHC-Proteins, bei denen die MMACHC-Mutante R161Q eine deutlich herabgesenkte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp aufwies (Froese et al., 2010).

Die durchgeführten immunozytologischen Untersuchungen verbildlichen die beobachtete Labilität des Δ Ex2-MMACHC-Proteins durch eine stark erhöhte proteasomale Lokalisation des Δ Ex2-MMACHC-Proteins im Vergleich zum Wildtyp. Dies spricht für einen starken proteasomalen Abbau des trunkierten Proteins, bei dem die Zellmaschinerie das Δ Ex2-MMACHC-Protein als fehlerhaft erkennt und es über eine Polyubiquitinierung zur Proteindegradation im Proteasomen markiert. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe konnten übereinstimmend zeigen, dass die Proteinstabilität des Δ Ex2-MMACHC-Proteins unter Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 deutlich ansteigt (Josch Richter, Aparna Renigunta, unpublizierte Daten).

In geringem Ausmaß zeigte das Δ Ex2-MMACHC-Protein zudem eine lysosomale und mitochondriale Lokalisation, bei gleichzeitig fehlender Kolo­kalisierung mit dem Peroxisomen. Die schwache Kolo­kalisierung mit dem Lysosom und Mitochondrium steht mit der Interaktion des MMACHC-Proteins mit den lysosomalen Membranproteinen ABCD4 und LMBRD sowie mit der mitochondrialen Membran in Form eines Heterodimer mit MMADHC in Einklang (Froese et al., 2015).

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse auf eine zytoplasmatische Lokalisation des Δ Ex2-MMACHC-Proteins hin. Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden, dass es sich beim wt-MMACHC-Protein um ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein handelt (Mah et al., 2013).

Für das wt-MMACHC-Protein wurden Interaktionen mit fünf weiteren Proteinen des intrazellulären Cbl-Stoffwechsels experimentell nachgewiesen: den lysosomalen Membranproteinen ABCD4 und LMBD1, dem Verteilerprotein MMADHC und dem zytosolischen Zielenzym MS, sowie deren Unterstützerprotein MSR (Bassila et al., 2017; Deme et al., 2014).

Mithilfe des PLAs konnte gezeigt werden, dass das Δ Ex2-MMACHC-Protein keinen vollständigen Interaktionsverlust mit einem der fünf Partner zu verzeichnen hatte. Im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein war jedoch eine verminderte Interaktion mit den Proteinen MMADHC und MSR zu verzeichnen.

Die reduzierte Interaktion des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit MSR könnte mit einer verminderten Fähigkeit zur Reduktion oxidierten Cob(I)alamins zu Cob(II)alamin an der MS in Verbindung stehen. Die Oxidation von Cob(I)alamin führt zu einer Inaktivierung der MS und geht folglich mit einer Akkumulation von Homocystein einher (Wolthers & Scrutton, 2009).

Die Heterodimerbildung von wt-MMACHC und MMADHC ermöglicht es dem MMADHC-Protein unter physiologischen Bedingungen, prozessiertes Cob(II)alamin zu seinen Zielorten zu transportieren (Froese et al., 2015, 2012). Eine herabgesetzte Interaktion des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit dem MMADHC-Protein wirft daher die Frage auf, ob die geordnete Zuteilung des prozessierten Cbls auf das mitochondriale Kompartiment und die zytosolische MS gestört sein könnte. Betrachtet man die biochemischen Parameter von Patienten mit Δ Ex2-Spleißmutationen ist allerdings kein Trend abzulesen, dass einer der beiden Wege stärker betroffen wäre. So ist der

Anstieg der Homocysteinwerte, als Maß für die Beeinträchtigung des zytosolischen Wegs, und der MMS-Werte, als Maß des mitochondrialen Wegs, vergleichbar mit dem anderer CblC-Patienten ohne Δ Ex2-Spleißmutationen.

Insgesamt muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass das PLA keinen Nachweis einer direkten Proteininteraktion liefert, sondern eine sehr enge räumliche Nähe der beiden Proteine von < 40 nm nachweist. Dies ist im Vergleich zur Koimmunopräzipitation einerseits von Vorteil, da sehr schwache Interaktionen nachweisbar bleiben und nicht durch Aufreinigungsprozeduren gelöst werden. Andererseits kann eine enge räumliche Lokalisation zweier Proteine auch durch ein weiteres Protein oder einen Proteinkomplex vermittelt sein.

Die Arbeitsgruppe um Bassila (2017) stellte die Hypothese auf, dass die verschiedenen Prozessierungsschritte, die das Cbl durchlaufen muss, um als aktiver Kofaktor der MS fungieren zu können, nicht als stufenförmiger Prozess mit der Aneinanderreihung unterschiedlicher Proteininteraktionen anzusehen ist. Vielmehr seien sie als Prozesse zu verstehen, die innerhalb eines multifunktionalen Interaktoms ablaufen. Den Kern dieses Interaktoms bilde die MS, welche Interaktionen mit der MSR, MMACHC und MMADHC eingehe (Bassila et al., 2017).

Folgt man der Idee eines MS-Interaktoms so könnte die Interaktion des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit einem der interaktombildenden Proteine ein positives Signal mit den übrigen Elementen erzeugen, ohne dass hier eine direkte Protein-Protein-Interaktion vorläge. Zur Prüfung von direkten Interaktionen ist die ergänzende Durchführung einer Koimmunopräzipitation notwendig.

Eine der Stärken des PLAs liegt in der *in situ* Untersuchung nativer Proteine in ihrer physiologischen Umgebung. Aufgrund der fehlenden endogenen Expression des trunkierten Proteins musste in den vorliegenden Untersuchungen jedoch auf die Überexpression des Δ Ex2-MMACHC-Proteins zurückgegriffen werden. Zur Annäherung an stöchiometrische Bedingungen, sowie zur Vergleichbarkeit von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen, wurden zudem die potentiellen Interaktionspartner und das wt-MMACHC-Protein im Zellmodell überexprimiert.

Hierdurch wurden die Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine künstlich erhöht, was den natürlichen Gegebenheiten nicht gerecht wird.

Eine weitere Limitation stellt die rein visuelle Auswertung der gewonnenen Fluoreszenzsignale dar. Durch die standardisierte Bildaufnahme und dem Vergleich mehrere Bilder durch verschiedene Personen wurde eine weitgehend objektive Auswertung gewährleistet. Die berichteten Unterschiede in der Signalstärke von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen mit MMADHC und MSR hoben sich dabei visuell deutlich voneinander ab.

Trotz der methodischen Einschränkungen liefern die Fluoreszenzsignale im PLA erste Hinweise darauf, dass das Δ Ex2-MMACHC-Protein die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen des Cbl-Stoffwechsels nicht gänzlich eingebüßt hat. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass durch den Verlust des 2. Exons ein großer Bestandteil des Core-MMACHC-Proteins verloren geht (vgl. Abb. 23).

Inwiefern die nachgewiesene enge räumliche Beziehung zu den Interaktionspartnern ABCD4, LMBD1, MMADHC, MS und MSR auch eine erhaltende Funktionalität des Δ Ex2-MMACHC-Proteins widerspiegelt, bleibt dabei Gegenstand weiterer Forschungen.

Die 3D-Modellierung des MMACHC-Proteins in Abbildung 23 zeigt in Hellgrün Bereiche, für die das 2. Exon kodiert. Erkennbar ist, dass das 2. Exon an der Bindung von Cbl beteiligt ist, wenngleich es nicht für den Hauptteil der Cbl-bindenden Tasche kodiert. Durch den Verlust des 2. Exons gehen große Teile des Core-MMACHC-Proteins verloren sowie bestimmte Bereiche, die an der Bindung von Cbl beteiligt zu sein scheinen.

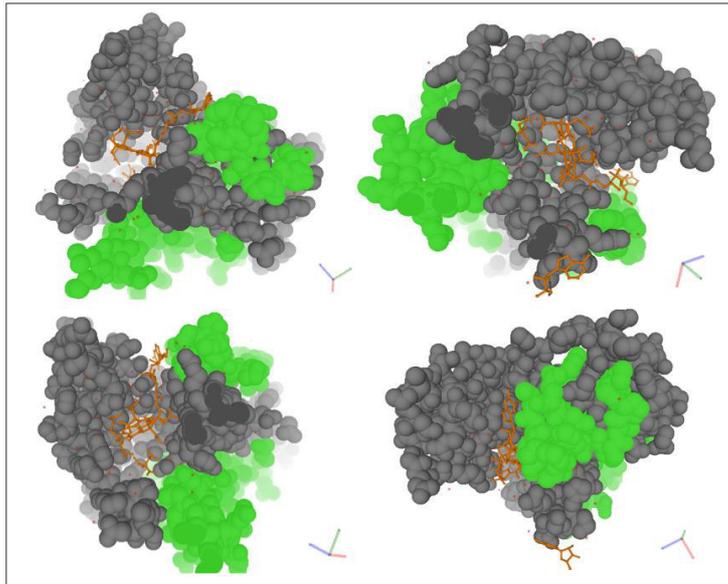


Abbildung 23: 3D-Modellierung des MMACHC-Proteins. In Hellgrün dargestellt sind die Bereiche, für die das 2. Exon kodiert (Spacefill Representation). Graue Bereiche zeigen das übrige MMACHC-Protein. In Ball & Stick Representation in Orange ist das gebundene Adenosylcobalamin gezeigt. Die vier Aufnahmen zeigen das MMACHC-Protein aus jeweils unterschiedlichen Blickwinkeln. Zur Orientierung der Rotationsposition dienen die drei farblich markierten Achsen des Koordinatensystems. Das Bild wurde erstellt mit RCSB PDB (rcsb.org) PDB 3SOM. Froese et al., 2012.

4.3. Disulfidbrückenbildung

Eine überraschende Entdeckung stellt die starke Tendenz des Δ Ex2-MMACHC-Proteins zur Dimerbildung dar. Durch den Verzicht auf reduzierende Thiolverbindungen wie DTT oder β -Mercaptoethanol im Ladepuffer von Proteinproben konnte eine starke Ausbildung von Disulfidbrücken für das Δ Ex2-MMACHC-Protein nachgewiesen werden.

Disulfidbrücken sind kovalente Bindungen, die durch Oxidation von Thiolgruppen zweier Cysteinreste entstehen. Sauerstoff, oxidiertes Glutathion, Flavin-Kofaktoren, sowie andere Disulfide stellen dabei die gängigen Redoxpartner dar (Bechtel & Weerapana, 2017). Die Formation von zytoplasmatischen Disulfiden ist aufgrund des reduzierenden Milieus des Zytoplasmas ungewöhnlich (Saaranen & Ruddock, 2013). So verwundert es nicht, dass sich weder eine Disulfidbrückenbildung zwischen zwei wt-MMACHC-Proteinen, noch eine Disulfidbrücken-vermittelte Heterodimerbildung von wt- und Δ Ex2-MMACHC-Proteinen im Western Blot nachweisen ließ. Auch in der Literatur gibt es keinen Hinweis darauf, dass das wt-MMACHC-Protein Disulfidbrücken zur Homodimerisierung ausbildet.

Im Gegensatz dazu lieferten die Ergebnisse des PLAs deutliche Belege für eine Homodimerbildung aus wt/wt-MMACHC und $\Delta\text{Ex2}/\Delta\text{Ex2}$ -MMACHC und wiesen zudem auf eine wt-/ ΔEx2 -MMACHC-Heterodimerbildung hin. Da der PLA eine enge räumliche Beziehung zweier Proteine unabhängig von der Art der Bindung nachweist, stehen diese Befunde nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Western Blot Analysen. Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse folglich dafür, dass das wt-MMACHC-Protein sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit ΔEx2 -MMACHC-Proteinen ausbildet, dabei jedoch kovalente Bindungen in Form von Disulfidbrücken keine Rolle spielen.

Beim wt-MMACHC-Protein erleichtert die nicht-kovalente Homodimerbildung die Entfernung des Alkyliganden am Cbl. Außerdem kommt es in Anwesenheit von FMN zu einer erhöhten Bildung von Dimeren; eine Beobachtung, die auf eine Erleichterung der FMN/FADH-abhängigen Decyanierungsreaktion hindeutet (Froese et al., 2012). Nach der erfolgreichen Prozessierung des Cbl-Derivats verschiebt sich das Gleichgewicht weg von der Bildung von MMACHC-Dimeren hin zur Formierung von MMACHC-MMADHC-Heterodimeren (Froese et al., 2015).

In den durchgeführten Western Blot Untersuchungen fällt neben der starken Tendenz des ΔEx2 -MMACHC-Proteins zur Dimerisierung eine weitere ΔEx2 -MMACHC-Protein enthaltende Bande bei ca. 100 kDA auf, die auf eine Multimerbildung des trunkierten Proteins hinweist. Ob es sich um reine ΔEx2 -MMACHC-Multimere oder um gemischte Disulfide handelt, bleibt bisher offen. Eine Beteiligung des MMADHC-Proteins in Form einer Disulfidbrücken-vermittelten Heterodimer- oder Multimerbildung konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Wie in Abschnitt 3.10. geschildert, geben die Ergebnisse des PLA Anlass zu Annahme einer gestörten Interaktion des MMADHC-Proteins mit dem ΔEx2 -MMACHC-Protein. Physiologisch bindet MMADHC über einen Schwefelliganden das durch MMACHC prozessierte und gebundene Cob(II)alamin, wodurch es zur Formation eines Thiolat-Cob(III)alamins kommt (Li et al., 2020). Die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei ΔEx2 -MMACHC-Proteinen könnte die funktionelle Dimerbildung, wie sie für das wt-MMACHC-Protein beschrieben ist, beim ΔEx2 -MMACHC-Protein stören. Da es sich bei Disulfidbrücken um kovalente Bindungen handelt, diese folglich nur unter aufwändigen enzymatischen Reduktionen wieder lösbar sind, liegt die Vermutung

nahe, dass weniger monomeres Δ Ex2-MMACHC-Protein für die Heterodimerbildung mit MMADHC zur Verfügung steht. Die erhaltenen wenigen Fluoreszenzsignale sprechen jedoch auch dafür, dass zumindest ein Teil der Δ Ex2-MMACHC-Proteine fähig ist, eine enge räumliche Beziehung zu dem MMADHC-Protein herzustellen. Zusammenfassend könnte also die Dimerisierung der Δ Ex2-MMACHC-Proteine eine Heterodimerbildung mit MMADHC unterbinden, verbleibende Δ Ex2-MMACHC-Monomere jedoch zur Interaktion mit MMADHC befähigt bleiben.

Eine funktionstüchtige Decyanierung und Dealkylierung von Cbl-Derivaten durch MMACHC-Monomere kann nicht ausgeschlossen werden, wenngleich diese weitaus weniger effizient ablaufen dürfte (Froese et al., 2012; Kim et al., 2008). Somit kann auch über die residualen katalytischen Fähigkeiten der Δ Ex2-MMACHC-Dimere nur spekuliert werden.

Auch wenn die Funktionalität der Δ Ex2-MMACHC-Dimere nicht abschließend geklärt werden kann, so bleibt die starke Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Δ Ex2-MMACHC-Proteinen bemerkenswert. Im physiologischen Zustand stellt das Zytoplasma ein stark reduzierendes Milieu dar, welches die Bildung von Disulfidbrücken verhindert und dessen Aufbrechen begünstigt (Saaranen & Ruddock, 2013). Die Bildung von Disulfiden spielt sich daher innerhalb eukaryontischer Zellen vor allem während der Translation im Lumen des ER ab und ist folglich typisch für sekretorische, sowie membranständige Proteine. Die oxidierende Umgebung des ERs erlaubt dabei die enzymkatalysierte Faltung und Einführung von Disulfidbrücken (Sevier & Kaiser, 2002).

Ob es zur Oxidation der Cysteinreste kommt, ist abhängig vom Redoxpotential des Proteins und dessen unmittelbaren Umgebung. Das zytosolische Redoxpotential wird v.a. durch das Verhältnis von oxidierten zu reduzierten Glutathion bestimmt (Piotukh, Kosslick, Zimmermann, Krause, & Freund, 2007).

Bei oxidativen Stress kann es im Zytoplasma zur spontanen Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Thiolgruppen zweier Cysteinreste innerhalb eines Proteins oder zwischen Proteinen kommen (Saaranen & Ruddock, 2013). Die Oxidation führt dabei zu einer Konformationsänderung des betroffenen Proteins (Piotukh et al., 2007).

Eine erhöhte Produktion von intrazellulären ROS, einhergehend mit erhöhtem oxidativen Zellstress, wurde bereits im Zellmodell für die CblC beschrieben (Richard et al., 2009).

Einige Autoren führen die erhöhte ROS Produktion dabei auf eine mitochondriale Dysfunktion mit Beeinträchtigung der Atmungskette zurück, basierend auf Befunden aus dem Maus- (*mut^{-/-}*), bzw. Rattenmodell und Patienten mit MMA (Brusque et al., 2002; Chandler et al., 2009). Andere Autoren weisen auf die pathophysiologische Rolle der erhöhten Homocysteinwerte hin, welche eine enge Verknüpfung mit ROS-induzierten Endothelschäden aufweisen (Perna et al., 2003).

Unabhängig vom Ursprung des oxidativen Zellstresses bei CblC-Erkrankungen bilden erhöhte ROS-Werte einen Erklärungsansatz für die intrazelluläre Ausbildung von Disulfidbrücken durch das Δ Ex2-MMACHC-Protein.

4.4. Einfluss von Cobalamin

In der Literatur zur Therapie der CblC-Erkrankung herrscht weitgehend Einigkeit darüber, dass parenteralem OH-Cbl dem Vorzug vor anderen Cbl-Derivaten gegeben werden soll. Dies spiegelt sich auch in der Literaturrecherche wider, in der zu 92,5 % nach Diagnosestellung eine parenterale Therapie mit OH-Cbl eingeleitet wurde.

CN-Cbl wird aufgrund theoretischer Überlegungen und Praxiserfahrungen keine Effektivität nachgesagt (Andersson & Shapira, 1998; Kim et al., 2008; Mellman & Willard, 1979; Rosenblatt et al., 1997). Argumentiert wird, dass in einem defekten MMACHC-Protein die katalytische Decyanierung nicht stattfinden könne und so CN-Cbl nicht in das Zwischenprodukt Cob(II)alamin umwandelbar sei, das für die Synthese der aktiven Kofaktoren Me-Cbl und Ado-Cbl erforderlich ist (Carrillo-Carrasco et al., 2012; Kim et al., 2008).

Die Anreicherung der Nährmedien von HepG2-Zellen mit CN-Cbl bewirkte in unseren Untersuchungen demgegenüber eine erhebliche Stabilitätszunahme des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit einer Verlängerung der HWZ des trunkierten Proteins in seiner monomeren Form von 6,38 h auf 9,21 h und der Δ Ex2-Dimere von 7,35 h auf 10,55 h. Etwas geringer profitierte das Δ Ex2-MMACHC-Protein von der

Supplementation von OH-Cbl, jedoch auch hier wurde eine Zunahme der HWZ von 6,38 h auf 7,31 h (Monomere), bzw. 7,35 h auf 8,98 h (Dimere) beobachtet.

Folglich ist davon auszugehen, dass die Fähigkeit zur Bindung von CN-Cbl und OH-Cbl beim Δ Ex2-MMACHC-Protein erhalten geblieben ist und eine Stabilisierung des trunkierten Proteins bewirkt.

Bestärkt wird diese Interpretation durch die immunozytologischen Befunde. Hier zeigte sich eine stark erhöhte proteasomale Lokalisation des Δ Ex2-MMACHC-Proteins im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein. Durch Anreicherung des Nährmediums mit CN-, bzw. OH-Cbl konnte eine Abnahme der proteasomalen Lokalisation des Δ Ex2-MMACHC-Proteins beobachtet werden. Diese stellte sich besonders deutlich in Anwesenheit von CN-Cbl dar. Die hohe intrazelluläre Verfügbarkeit von CN-Cbl scheint das Δ Ex2-MMACHC-Protein in einem Ausmaß zu stabilisieren, das die Degradierung des mutierten Proteins durch das Proteasom sichtbar hinauszögert.

Die ebenfalls beobachtete verstärkte lysosomale Lokalisation des Δ Ex2-MMACHC-Proteins unter CN-Cbl Therapie ist vermutlich der erhöhten Stabilität des trunkierten Proteins zuzuschreiben, die es ihm ermöglicht das Lysosom anzusteuern, um eintreffende Cbl-Derivate entgegenzunehmen.

Eine Limitation stellte die rein visuelle Auswertung der immunozytologischen Studien dar. Durch eine standardisierte Bildaufnahme und den Vergleich mehrerer unabhängiger Aufnahmen wurde jedoch eine objektive Bewertung der Bilder weitgehend sichergestellt.

Die Forschergruppe um Froese arbeitete in ihren Untersuchungen zur Thermostabilität des MMACHC-Proteins die entscheidende Rolle einer effektiven Bindung des Cbls an das MMACHC-Protein für die Stabilisierung des Proteins heraus und wies auf den Zusammenhang der Bindungsfähigkeit der Mutanten mit dem Therapieerfolg einer Cbl-Therapie hin (Froese, Zhang, Healy, & Gravel, 2009; Froese et al., 2010, 2012): So scheinen bestimmte Mutationen experimentell gut auf eine Cbl-Substitution anzusprechen. Andere, wie die mit einem early-onset assoziierte G147D, profitierte weder von einer Verabreichung von OH-Cbl noch CN-Cbl, was durch die verlorengegangene Fähigkeit zur Cbl-Bindung und die damit einhergehende Instabilität des Mutanten erklärt wird (Froese et al., 2009, 2010).

Auch Gherasim und Kollegen betonten die Bedeutung der Bindungsfähigkeit von Cbl-Derivaten durch die MMACHC-Mutante. Sie beschreiben zwei Punktmutationen an Arg-161. Die Substitution des Arginins durch Glycin (R161G) ging mit einem erheblichen Stabilitätsverlust einher und war mit einem early-onset der CblC assoziiert. Die Substitution durch Glutamin (R161Q) hingegen wies eine erhöhte Stabilität auf und war mit einem late-onset assoziiert (Froese et al., 2012; Gherasim et al., 2015).

Die Fähigkeit eines MMACHC-Mutanten zur Bindung von Cbl und die damit einhergehende Stabilisierung des mutierten Proteins ist folglich entscheidend für die nachfolgende katalytische Prozessierung des Cbls und bestimmt maßgeblich den Ausprägungsgrad der Erkrankung.

Gleichzeitig kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die erhaltene Bindung von Cbl an das MMACHC-Protein zwangsläufig mit einer erhaltenen Fähigkeit zur Stabilisierung der base-off Form und konsekutiver Prozessierung des Cbl-Derivats einhergeht.

Experimentell konnte van Hove zeigen, dass Träger einer Δ Ex2-Spleißmutation von einer OH-Cbl Therapie profitieren. Er beschreibt zwei Patienten mit late-onset CblC und rTMA mit dem Genotyp *c.82-9_82-12del/c.271dupA*. Untersuchungen an Fibroblasten dieser zwei Patienten zeigten höhere Methioninkonzentrationen als für den Durchschnitt der CblC-Patienten zu erwarten. Eine Beobachtung, die für eine funktionierende Remethylierung von Homocystein zu Methionin spricht und mit dem späten Erkrankungsbeginn sowie der mildereren Symptomatik der Δ Ex2-Spleißmutationsträger im Einklang steht. Zudem konnten die Methioninkonzentrationen bereits durch eine geringe Supplementierung von OH-Cbl bedeutsam erhöht werden und zeigten einen proportionalen Anstieg mit der Konzentration an zugeführten OH-Cbl (Van Hove et al., 2002).

Dies bestätigt, dass das OH-Cbl von Δ Ex2-Spleißmutationsträgern in Me-Cbl umgewandelt und der MS zur Verfügung gestellt werden kann.

Ungeklärt bleibt jedoch, wie das OH-Cbl in Cob(II)alamin überführt wird und welche Rolle dem MMACHC-Protein dabei zukommt. Obeid und Kollegen gehen davon aus, dass die schwache Bindung der OH-Gruppe an das Cobaltion einen unspezifischen Weg neben der gezielten Prozessierung durch das MMACHC-Protein einschlagen

kann. Sie postulieren, dass möglicherweise eine Glutathion-abhängige Reduktion des Cbls stattfindet, gefolgt von einer graduellen Oxidation, bei der auch das gewünschte Cob(II)amin entsteht (Obeid et al., 2015).

Dereven'kov und Kollegen konnten zeigen, dass an MMACHC gebundenes H₂O-Cbl in Anwesenheit von NADH und Riboflavin tatsächlich in Cob(II)alamin umgewandelt werden kann. Die Bereitstellung von Cob(II)alamin ist dabei unabhängig von einer funktionierenden Decyanierung oder Dealkylierung durch das MMACHC-Protein und könnte das Ansprechen von CblC-Patienten auf eine Therapie mit OH-Cbl, trotz funktionsloser katalytischer Aktivität von MMACHC erklären (Dereven'kov et al., 2020).

Dieser unspezifische Weg zeichnet sich allerdings durch eine geringe Effektivität aus mit der Notwendigkeit einer hohen intrazellulären Konzentration von OH-Cbl, um die benötigte Menge an Cob(II)amin zu generieren. Bei gesunden Menschen stellt dieser Weg somit wahrscheinlich eine zu vernachlässigende Menge an Cob(II)alamin bereit. Bei Patienten mit Störungen des intrazellulären Cbl-Stoffwechsels, bei denen eine überdurchschnittliche Supplementierung von OH-Cbl vorgenommen wird, scheint er jedoch so effektiv zu sein, dass der MS und MCM eine ausreichende Menge der benötigten Kofaktoren zur Verfügung gestellt werden können.

Die erhöhte Stabilität des ΔEx2-MMACHC-Proteins durch die Supplementierung von CN-Cbl im Vergleich zu OH-Cbl, die in drei unterschiedlichen Zelllinien (HEK293, HepG2, COS-7), sowohl im Western Blot als auch in immunozytologischen Untersuchungen beobachtet werden konnten, legt eine erhaltene Bindungsfähigkeit des ΔEx2-MMACHC-Proteins von CN-Cbl nahe.

Unklar ist, inwiefern die Fähigkeit zur Bindung auch mit einer erhaltenden Decyanierungsaktivität einhergeht. Für eine zumindest teilweise funktionierende Decyanierung spricht das Ansprechen von sechs Patienten mit ΔEx2-Spleißmutation auf eine Therapie mit CN-Cbl. Drei chinesische Patienten zeigten unter Verabreichung von i.m. CN-Cbl eine schnelle und deutliche Verbesserung, v.a. der pulmonalen Symptomatik bis hin zur völligen Remission im 3-Jahres Follow-up bei einer Patientin (Liu et al., 2017b).

Zudem wurde ein 18-jährigen Jungen mit dem Genotyp *c.14_24del/c.276G>A* erfolgreich mit CN-Cbl p.o. therapiert. Die orale Gabe erfolgte, da ein erhöhtes Blutungsrisiko durch eine parallele Behandlung mit einem niedermolekularen Heparin erwartet wurde und somit eine parenterale Cbl-Gabe vermieden werden sollte. Diese ungewöhnliche Behandlung führte unerwartet zu einer Normalisierung des pulmonal-arteriellen Drucks und einer annähernd vollkommenen Normalisierung der Stoffwechselfparameter (Kömhoff, unveröffentlichte Daten).

Tatsächlich wurden Mutationen mit unterschiedlichen Lokalisationen im MMACHC-Gen bereits mit Einschränkungen nur einer der beiden Aktivitäten in Verbindung gebracht: eine MMACHC-Mutation im 4. Exon (Arg161) zeigte im Experiment eine geringere Dealkylierungsaktivität bei erhaltener Fähigkeit zur Decyanierung (Gherasim et al., 2015).

Diese Erkenntnisse bringen das Paradigma einer alleinigen Wirksamkeit von OH-Cbl in der CblC-Therapie ins Wanken. Das kostengünstige CN-Cbl wird häufig in der Therapie eines alimentären Vitamin B₁₂-Mangels eingesetzt und ist somit gut erprobt (Langan & Zawistoski, 2011). Ein Vorteil der Therapie mit CN-Cbl stellt seine orale Verabreichbarkeit dar, wodurch das kompliziertere Handling mit dem erhöhten Risiko einer Stichverletzung, sowie die kutanen Nebenwirkungen einer langfristigen parenteralen Verabreichung umgangen werden (Oh & Brown, 2003). Dies könnte zu einer erhöhten Compliance der Patienten beitragen.

4.5. Einfluss von Homocystein

Interessanterweise reagierten wt-MMACHC und Δ Ex2-MMACHC-Proteine unterschiedlich auf eine Anreicherung des Nährmediums mit Homocystein.

Erwartungskonform zeigte das wt-MMACHC-Protein eine signifikante Abnahme der Proteinmenge unter steigenden Homocysteinkonzentrationen. Das Δ Ex2-MMACHC-Protein hingegen wurde durch den Zusatz von 100 μ M Homocystein stabilisiert. Auch Konzentrationen von 200 μ M riefen keinen signifikanten Rückgang der detektierbaren Menge an Δ Ex2-MMACHC-Protein im Vergleich zum Normalmedium hervor. Dies ist bemerkenswert, da nachweislich eine erhöhte Zelltoxizität vom höher

konzentrierten Homocystein ausging. Die Homocysteinkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sie mit den Plasmawerten von CbIC-Patienten vergleichbar sind. Insgesamt erwiesen sich Δ Ex2-MMACHC-Dimere als etwas robuster als die monomere Form.

Homocystein weist wie Cystein eine Sulfhydrylgruppe auf. Durch Oxidation kann Homocystein eine Disulfidbrücke an eine weitere Sulfhydrylgruppe eines anderen Proteins oder eines weiteren Homocysteins ausbilden (Perna et al., 2003). So liegt im sauerstoffreichen Blut >99% des Homocysteins als Disulfid vor. Meist in Form eines gemischten Disulfids an Albumin gebunden. Innerhalb einer gesunden Zelle hingegen ist Homocystein fast ausschließlich in seiner reduzierten Form nachweisbar (Blom, 2000).

Erhöhte Homocysteinwerte können über zwei Wege die Proteine innerhalb einer Zelle direkt schädigen. Einerseits verfügt das Homocystein über die Fähigkeit zur N-Homocysteinilierung. Hierbei bindet Homocystein an Lysinreste von Proteinen unter Ausbildung eines Thiolactonrings und acyliert in einem weiteren Schritt die freie Aminogruppe. Bei hohen Homocysteinwerten kann dies zur Multimerisation und Präzipitation des Proteins führen (Jakubowski, 1999).

Andererseits kann es durch Erschöpfung der Reduktionskapazität innerhalb einer Zelle zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Homocystein und den Cysteinresten eines Proteins kommen. Dies wird auch als S-Homocysteinilierung bezeichnet (Jakubowski, 2013; Perna et al., 2003). Abbildung 24 veranschaulicht die zwei Wege der Homocysteinilierung von Proteinen.

Proteine mit Homocysteinbindungen verlieren ihre biologische Funktion und werden für die zytotoxischen, pro-inflammatorischen, -thrombotischen, und -atherosklerotischen sowie neuropathischen Auswirkungen erhöhter Homocysteinwerte mit verantwortlich gemacht (Jakubowski, 2019).

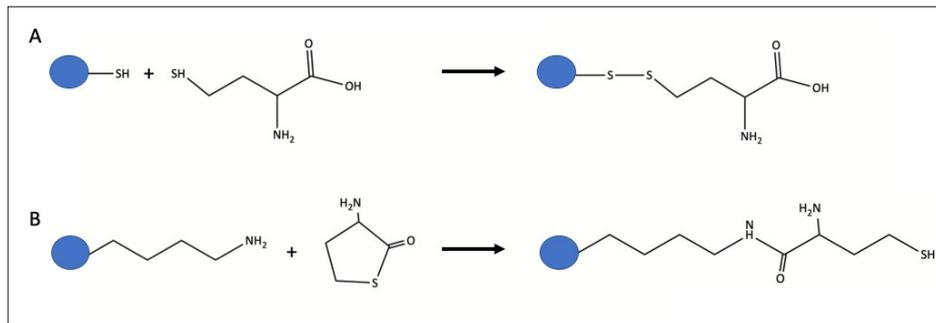


Abbildung 24: Homocysteinilierung von Proteinen. **A** S-Homocysteinilierung: Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den SH-Gruppen von Homocystein und dem Cysteinrest eines Proteins. **B** N-Homocysteinilierung: Anlagerung des Homocystein-Thiolactons an ein Lysinrest eines Proteins. Das acylierte Protein enthält eine neue, reaktive Thiolgruppe. Grafik erstellt mit ChemDraw und Microsoft PowerPoint. Abbildung in enger Anlehnung an: Zinellu et al., 2017

Die Ergebnisse zum Einfluss von Homocystein deuten darauf hin, dass moderate Homocysteinerhöhungen das trunkierte Protein sowohl in seiner monomeren als auch dimeren Form stabilisieren.

Eine direkte Bindung von Homocystein an das Δ Ex2-MMACHC-Protein über S- oder N-Homocysteinilierung wäre vorstellbar. So verfügt das Δ Ex2-MMACHC-Protein über neun Lysinreste und drei Cysteinreste.

Durch die veränderte Konformation des trunkierten Proteins ist eine exponierte Lage der Cysteinreste denkbar, die die Bildung eines gemischten Disulfids mit Homocystein ermöglicht. Bereits 1962 beobachteten zwei israelische Wissenschaftler, dass Homocystein in der Gegenwart von OH₂-Cbl oxidiert wird und auch andere Sulfhydrylgruppen zur Disulfidbildung in Anwesenheit von OH₂-Cbl neigen (Aronovitch & Grossovitch, 1962).

Neben der möglichen Bindung von Homocystein könnte die erhöhte Stabilität des Δ Ex2-MMACHC-Proteins auch indirekt durch das Homocystein vermittelt werden: hohe intrazelluläre Homocysteinwerte führen auf unterschiedlichen Wegen zu einer erhöhten ROS-Produktion innerhalb der Zellen (vgl. Lawrence De Koning et al., 2003; Richard et al., 2018). In einem gewissen Umfang können vermehrt anfallende ROS durch Glutathion abgefangen werden. Wird die Reduktionskapazität der Zelle überschritten, kommt es zu oxidativem Stress und schließlich zu irreversiblen Zellschädigungen (Pastore, Federici, Bertini, & Piemonte, 2003).

Die oxidative Umgebung müsste zudem die Disulfidbrückenbildung zwischen zwei ΔEx2 -MMACHC-Proteinen fördern und könnte so zu der beobachteten Stabilisierung des trunkierten Proteins beitragen. Für diese Theorie spricht, dass die Dimere etwas stärker unter der Homocysteinsupplementation zunahmten als die Monomere. Die erhöhten Werte der Monomere könnten dabei durch die prozedurbedingte Aufspaltung einiger Disulfidbrücken während der Probenvorbereitung (z.B. zehnmütiges Erhitzen auf 95°C) sowie durch den Einfluss von SDS in der Gelelektrophorese erklärt werden.

4.6. Oxidativer Stress und ΔEx2 -Spleißmutationen

Eine interessante Beobachtung machten Richard und Kollegen (2009) in ihren Untersuchungen zur Rolle von oxidativem Stress auf unterschiedlichen MMACHC-Mutationen. Alle neun untersuchten Mutationen führten zu einem signifikanten Anstieg an ROS und der Apoptoserate in den betroffenen Zellen. Eine Mutation stach dabei besonders hervor: Die intronische Mutation *c.81+2T>G* wies eine weitaus höhere Produktion von ROS auf als die übrigen acht. Zudem antworteten die Zellen mit der *c.81+2T>G* Mutation auf die erhöhten ROS-Werte mit einem Anstieg der Mangan Superoxiddismutase (MnSOD). Dieser mitochondriale Marker für oxidativen Zellstress verhindert eine Zellschädigung durch Sauerstoffradikale, indem es O_2^- in H_2O_2 umwandelt. Nur die *c.81+2T>G*-Mutation ging dabei mit einer H_2O_2 -Überproduktion einher, die nicht durch die Aktivität anderer antioxidativer Enzyme ausgeglichen wurde (Richard et al., 2009). Die *c.81+2T>G*-Mutation wurde in der Studie erstmalig beschrieben und ist aufgrund ihrer Lage und ihrer Vorhersage als Spleißdonorstelle sehr wahrscheinlich ebenfalls den ΔEx2 -Spleißmutationen zuzuordnen (*National Center for Biotechnology Information. ClinVar [VCV000556899.1]*).

Gherasim und Kollegen beschreiben einen Mechanismus, der die Unterschiede in der ROS-Produktion von verschiedenen MMACHC-Mutationen zu erklären vermag. Sie beobachteten eine unerwartete Stabilitätserhöhung von Cob(II)alamin unter aeroben Bedingungen für die MMACHC-Punktmutation R161Q. Die Stabilisierung ging mit einer hohen Rate an oxidierten Glutathion einher. Die Autoren erklärten ihre

Beobachtungen mit der Entstehung eines Redoxsubstratzyklus (*futile redox cycling*), bei dem das Cobaltatom zwischen den Oxidationsstufen +2 und +3 wechselt. Dies bewirke einerseits eine Stabilisierung des Cob(II)alamins, führe aber andererseits zu einer erhöhten Oxidation von Glutathion zu Glutathiondisulfid mit konsekutiver Abnahme der Reduktionskapazität der Zelle. Dieser Weg werde durch das wt-MMACHC-Protein unterdrückt, um die Zelle vor erhöhtem oxidativen Stress zu schützen (Gherasim et al., 2015).

Betrachtet man die Bereiche, für die das 2. Exon des MMACHC-Proteins kodiert (vgl. 3D-Modellierung des MMACHC-Proteins in Abbildung 23), so erscheint eine fehlende oxidative Abschirmung des Cbls sowie die Ausbildung eines Redoxsubstratzyklus bei einem Verlust jener MMACHC-Bereiche denkbar.

Für einen besonders stark ausgeprägten Redoxsubstratzyklus bei Δ Ex2-MMACHC-Proteinen sprechen die berichteten hohen ROS-Konzentrationen aus der potentiellen Δ Ex2-MMACHC-Spleißmutation *c.81+2T>G* (Richard et al., 2009).

Ein fehlender Schutzmechanismus des trunkierten Proteins zur Verhinderung der Oxidation des Cbls kann erklären, wie es zur zytoplasmatischen Ausbildung von Disulfidbrücken durch das Δ Ex2-MMACHC-Protein kommt. Auch die Stabilisierung des trunkierten Proteins unter Homocysteineinfluss könnte auf die Bildung eines gemischten Disulfids zurückgeführt werden. Ebenso könnten Homocystein indirekt durch die verstärkte ROS-Produktion die Ausbildung eines Redoxsubstratzyklus am Δ Ex2-MMACHC-Protein verstärken.

Beide Wege gehen mit einem Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentrationen und konsekutiv erhöhtem oxidativen Zellstress einher und liefern so einen Erklärungsansatz für die Pathogenese der für Δ Ex2-Spleißmutationensträgern charakteristischen renalen und pulmonalen Vaskulopathien.

4.7. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit dokumentieren die enge Verknüpfung von Δ Ex2-Spleißmutationen im MMACHC-Gen mit dem Auftreten renaler und pulmonaler Vaskulopathien und liefern erste Einsichten in die Pathophysiologie des Δ Ex2-MMACHC-Proteins, welche die Grundlage für ein tieferes Verständnis der ausgeprägten Genotyp-Phänotyp-Assoziation bilden.

Neben dem erheblichen Stabilitätsverlust des trunkierten MMACHC-Proteins im Vergleich zum Wildtyp ist hierbei die starke Tendenz des trunkierten Proteins zur Ausbildung von Disulfidbrücken zu nennen.

Die pathophysiologische Relevanz der disulfidbrücken-vermittelten Dimerbildung könnte einerseits in einer eingeschränkten Fähigkeit zur Ausbildung von Heterodimeren mit dem MMADHC-Protein und MSR-Protein liegen. Andererseits liegt ein Zusammenhang mit dem beobachteten erhöhten oxidativen Zellstress bei CblC-Patienten nahe.

Für zukünftige Forschungsbestreben ist die experimentelle Prüfung weiterer potentieller Δ Ex2-Spleißmutationen, wie der *c.80A>G*, *c.81+1A>G* und *c.81+2T>G* anzudenken. Hier bietet sich der Einsatz eines Minigene Splice Assays an.

Zudem sollte der Etablierung einer Zellreihe mit endogen exprimiertem Δ Ex2-MMACHC-Protein hohe Priorität zukommen. Die stabile Expression des trunkierten Proteins unter Abwesenheit des endogenen wt-MMACHC-Proteins ermöglicht eine präzise Beurteilung des Interaktionsverhaltens des Δ Ex2-MMACHC-Proteins mit weiteren Proteinen des intrazellulären Cbl-Stoffwechsels. Zudem kann eine erhöhte Validität in der Abschätzung der therapeutischen Effekte einer Cbl-Therapie in einer solchen Zelllinie erreicht werden.

Die Untersuchung von genetischen Untergruppen der CblC-Erkrankung erweitert das Verständnis der großen interindividuellen Heterogenität der Krankheitsausprägung und weist auf neue individuelle Behandlungsoptionen hin.

Die experimentell ermittelte deutliche Stabilitätszunahme des Δ Ex2-MMACHC-Proteins unter CN-Cbl Supplementation deckt sich mit dem positiven Ansprechen von vier Δ Ex2-Spleißmutationsträgern auf eine Therapie mit CN-Cbl. Die eindruckliche Symptomverbesserung der Patienten gibt Anlass zur Annahme einer zumindest

teilweise erhaltenen Fähigkeit zur Decyanierung von CN-Cbl durch das trunkierte Protein. Die Erkenntnisse stellen den Grundsatz der alleinigen Wirksamkeit einer parenteralen OH-Cbl Therapie bei allen CblC-Patienten, unabhängig von der berichteten Mutation, in Frage. Eine möglicherweise erhaltene Decyanierungsaktivität wirft darüber hinaus die Frage auf, ob bereits geringere Konzentrationen an CN-Cbl im Vergleich zu OH-Cbl für eine effiziente Therapie ausreichen.

Für zukünftige Forschungsbestreben ist die Durchführung eines Stoffwechsellassays an Patientenfibroblasten mit Δ Ex2-Spleißmutation oder einer Zelllinie, die das Δ Ex2-MMACHC-Protein stabil exprimiert, von zentraler Bedeutung. Durch Inkubation der Zellen mit CN-Cbl und Bestimmung der Menge hergestellten Methionins lassen sich direkt Rückschlüsse auf die Decyanierungsfähigkeit des trunkierten Proteins ziehen. Diese Erkenntnisse können die Grundlage für eine neuartige und möglicherweise effektivere Therapie von Δ Ex2-Spleißmutationsträgern mit CN-Cbl liefern. Die orale Applikationsform des CN-Cbls bietet dabei naheliegende Vorteile wie die Reduktion von injektionsbedingten Nebenwirkungen und die Erhöhung der Patientencompliance. Im Rahmen einer individualisierten Therapie gilt es zudem weitere MMACHC-Mutationen zu identifizieren, die von einer solchen Therapie profitieren können.

Eine weitere therapeutische Konsequenz leitet sich aus den Überlegungen zum Einfluss von oxidativem Stress auf die Δ Ex2-Spleißmutationen ab: hier sollte der therapeutische Einsatz von antioxidativen Medikamenten, wie beispielsweise Vitamin C und E auf eine mögliche Reduktion renaler und pulmonaler Endothelschäden erprobt werden.

Richard und Kollegen (2009) wiesen in ihrer Studie zur Rolle von oxidativem Stress bei MMACHC-Mutationen bereits auf die möglichen positiven Effekte einer antioxidativen Therapie hin. So wurden Wirksamkeitsbelege einer antioxidativen Therapie bei hohen intrazellulären Homocysteinkonzentrationen im Zellmodell bereits berichtet: Die Behandlung von HUVEC-Zellen mit dem starken Antioxidanz Catechin und dem Vitamin E Analogon Trolox führte zur Verringerung der ROS-

Produktion und einem Schutz vor Homocystein-induzierten Endothelschäden (Perez-De-Arce, Foncea, & Leighton, 2005).

Vertiefende Untersuchungen zur Rolle von oxidativem Stress auf das Δ Ex2-MMACHC-Protein sowie protektive Effekte einer antioxidativen Therapie scheinen einen vielversprechender Ansatz für die Optimierung der Behandlung von CbIC-Patienten, insbesondere solcher mit Δ Ex2-Spleißmutationen, zu bieten. Zudem können sie Einblicke in die Pathophysiologie der Entstehung renaler und pulmonaler Vaskulopathien vermitteln, die für die Therapie und das Verständnis anderer Formen der PAH und TMA von unmittelbarer Bedeutung sein könnten.

5. Zusammenfassung

Hintergrund

Der Cobalamin Defekt Typ C (CblC) stellt die häufigste angeborene Störung des intrazellulären Cobalaminstoffwechsels dar. Ursächlich für die autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung sind Mutationen im MMACHC-Gen. Biochemisch ist die Multisystemerkrankung gekennzeichnet durch das kombinierte Auftreten einer Methylmalonazidämie und Homocystinurie. Bestimmte Mutationen im MMACHC-Gen führen zu einem Herausspleißen des 2. Exons. Unter Erhalt des Leserasters entsteht ein trunkiertes Protein, das Δ Ex2-MMACHC-Protein. CblC-Patienten mit Δ Ex2-Spleißmutation zeigen phänotypisch eine auffällige Kombination aus einer renalen thrombotischen Mikroangiopathie (rTMA), bzw. eines atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS) und einer pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH). Ziel dieser Arbeit war es 1) die Stärke des Zusammenhangs zwischen Δ Ex2-Spleißmutationen und dem Auftreten renaler und pulmonaler Vaskulopathien zu ermitteln, 2) durch die Charakterisierung des trunkierten Proteins Rückschlüsse auf dessen Pathophysiologie zu erlangen und 3) neue therapeutische Ansätze zu erproben.

Methoden

Mithilfe einer PubMed-Literaturrecherche wurde die Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Δ Ex2-MMACHC-Spleißmutationen und dem Auftreten einer rTMA und PAH herausgearbeitet. Die Charakterisierung des trunkierten Proteins erfolgte mittels Western Blot Untersuchungen und immunozytologischen Färbungen. Halbwertszeiten wurden mittels Cycloheximide Chase Assay bestimmt und Interaktionspartner über das Proximity Ligation Assay identifiziert. Zudem wurden Effekte einer Cobalamin- sowie Homocysteinexposition in HEK293- und HepG2-Zelllinien analysiert.

Ergebnisse

Es konnten 84 CblC-Patienten mit aHUS/rTMA und/oder PAH und berichteten Genotyp der Literatur entnommen werden. Dabei wiesen 65,4 % der 52 Δ Ex2-

Spleißmutationsträger einen renal-pulmonalen Phänotyp auf. Demgegenüber standen 5 Fallberichte von CblC-Patienten ohne Spleißmutationen mit renalen Auffälligkeiten und PAH. Laborexperimentell wies das Δ Ex2-MMACHC-Protein im Vergleich zum wt-MMACHC-Protein eine reduzierte Stabilität, einen erhöhten proteasomalen Abbau sowie eine verringerte Interaktion mit MMADHC und MSR auf. Zudem zeichnete sich das trunkierte Protein durch die Formation von Disulfiden aus. Die Halbwertszeit des Δ Ex2-MMACHC-Proteins konnte durch Cyanocobalamin (CN-Cbl) von 6,4 h auf 9,2 h erhöht werden (Monomere), bzw. von 7,4 h auf 10,6 h (Dimere). Die Anreicherung des Zellnährmediums mit 100 μ M Homocystein führte beim Δ Ex2-MMACHC-Protein zu einer signifikanten Zunahme an exprimiertem Protein, wohingegen das wt-MMACHC-Protein mit einer signifikanten Abnahme der Proteinexpression reagierte.

Diskussion

Die enge Assoziation zwischen Δ Ex2-Spleißmutationen im MMACHC-Gen und dem Auftreten renaler und pulmonaler Vaskulopathien kristallisierte sich in der Literaturrecherche deutlich heraus. Insbesondere der kombinierte Phänotyp scheint nahezu pathognomonisch für CblC-Patienten mit Δ Ex2-Spleißmutationen zu sein.

Pathophysiologisch ist die herabgesetzte Stabilität des trunkierten Proteins hervorzuheben, die durch ein Überangebot an CN-Cbl deutlich angehoben werden konnte. Die experimentellen Erkenntnisse decken sich mit der beobachteten Wirksamkeit einer CN-Cbl-Therapie an sechs CblC-Patienten mit Δ Ex2-Spleißmutationen und eröffnen eine neue Behandlungsoption für diese Patientengruppe.

Die starke Tendenz zur Formation von Disulfiden könnte für die gestörte Interaktion mit den Partnerproteinen MMADHC und MSR verantwortlich sein. Zudem deutet die ausgeprägte Disulfidbildung des Δ Ex2-MMACHC-Proteins zusammen mit den stabilisierenden Effekten einer Homocysteinexposition auf einen fehlenden Oxidationsschutz des Cbls durch das trunkierte Protein hin. Der damit einhergehende Anstieg an oxidativem Zellstress bietet einen schlüssigen Erklärungsansatz für die Genese von Vaskulopathien bei Δ Ex2-Spleißmutationsträgern.

Summary

Introduction

Cobalamin deficiency type C (CbIC) is the most common inborn intracellular cobalamin metabolism error. It is inherited in an autosomal-recessive manner, caused by mutations in the MMACHC gene. Biochemically the multi-systemic disease is characterized by a combined occurrence of methylmalonic aciduria and homocystinuria. Specific MMACHC gene mutations result in erroneous splicing with in-frame exon 2 deletion. Patients with this truncated Δ Ex2-MMACHC protein show a phenotypically notable combination of renal thrombotic microangiopathy (rTMA) or an atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) and pulmonary-arterial hypertension (PAH). The objective of this study was 1) to provide a detailed analysis of the relationship between Δ Ex2-splice site mutations and the occurrence of renal and pulmonary vasculopathies, 2) to characterize the truncated protein in order to learn more about its pathophysiology 3) to test new therapeutical approaches.

Methods

Literature research was conducted using PubMed to identify the genotype-phenotype correlation between Δ Ex2-splice site mutations and renal and pulmonary vasculopathies. The truncated protein was characterized on the basis of protein biochemical examinations using Western Blot techniques and immunocytochemical stainings. The half-life periods of the truncated protein were determined by way of the cycloheximide chase method and a proximity ligation assay was used to identify interaction partners. Effects of cobalamin and homocysteine supplementation were also analysed in HEK293 and HepG2 cell lines.

Results

Eighty-four CbIC patients with aHUS/ rTMA and/or PAH and the reported genotype were identified, with more than 65 % of the 37 patients carrying Δ Ex2-splice site mutations showing a combined renal and pulmonary phenotype. This was contrasted by five CbIC patients who showed no Δ Ex2-splice site mutations and renal abnormalities and PAH.

In a comparison between the Δ Ex2-MMACHC protein and the wild-type protein, laboratory tests revealed reduced stability, increased proteasomal degradation and a reduced interaction with the partner proteins MMADHC and MSR. The truncated protein was furthermore characterized by the formation of disulfide bonds.

The truncated protein half-life period was increased from 6.4 h to 9.2 h (monomers) or 7.4 h to 10.6 h (dimers) with cyanocobalamin (CN-Cbl) treatment. Adding 100 μ M of homocysteine to the cell culture medium resulted in a significant increase in expressed Δ Ex2-MMACHC protein, while the wt-MMACHC protein reacted with a significant decrease in protein expression.

Discussion

Literature research clearly revealed a strong genotype-phenotype correlation between Δ Ex2-splice site mutations and renal or pulmonary vasculopathies. The combined phenotype in particular seems to be almost pathognomonic for CblC patients with Δ Ex2-splice site mutations.

The reduced stability of the truncated protein is most probable of pathophysiological relevance. This was considerably increased by an excessive supply of CN-Cbl. The experimental findings reflect the observed efficacy of treatment with CN-Cbl in six CblC patients with Δ Ex2-splice site mutations, thus opening up new treatment options for this group of patients.

The strong tendency towards a formation of disulfide bonds between two Δ Ex2-MMACHC proteins might be responsible for the disturbed interaction of the truncated protein with MMADHC and MSR. Furthermore, this distinct disulfide bond formation and the stabilizing effects of homocysteine are an indication that protection against oxidation of Cbl by the truncated protein is impaired. The resulting increase in oxidative stress levels provides a conclusive explanation towards understanding the genesis of vasculopathies in patients with Δ Ex2-splice site mutations.

6. Literaturverzeichnis

- Almannai, M., Marom, R., Divin, K., Scaglia, F., Sutton, V. R., Craigen, W. J., ... Graham, B. H. (2017). Milder clinical and biochemical phenotypes associated with the c.482G>A (p.Arg161Gln) pathogenic variant in cobalamin C disease: Implications for management and screening. *Molecular Genetics and Metabolism*, 122 (1–2), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.06.011>
- Andersson, H. C., & Shapira, E. (1998). Biochemical and clinical response to hydroxocobalamin versus cyanocobalamin treatment in patients with methylmalonic acidemia and homocystinuria (cb1C). *Journal of Pediatrics*, 132(1), 121–124. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(98\)70496-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(98)70496-2)
- Andrès, E., Affenberger, S., Federici, L., & Korganow, A. S. (2006). Pseudo-thrombotic Microangiopathy Related to Cobalamin Deficiency. *American Journal of Medicine*, 119(12), 9343. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.001>
- Banerjee, R. (1997). The Yin-Yang of cobalamin biochemistry. *Chemistry and Biology*, 4(3), 175–186. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90286-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90286-6)
- Banerjee, R. (2006). B12 trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. *ACS Chemical Biology*, 1(3), 149–159. <https://doi.org/10.1021/cb6001174>
- Barst, R. J., McGoon, M. D., Elliott, C. G., Foreman, A. J., Miller, D. P., & Ivy, D. D. (2012). Survival in childhood pulmonary arterial hypertension: Insights from the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management. *Circulation*, 125(1), 113–122. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.026591>
- Bartholomew, D. W., Batshaw, M. L., Allen, R. H., Roe, C. R., Rosenblatt, D., Valle, D. L., & Francomano, C. A. (1988). Therapeutic approaches to cobalamin-C methylmalonic acidemia and homocystinuria. *The Journal of Pediatrics*, 112(1), 32–39. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(88\)80114-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(88)80114-8)
- Bassila, C., Ghemrawi, R., Flayac, J., Froese, D. S., Baumgartner, M. R., Guéant, J. L., & Coelho, D. (2017). Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.016>
- Bechtel, T. J., & Weerapana, E. (2017). From structure to redox: the diverse functional roles of disulfides and implications in disease. *Proteomics*, 17(6). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600391>
- Beck, B. B., van Spronsen, F. J., Diepstra, A., Berger, R. M. F., & Kömhoff, M. (2017). Renal thrombotic microangiopathy in patients with cb1C defect: review of an under-recognized entity. *Pediatric Nephrology*, 32(5), 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3399-0>
- Beedholm-Ebsen, R., Wetering, K. Van De, Hardlei, T., Nexø, E., Borst, P., Søren, K., ... Moestrup, S. K. (2010). Molecular gate for cellular export of cobalamin Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1 / ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood*, 115(8), 1632–1639. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-232587>

- Blom, H. J. (2000). Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26(3), 227–232. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8467>
- Bommer, M., Wölfle-Guter, M., Bohl, S., & Kuchenbauer, F. (2018). Differenzialdiagnose und Therapie thrombotischer Mikroangiopathien. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(19), 327–334. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0327>
- Brandstetter, Y., Weinhouse, E., Splaingard, M., & Tang, T. (1990). Cor pulmonale as a complication of methylmalonic acidemia and homocystinuria (Cbl-C type). *American Journal of Medical Genetics*, 36(2), 167–171.
- Brunelli, S. M., Meyers, K. E. C., Guttenberg, M., Kaplan, P., & Kaplan, B. S. (2002). Cobalamin C deficiency complicated by an atypical glomerulopathy. *Pediatric Nephrology*, 17(10), 800–803. <https://doi.org/10.1007/s00467-002-0895-1>
- Brusque, A. M., Borba Rosa, R., Schuck, P. F., Dalcin, K. B., Ribeiro, C. A. J., Silva, C. G., ... Wajner, M. (2002). Inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex activities in rat cerebral cortex by methylmalonic acid. *Neurochemistry International*, 40(7), 593–601. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(01\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(01)00130-9)
- Carrillo-Carrasco, N., Chandler, R. J., & Venditti, C. P. (2012). Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria, cblC type. I. Clinical presentations, diagnosis and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(1), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9364-y>
- Carrillo-Carrasco, N., Sloan, J., Valle, D., Hamosh, A., & Venditti, C. P. (2009). Hydroxycobalamin dose escalation improves metabolic control in CblC. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(6), 728–731. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Chandler, R. J., Zervas, P. M., Shanske, S., Sloan, J., Hoffmann, V., DiMauro, S., & Venditti, C. P. (2009). Mitochondrial dysfunction in mut methylmalonic acidemia. *The FASEB Journal*, 23(4), 1252–1261. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121848>
- Chung-Hui Tsai, A., Morel, C. F., Scharer, G., Yang, M., Lerner-Ellis, J. P., Rosenblatt, D. S., & Thomas, J. A. (2007). Late-onset Combined Homocystinuria and Methylmalonic Aciduria (CblC) and Neuropsychiatric Disturbance. *American Journal of Medical Genetics*, 143, 2430–2434.
- Coelho, D., Kim, J. C., Miousse, I. R., Fung, S., Du Moulin, M., Buers, I., ... Baumgartner, M. R. (2012). Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature Genetics*, 44(10), 1152–1155. <https://doi.org/10.1038/ng.2386>
- Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Lerner-Ellis, J. P., Rosenblatt, D. S., Newbold, R. F., ... Fowler, B. (2008). Gene Identification for the cblD Defect of Vitamin B12 Metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 358(14), pp 1454–64.
- Cornec-Le Gall, E., Delmas, Y., De Parscau, L., Doucet, L., Ogier, H., Benoist, J. F., ... Le Meur, Y. (2014). Adult-onset eculizumab-resistant hemolytic uremic syndrome associated with cobalamin C deficiency. *American Journal of Kidney Diseases*, 63(1), 119–123. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.08.031>
- Cusmano-Ozog, K., Levine, S., Martin, M., Nicholas, E., Packman, S., Rosenblatt, D., ... Enns, G. (2007). Cobalamin C disease identified by newborn screening: The California experience. In: Program

- and abstracts for the SIMD annual meeting. *Mol Genet Metab.* 2007;90:227–265., 90, 227–265.
- Deme, J. C., Hancock, M. A., Xia, X., Shintre, C. A., Plesa, M., Kim, J. C., ... Coulton, J. W. (2014). Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4. *Molecular Membrane Biology*, 31(7–8), 250–261. <https://doi.org/10.3109/09687688.2014.990998>
- Deme, J. C., Miousse, I. R., Plesa, M., Kim, J. C., Hancock, M. A., Mah, W., ... Coulton, J. W. (2012). Structural features of recombinant MMADHC isoforms and their interactions with MMACHC, proteins of mammalian vitamin B12 metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 107(3), 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.07.001>
- Dereven'kov, I. A., Hannibal, L., Makarov, S. V., & Molodtsov, P. A. (2020). Catalytic effect of riboflavin on electron transfer from NADH to aquacobalamin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(1), 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01745-3>
- Drummond, J. T., Huang, S., Blumenthal, R. M., & Matthews, R. G. (1993). Assignment of enzymic function to specific protein regions of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 32(36), 9290–9295.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- Eyries, M., Montani, D., Girerd, B., Perret, C., Leroy, A., Lonjou, C., ... Soubrier, F. (2014). EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nature Genetics*, 46(1), 65–69. <https://doi.org/10.1038/ng.2844>
- Fakhouri, F., Zuber, J., Frémeaux-Bacchi, V., & Loirat, C. (2017). Haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 390(10095), 681–696. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30062-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30062-4)
- Fearing, M., & Marsden, D. (2003). Expanded Newborn Screening. *Pediatric Annals*, 32(8), 509–515.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., ... Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>
- Fenton, W. A., & Rosenberg, L. E. (1978). Mitochondrial Metabolism of Hydroxocobalamin: Synthesis Adenosylcobalamin by Intact Rat Liver Mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 189(2), 441–447.
- Fettelschoss, V., Burda, P., Sagné, C., Coelho, D., De Laet, C., Lutz, S., ... Baumgartner, M. R. (2017). Clinical or ATPase domain mutations in ABCD4 disrupt the interaction between the Vitamin B12-trafficking proteins ABCD4 and LMBD1. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28), 11980–11991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784819>
- Fischer, S., Huemer, M., Baumgartner, M., Deodato, F., Ballhausen, D., Boneh, A., ... Dionisi-Vici, C. (2014). Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(5), 831–840. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9687-6>
- Frémeaux-Bacchi, V., Fakhouri, F., Garnier, A., Bienaimé, F., Dragon-Durey, M. A., Ngo, S., ... Loirat, C.

- (2013). Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: A nationwide french series comparing children and adults. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 8(4), 554–562. <https://doi.org/10.2215/CJN.04760512>
- Froese, D. S., Healy, S., McDonald, M., Kochan, G., Oppermann, U., Niesen, F. H., & Gravel, R. A. (2010). Thermolability of mutant MMACHC protein in the vitamin B12-responsive cblC disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.02.005>
- Froese, D. S., Kopec, J., Fitzpatrick, F., Schuller, M., McCorvie, T. J., Chalk, R., ... Yue, W. W. (2015). Structural insights into the MMACHC-MMADHC protein complex involved in vitamin B12 trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29167–29177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683268>
- Froese, D. S., Krojer, T., Wu, X., Shrestha, R., Kiyani, W., Von Delft, F., ... Yue, W. W. (2012). Structure of MMACHC reveals an arginine-rich pocket and a domain-swapped dimer for its B12 processing function. *Biochemistry*, 51(25), 5083–5090. <https://doi.org/10.1021/bi300150y>
- Froese, D. S., Zhang, J., Healy, S., & Gravel, R. A. (2009). Mechanism of vitamin B12-responsiveness in cblC methylmalonic aciduria with homocystinuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, 98(4), 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.07.014>
- Gaillard, M. C., Matthieu, J. M., & Borruat, F. X. (2008). Retinal dysfunction in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (Cblc) disease: A spectrum of disorders. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, 225(5), 491–494. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1027310>
- Gailus, S., Höhne, W., Gasnier, B., Nürnberg, P., Fowler, B., & Rutsch, F. (2010). Insights into lysosomal cobalamin trafficking: Lessons learned from cblF disease. *Journal of Molecular Medicine*, 88(5), 459–466. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0601-x>
- Guéant, J., Chéry, C., Oussalah, A., Nadaf, J., Coelho, D., Josse, T., ... Rosenblatt, D. (2018). A PRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nat Commun.*, 9(1), 67. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02306-5>. Erratum in: *Nat Commun.* 2018 Feb 2;9(1):554.
- George, J. N., & Nester, C. M. (2014). Syndromes of thrombotic microangiopathy. *New England Journal of Medicine*, 371(7), 654–666. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1312353>
- Gerth, C., Morel, C. F., Feigenbaum, A., & Levin, A. V. (2008). Ocular phenotype in patients with methylmalonic aciduria and homocystinuria, cobalamin C type. *Journal of AAPOS*, 12(6), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2008.06.008>
- Gherasim, C., Ruetz, M., Li, Z., Hudolin, S., & Banerjee, R. (2015). Pathogenic mutations differentially affect the catalytic activities of the human B₁₂-processing chaperone CblC and increase futile redox cycling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11393–11402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637132>
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 23(1), 175–182. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90282-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90282-8)
- Goulding, C. W., Postigo, D., & Matthews, R. G. (1997). Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate,

- cobalamin, and adenosylmethionine. *Biochemistry*, 36(26), 8082–8091.
<https://doi.org/10.1021/bi9705164>
- Gravel, R. A., Mahoney, M. J., Ruddle, F. H., & Rosenberg, L. E. (1975). Genetic complementation in heterokaryons of human fibroblasts defective in cobalamin metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8), 3181–3185.
<https://doi.org/10.1073/pnas.72.8.3181>
- Gruber, K., Puffer, B., & Kräutler, B. (2011). Vitamin B12-derivatives - Enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chemical Society Reviews*, 40(8), 4346–4363.
<https://doi.org/10.1039/c1cs15118e>
- Guignon, V., Frémeaux-Bacchi, V., Giraudier, S., Favier, R., Borderie, D., Massy, Z., ... Deschênes, G. (2005). Late-onset thrombotic microangiopathy caused by cblC disease: Association with a factor H mutation. *American Journal of Kidney Diseases*, 45(3), 588–595.
<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2004.12.004>
- Gupta, A., Kabra, M., Gupta, N. (2021). Combined Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria Presenting as Pulmonary Hypertension. *Indian J Pediatr*. 88(12):1244-1246. <https://doi.org/10.1007/s12098-021-03938-8>.
- Han, B., Cao, Z., Tian, L., Zou, H., Yang, L., Zhu, W., & Liu, Y. (2016). Clinical presentation, gene analysis and outcomes in young patients with early-treated combined methylmalonic acidemia and homocystinemia (cblC type) in Shandong province, China. *Brain and Development*, 38(5), 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2015.10.016>
- Hodgkin, D., Pickworth, J., Robertson, J., Trueblood, K., Prosen, R., & White, J. (1955). The crystal structure of the hexacarboxylic acid derived from B12 and the molecular structure of the vitamin. *Nature*, 176(4477), 325–328.
- Holcomb, B. W., Loyd, J. E., Ely, E. W., Johnson, J., & Robbins, I. M. (2000). Pulmonary veno-occlusive Disease. A Case Series and New Observations. *Chest*, 118(6), 1671–1679.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511977701.058>
- Huemer, M., Scholl-Bürgi, S., Hadaya, K., Kern, I., Beer, R., Seppi, K., ... Karall, D. (2014). Three new cases of late-onset cblC defect and review of the literature illustrating when to consider inborn errors of metabolism beyond infancy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9, 161.
<https://doi.org/10.1186/s13023-014-0161-1>
- Jakubowski, H. (1999). Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *The FASEB Journal*, 13(15), 2277–2283.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.13.15.2277>
- Jakubowski, H. (2013). *Homocysteine in Protein Structure/ Function and Human Disease - Chemical Biology of Homocysteine-containing Proteins*. Wien: Springer Verlag.
- Jakubowski, H. (2019). Homocysteine modification in protein structure/function and human disease. *Physiological Reviews*, 99(1), 555–604. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2018>
- Janošik, M., Kery, V., Gaustadnes, M., Maclean, K. N., & Kraus, J. P. (2001). Regulation of human cystathionine β -synthase by S-adenosyl-L-methionine: Evidence for two catalytically active

- conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry*, 40(35), 10625–10633. <https://doi.org/10.1021/bi010711p>
- Kashiwayama, Y., Seki, M., Yasui, A., Murasaki, Y., Morita, M., Yamashita, Y., ... Imanaka, T. (2009). 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH2-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Experimental Cell Research*, 315(2), 190–205. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.10.031>
- Kawaguchi, K., Okamoto, T., Morita, M., & Imanaka, T. (2016). Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Scientific Reports*, 6(July), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep30183>
- Kim, C. S., Kim, Y. R., Naqvi, A., Kumar, S., Hoffman, T. A., Jung, S. B., ... Irani, K. (2011). Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc. *Cardiovascular Research*, 92(3), 466–475. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr250>
- Kim, J., Gherasim, C., & Banerjee, R. (2008). Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14551–14554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805989105>
- Kim, J., Hannibal, L., Gherasim, C., Jacobsen, D. W., & Banerjee, R. (2009). A human vitamin B12 trafficking protein uses glutathione transferase activity for processing alkylcobalamins. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33418–33424. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057877>
- Kim, P., Kim, N., Lee, Y., Kim, B., Shin, Y., & Lee, S. (2005). ECgene: Genome annotation for alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 33(DATABASE ISS.), 75–79. <https://doi.org/10.1093/nar/gki118>
- Kind, T., Levy, J., Lee, M., Kaicker, S., Nicholson, J. F., & Kane, S. A. (2002). Cobalamin C disease presenting as hemolytic-uremic syndrome in the neonatal period. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 24(4), 327–329. <https://doi.org/10.1097/00043426-200205000-00023>
- Kitai, K., Kawaguchi, K., Tomohiro, T., Morita, M., So, T. & Imanaka, T. (2021). The lysosomal protein ABCD4 can transport vitamin B₁₂ across liposomal membranes in vitro. *J Biol Chem*. Jan-Jun;296:100654. [https://doi: 10.1016/j.jbc.2021.100654](https://doi:10.1016/j.jbc.2021.100654). Epub 2021 May 3. PMID: 33845046.
- Koenig, J. C., Rutsch, F., Bockmeyer, C., Baumgartner, M., Beck, B. B., Kranz, B., & Konrad, M. (2015). Nephrotic syndrome and thrombotic microangiopathy caused by cobalamin C deficiency. *Pediatric Nephrology*, 30(7), 1203–1206. <https://doi.org/10.1007/s00467-015-3110-x>
- Kömhoff, M., Roofthoof, M. T., Westra, D., Teertstra, T. K., Losito, A., van de Kar, N. C. A. J., & Berger, R. M. F. (2013). Combined Pulmonary Hypertension and Renal Thrombotic Microangiopathy in Cobalamin C Deficiency. *Pediatrics*, 132(2), e540–e544. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-2581>
- Koutmos, M., Gherasim, C., Smith, J. L., & Banerjee, R. (2011). Structural basis of multifunctionality in a vitamin B 12- processing enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), 29780–29787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261370>
- Labrune, P., Zittoun, J., Duvaltier, I., Trioche, P., Marquet, J., Niaudet, P., & Odièvre, M. (1999). Haemolytic uraemic syndrome and pulmonary hypertension in a patient with methionine

- synthase deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 158(9), 734–739.
<https://doi.org/10.1007/s004310051190>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Langan, R. C., & Zawistoski, K. J. (2011). Update on vitamin B12 deficiency. *American Family Physician*, 83(12), 1425–1430.
- Lantouéjoul, S., Sheppard, M., Corrin, B., Burke, M., & Nicholson, A. G. (2006). Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis: a clinicopathologic study of 35 cases. *The American Journal of Surgical Pathology*, 30(7)(July), 850–857. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819327>
- Lawrence De Koning, A. B., Werstuck, G. H., Zhou, J., & Austin, R. C. (2003). Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clinical Biochemistry*, 36(6), 431–441.
[https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00062-6)
- Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., ... Gravel, R. A. (1998). Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3059–3064.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3059>
- Lee, A., Asahina, K., Okamoto, T., Kawaguchi, K., Kostsin, D. G., Kashiwayama, Y., ... Morita, M. (2014). Role of NH2-terminal hydrophobic motif in the subcellular localization of ATP-binding cassette protein subfamily D: Common features in eukaryotic organisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(3), 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.133>
- Lerner-Ellis, J. P., Anastasio, N., Liu, J., Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., ... Fowler, B. (2009). Spectrum of mutations in MMACHC, allelic expression, and evidence for genotype-phenotype correlations. *Human Mutation*, 30(7), 1072–1081. <https://doi.org/10.1002/humu.21001>
- Lerner-Ellis, J. P., Tirone, J. C., Pawelek, P. D., Doré, C., Atkinson, J. L., Watkins, D., ... Rosenblatt, D. S. (2006). Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nature Genetics*, 38(1), 93–100. <https://doi.org/10.1038/ng1683>
- Li, Y., Gulati, S., Baker, P. J., Brody, L. C., Banerjee, R., & Kruger, W. (1996). Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1851–1858.
<https://doi.org/10.1093/hmg/5.12.1851>
- Li, Z., Gherasim, C., Lesniak, N. A., & Banerjee, R. (2014). Glutathione-dependent one-electron transfer reactions catalyzed by a B 12 trafficking protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 16487–16497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567339>
- Li, Z., Mascarenhas, R., Twahir, U.T., Kallon, A., Deb, A., Yaw, M., Penner-Hahn, J., Koutmos, M., Warncke, K. & Banerjee, R. (2020). An Interprotein Co-S Coordination Complex in the B₁₂-Trafficking Pathway. *J Am Chem Soc.* 142(38):16334-16345. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c06590>
- Liu, J., Peng, Y., Zhou, N., Liu, X., Meng, Q., Xu, H., & Zhao, S. (2017). Combined methylmalonic acidemia and homocysteinemia presenting predominantly with late-onset diffuse lung disease: a case series of four patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1).

<https://doi.org/10.1186/s13023-017-0610-8>

- Liu, J., Tang, X., Zhou, C., Xu, H., Yang, H., He, R., ... Zhao, S. (2020). Cobalamin C deficiency presenting with diffuse alveolar hemorrhage and pulmonary microangiopathy. *Pediatric Pulmonology*, 55(6), 1481–1486. <https://doi.org/10.1002/ppul.24781>
- Liu, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Song, J., Zheng, H., Dong, H., ... Yang, Y. (2018). Heterogeneous phenotypes, genotypes, treatment and prevention of 1003 patients with methylmalonic acidemia in the mainland of China. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 56(6), 414–420.
- Loscalzo, J. (1996). The Oxidant Stress of Hyperhomocyst(e)inemia. *The American Society for Clinical Investigation*, 98(1), 5–7.
- Louis, N., Eveleigh, C., & Graham, F. L. (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233(2), 423–429. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8597>
- Ludwig, M. L., & Matthews, R. G. (1997). Structure-Based Perspectives on B₁₂-Dependent Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 269–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.269>
- Mah, W., Deme, J. C., Watkins, D., Fung, S., Janer, A., Shoubridge, E. A., ... Coulton, J. W. (2013). Subcellular location of MMACHC and MMADHC, two human proteins central to intracellular vitamin B₁₂ metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 108(2), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.11.284>
- Mangum, J. H., Scrimgeour, K. G. (1962). Cofactor requirements and intermediates in methionine biosynthesis. *Federation Proceedings*, 21, 242.
- Martinelli, D., Deodato, F., & Dionisi-Vici, C. (2011). Cobalamin C defect: Natural history, pathophysiology, and treatment. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(1), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9161-z>
- Martínez de Compañón, Z., Poblet-Puig, M., Vallès, G., Del Toro, M., Vilalta, R., Moreno, A., & Balcells, J. (2018). Cobalamin disorder CblC presenting with hemolytic uremic syndrome and pulmonary hypertension. *Nefrologia*, 38(3), 333–335. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.02.010>
- Matos, I. V., Castejón, E., Meavilla, S., O'Callaghan, M., Garcia-Villoria, J., López-Sala, A., ... Garcia-Cazorla, A. (2013). Clinical and biochemical outcome after hydroxocobalamin dose escalation in a series of patients with cobalamin C deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 109(4), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.05.007>
- Matthews, R. G. (1998). Methylene tetrahydrofolate reductase and methionine synthase: Biochemistry and molecular biology. *European Journal of Pediatrics, Supplement*, 157(2), 54–59. <https://doi.org/10.1007/pl00014305>
- McKeever, M. P., Weir, D. G., Molloy, A., & Scott, J. M. (1991). Betaine-homocysteine methyltransferase: Organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat. *Clinical Science*, 81(4), 551–556. <https://doi.org/10.1042/cs0810551>
- Mellman, I., & Willard, F. (1979). Cobalamin Fibroblasts in Normal. *New York*, 254(23), 11847–11853.
- Montani, D., Lau, E. M., Dorfmueller, P., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., ... Humbert, M. (2016). Pulmonary

- veno-occlusive disease. *European Respiratory Journal*, 47(5), 1518–1534.
<https://doi.org/10.1183/13993003.00026-2016>
- Morel, C. F., Lerner-Ellis, J. P., & Rosenblatt, D. S. (2006). Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): Phenotype-genotype correlations and ethnic-specific observations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88(4), 315–321.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.04.001>
- Mudd, S. H., Levy, H. L., & Abeles, R. H. (1969). A derangement in B12 metabolism leading to homocystinemia, cystathioninemia and methylmalonic aciduria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 35(1), 121–126. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90491-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90491-4)
- Mullikin, D., Pillai, N., Sanchez, R., O'Donnell- Luria, A. H., Kritzer, A., Tal, L., ... Grimes, A. (2018). Megaloblastic Anemia Progressing to Severe Thrombotic Microangiopathy in Patients with Disordered Vitamin B 12 Metabolism: Case Reports and Literature Review. *Journal of Pediatrics*, 202, 315-319.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.06.054>
- National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000556899.1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000556899.1> (accessed Oct. 3, 2020).
- National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000859433.1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000859433.1> (accessed Oct. 3, 2020).
- Nogueira, C., Aiello, C., Cerone, R., Martins, E., Caruso, U., Moroni, I., ... Dionisi-Vici, C. (2008). Spectrum of MMACHC mutations in Italian and Portuguese patients with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(4), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.005>
- Obeid, R., Fedosov, S. N., & Nexo, E. (2015). Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(7), 1364–1372.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201500019>
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L., & Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 246(1), 174–181.
- Oh, R., & Brown, D. (2003). Vitamin B12 Deficiency. *Am Fam Physician*, 67(5), 979–986.
- Palmer, S. M., Robinson, L. J., Wang, A., Gossage, J. R., Bashore, T., & Tapson, V. F. (1998). Massive pulmonary edema and death after prostacyclin infusion in a patient with pulmonary veno-occlusive disease. *Chest*, 113(1), 237–240. <https://doi.org/10.1378/chest.113.1.237>
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333(1–2), 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00200-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00200-6)
- Perez-De-Arce, K., Fonca, R., & Leighton, F. (2005). Reactive oxygen species mediates homocysteine-induced mitochondrial biogenesis in human endothelial cells: Modulation by antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2), 1103–1109.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.053>

- Perna, A. F., Ingrosso, D., & De Santo, N. G. (2003). Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids*, 25(3–4), 409–417. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0026-8>
- Piotukh, K., Kosslick, D., Zimmermann, J., Krause, E., & Freund, C. (2007). Reversible disulfide bond formation of intracellular proteins probed by NMR spectroscopy. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(9), 1263–1270. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.010>
- Posch, A., Kohn, J., Oh, K., Hammond, M., & Liu, N. (2013). V3 stain-free workflow for a practical, convenient, and reliable total protein loading control in western blotting. *Journal of Visualized Experiments*, (82), 1–9. <https://doi.org/10.3791/50948>
- Powers, J. M., Rosenblatt, D. S., Schmidt, R. E., Cross, A. H., Black, J. T., Moser, A. B., ... Morgan, D. J. (2001). Neurological and neuropathologic heterogeneity in two brothers with cobalamin C deficiency. *Annals of Neurology*, 49(3), 396–400. <https://doi.org/10.1002/ana.78>
- Quadros, E. V. (2010). Advances in the Understanding of Cobalamin Assimilation and Metabolism. *British Journal of Haematology*, 148(2), 195–204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07937.x>.
- Quadros, E. V., & Sequeira, J. M. (2013). Cellular uptake of cobalamin: Transcobalamin and the TCbIR/CD320 receptor. *Biochimie*, 95(5), 1008–1018. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.02.004>
- Qureshi, A. A., Rosenblatt, D. S., & Cooper, B. A. (1994). Inherited disorders of cobalamin metabolism. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 17(2), 133–151. [https://doi.org/10.1016/1040-8428\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/1040-8428(94)90022-1)
- Ribes, A., Briones, P., Vilaseca, M. A., Lluch, M., Rodes, M., Maya, A., ... Baumgartner, R. (1990). Methylmalonic aciduria with homocystinuria: Biochemical studies, treatment, and clinical course of a Cbl-C patient. *European Journal of Pediatrics*, 149(6), 412–415. <https://doi.org/10.1007/BF02009662>
- Richard, E., Gallego-Villar, L., Rivera-Barahona, A., Oyarzábal, A., Pérez, B., Rodríguez-Pombo, P., & Desviat, L. R. (2018). Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1246069>
- Richard, E., Jorge-Finnigan, A., Garcia-Villoria, J., Merinero, B., Desviat, L. R., Gort, L., ... Yoldi, M. E. (2009). Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cb1C) with homocystinuria (MMACHC). *Human Mutation*, 30(11), 1558–1566. <https://doi.org/10.1002/humu.21107>
- Rosenblatt, D. S. R., Aspler, A. L. A., Shevell, M. I. S., Pletcher, B. A. P., Fenton, W. A., & Seashore, M. R. (1997). Clinical heterogeneity and prognosis in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (CblC). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 20, 528–538.
- Roze, E., Gervais, D., Demeret, S., De Baulny, H. O., Zittoun, J., Benoist, J. F., ... Bolgert, F. (2003). Neuropsychiatric disturbances in presumed late-onset cobalamin C disease. *Archives of Neurology*, 60(10), 1457–1462. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.10.1457>
- Russell, W. C., Graham, F. L., Smiley, J., & Nairn, R. (2008). Characteristics of a Human Cell Line

- Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59–72.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Saaranen, M. J., & Ruddock, L. W. (2013). Disulfide bond formation in the cytoplasm. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(1), 36–43. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4868>
- Sacharow SJ, Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. 2004 Jan 15 [Updated 2017 May 18]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1524/>
- Sevier, C. S., & Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(11), 836–847. <https://doi.org/10.1038/nrm954>
- Sharma, A. P., Greenberg, C. R., Prasad, A. N., & Prasad, C. (2007). Hemolytic uremic syndrome (HUS) secondary to cobalamin C (cblC) disorder. *Pediatric Nephrology*, 22(12), 2097–2103. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0604-1>
- Shevell, M. I., & Rosenblatt, D. S. (1992). The Neurology of Cobalamin. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 19(4), 472–486. <https://doi.org/10.1017/S0317167100041676>
- Simonneau, G., Galiè, N., Rubin, L. J., Langleben, D., Seeger, W., Domenighetti, G., ... Fishman, A. (2004). Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12 SUPPL.), S5–S12. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.037>
- Stucki, M., Coelho, D., Suormala, T., Burda, P., Fowler, B., & Baumgartner, M. R. (2012). Molecular mechanisms leading to three different phenotypes in the cblD defect of intracellular cobalamin metabolism. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1410–1418. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr579>
- Tennant, J. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, 2(6), 685–694.
- Thauvin-Robinet, C., Roze, E., Couvreur, G., Horellou, M. H., Sedel, F., Grabli, D., ... Faivre, L. (2008). The adolescent and adult form of cobalamin C disease: Clinical and molecular spectrum. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(6), 725–728. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.133025>
- Thomas, P., & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3), 187–200.
- Upchurch, G. R., Welche, G. N., Fabian, A. J., Freedman, J. E., Johnson, J. L., Keaney, J. F., & Loscalzo, J. (1997). Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 17012–17017. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.17012>
- Van Hove, J. L. K., Van Damme-Lombaerts, R., Grünewald, S., Peters, H., Van Damme, B., Fryns, J. P., ... Fowler, B. (2002). Cobalamin disorder Cbl-C presenting with late-onset thrombotic microangiopathy. *American Journal of Medical Genetics*, 111(2), 195–201. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10499>

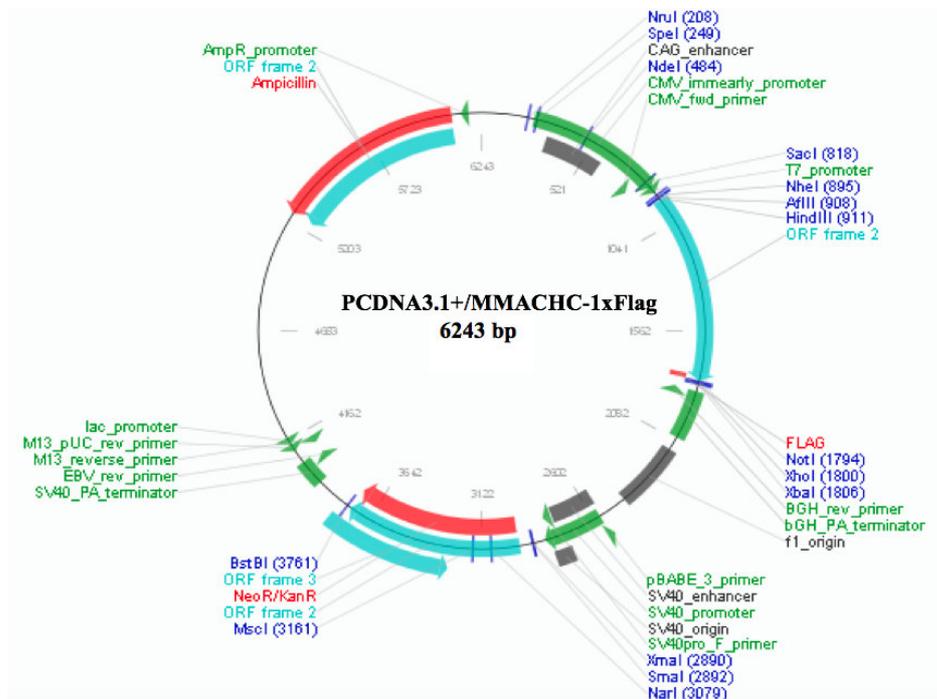
- Van Loon, R. L. E., Roofthoof, M. T. R., Delhaas, T., van Osch-Gevers, M., ten Harkel, A. D. J., Strengers, J. L. M., ... Berger, R. M. F. (2010). Outcome of Pediatric Patients With Pulmonary Arterial Hypertension in the Era of New Medical Therapies. *American Journal of Cardiology*, *106*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.02.023>
- Wang, C., Li, D., Cai, F., Zhang, X., Xu, X., Liu, X., ... Shu, J. (2019). Mutation spectrum of MMACHC in Chinese pediatric patients with cobalamin C disease: A case series and literature review. *European Journal of Medical Genetics*, *62*(10), 103713. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.103713>
- Wang, F., Han, L., Yang, Y., Gu, X., Ye, J., Qiu, W., ... Wang, Y. (2010). Clinical, biochemical, and molecular analysis of combined methylmalonic acidemia and hyperhomocysteinemia (cbIC type) in China. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *33*(SUPPL. 3). <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9217-0>
- Weisfeld-Adams, J. D., Morrissey, M. A., Kirmse, B. M., Yu, C., Wasserstein, M. P., Salveson, B. R., ... Diaz, G. A. (2010). Newborn screening and early biochemical follow-up in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Molecular Genetics and Metabolism*, *99*(2), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
- Wolthers, K. R., & Scrutton, N. S. (2009). Cobalamin uptake and reactivation occurs through specific protein interactions in the methionine synthase-methionine synthase reductase complex. *FEBS Journal*, *276*(7), 1942–1951. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06919.x>
- Zhang, S., Bai, Y. Y., Luo, L. M., Xiao, W. K., Wu, H. M., & Ye, P. (2014). Association between serum homocysteine and arterial stiffness in elderly: A community-based study. *Journal of Geriatric Cardiology*, *11*(1), 32–38. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5411.2014.01.007>
- Zhang, X., Chen, Q., Song, Y., Guo, P., Wang, Y., Luo, S., Zhang, Y., Zhou, C., Li, D., Chen, Y. & Wei, H. (2021). Epimutation of MMACHC compound to a genetic mutation in cbIC cases. *Mol Genet Genomic Med.*, *9*(6), 1625. <https://doi: 10.1002/mgg3.1625>
- Zhou, W., Li, H., Wang, C., Wang, X., & Gu, M. (2019). Newborn screening for methylmalonic acidemia in a Chinese population: Molecular genetic confirmation and genotype phenotype correlations. *Frontiers in Genetics*, *10*(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00726>
- Zinellu, A., Sotgia, S., Scanu, B., Arru, D., Cossu, A., Posadino, A. M., ... Carru, C. (2017). N- and S-homocysteinylation reduce the binding of human serum albumin to catechins. *European Journal of Nutrition*, *56*(2), 785–791. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1125-5>

7. Anhang

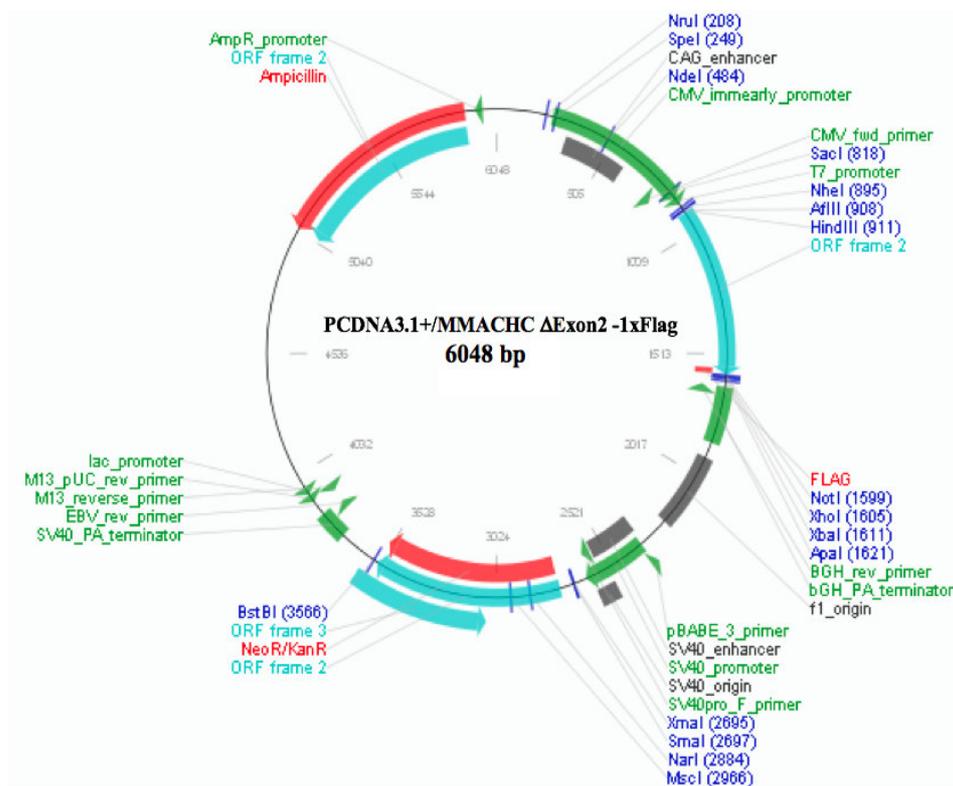
1. Plasmidkarten	134
1.1. wt-MMACHC-flag	134
1.2. Δ Ex2-MMACHC-flag	134
2. Tabellarische Übersicht ausgewertete Patientendaten	135
2.1. Δ Ex2-Spleißmutationsträger	135
2.2. Patienten ohne Δ Ex2-Spleißmutation	137
2.3. Literaturangaben für Tabellen 2.1. und 2.2.	138
3. Zweifaktorielle Varianzanalyse	142
3.1. CHX: Monomere	142
3.2. CHX: Dimere	143
a. Lebenslauf	144
b. Verzeichnis der akademischen Lehrer	145
c. Danksagung	146
d. Ehrenwörtliche Erklärung	147

1. Plasmidkarten

1.1. wt-MMACHC-flag



1.2. ΔEx2-MMACHC-flag



2. Tabellarische Übersicht ausgewertete Patientendaten

2.1. ΔEx2-Spleißmutationsträger

Nr	G	Ethnie	Alter	Mutation		renal	PAH, PVOD	Therapie	Outcome	Quelle
				Allel 1	Allel 2					
1	m	chinesisch	0,25	c.80A>G	c.609G>A	CKD	PAH	OH-Cbl	Verbesserung	1
2	m	chinesisch	0,5	c.80A>G	c.658_660delAAG	Häm./Prot.	PH	OH-Cbl i.m.*	Verbesserung	2
3	m	chinesisch	1,3	c.80A>G	c.609G>A	Häm.	PH	OH-Cbl i.m.*	Verbesserung	2
4	m	chinesisch	1,33	c.80A>G	c.658_660delAAG	TMA	/	OH-Cbl i.m.	verstorben	3
5	m	chinesisch	1,5	c.80A>G	c.656_658delAGA	Häm./Prot.	PH	OH-Cbl i.m.*	Verbesserung	2
6	f	chinesisch	1,5	c.80A>G	c.331G>T	Häm./Prot.	PH	OH-Cbl i.m.*	Verbesserung	2
7	m	spanisch	1,5	c.271dupA	c.276G>T	TMA	PVOD	keine	verstorben	4
8	f	chinesisch	1,75	c.80A>G	c.331C>T	Häm./Prot.	PAH	CN-Cbl i.m.	asymptomatisch	5
9	f	japanisch	2	c.80A>G	c.440G>A	Häm./Prot.	PH	OH-Cbl i.m., später Ado-Cbl	asymptomatisch	6
10	m	nordafrik.	2	c.276G>A	c.276G>A	aHUS, TMA	PAH	OH-Cbl i.m.	verstorben	7
11	m	chinesisch	2,6	c.80A>G	c.656_658delAGA	Häm./Prot.	PH	OH-Cbl i.m.*	Verbesserung	2
12	f	chinesisch	3	c.80A>G	c.609G>A	Häm./Prot.	PH	OH-Cbl i.m.*	Verbesserung	2
13	f	chinesisch	3	c.80A>G	c.609G>A	Häm./Prot., NT	PH	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	3
14	m	niederländ.	3	c.276G>T	c.442_444delinsA	aHUS	PVOD	keine	verstorben	4
15	m	chinesisch	4	c.80A>G	c.609G>A	aHUS	PAH			1
16	f	chinesisch	4	c.80A>G	c.658_660delAAG	TMA	/	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	3
17	m	chinesisch	4	c.80A>G	c.609G>A	TMA	PH	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	3
18	f	chinesisch	4	c.80A>G	c.609G>A	TMA	/	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	3
19	f	chinesisch	4	c.80A>G	c.609G>A	aHUS	-	Vit. B12 i.m.	asymptomatisch	9
20	m	caucasian	4	c.271dupA	c.276G>A	aHUS	-	OH-Cbl s.c.	Verbesserung	8
21	f	-	4	c.82-9_12del	c.271dupA	TMA	-	OH-Cbl i.m./s.c	Verbesserung	10
22	f	spanisch	4	c.271dupA	c.276G>T	TMA	PAH, PVOD	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	4
23	f	chinesisch	4	c.80A>G	c.609G>A	TMA		OH-Cbl i.m.	Verbesserung	11
24	m	chinesisch	4,17	c.80A>G	c.609G>A	Prot.	PAH	OH-Cbl parenteral	asymptomatisch	12
25	m	chinesisch	4,5	c.80A>G	c.609G>A	eGFR↓ (38)	PAH	OH-Cbl parenteral	asymptomatisch	12
26	m	chinesisch	5	c.80A>G	c.609G>A	TMA	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	3
27	f	chinesisch	5	c.80A>G	c.609G>A	Häm./Prot.	PAH	OH-Cbl /	Verbesserung	13
28	f	chinesisch	5,5	c.80A>G	c.609G>A	aHUS	-	CN-Cbl i.m.	Verbesserung	14

29	m	chinesisch	5,5	c.80A>G		c.609G>A	Häm.	PH	OH- Cbl i.m.*	Verbesserung	3
30	f	französisch	6	c.82-9_12del	TMA, aHUS	c.271dupA		-	OH- Cbl s.c	Verbesserung	16
31	f	chinesisch	6,17	c.80A>G	eGFR ↓	c.609G>A		PAH	OH- Cbl parenteral	asymptomatisch	12
32	f	chinesisch	7	c.80A>G	TMA	c.609G>A	TMA		CN-Cbl	Verbesserung	16
33	m	chinesisch	7,5	c.80A>G	Häm.	c.609G>A	Häm.	PH	OH- Cbl i.m.*	Verbesserung	2
34	f	chinesisch	7,5	c.80A>G	Prot.	c.609G>A	Prot.	PAH	OH- Cbl parenteral	asymptomatisch	12
35	m	chinesisch	7,67	c.80A>G	TMA	c.609G>A	TMA	PAH	CN- Cbl i.m.	Verbesserung	5
36	f	chinesisch	8,42	c.80A>G	TMA	c.609G>A	TMA	-	CN- Cbl i.m.	Verbesserung	5
37	m	-	8,5	c.276G>T	aHUS	c.442_444delinsA	aHUS	PVOD	keine	verstorben	17
38	f	französisch	8,5	c.82-9_12del	TMA, aHUS	c.271dupA	TMA, aHUS	-	OH- Cbl. s.c.	Verbesserung	16
39	m	-	9	c.276G>T	aHUS	c.276G>T	aHUS	PVOD	OH- Cbl i.m.	verstorben	18
40	f	chinesisch	9,8	c.80A>G	Häm./ Prot.	c.609G>A	Häm./ Prot.	PH	OH- Cbl i.m.*	Verbesserung	2
41		chinesisch	11	c.80A>G	-	c.609G>A	-	PH	Vit. B12	Verbesserung	19
42	m		12	c.82-9_12del	TMA	c.271dupA	TMA	-	OH- Cbl i.m./s.c.	Verbesserung	10
43	f	chinesisch	12	c.80A>G	Renal injury	c.609A>G	Renal injury	PAH	OH- Cbl i.m.	Verbesserung	20
44	f	chinesisch	12,9	c.80A>G	Häm./ Prot.	c.609A>G	Häm./ Prot.	PH	OH- Cbl i.m.*	Verbesserung	2
45	m	italienisch	14	c.14_24del	TMA	c.276G>A	TMA	PAH	CN- Cbl oral	Verbesserung	21, 4, 18
46	m		14	c.82-7_82-5delGTT	aHUS	c.82-7_82-5delGTT	aHUS	PVOD?	OH- Cbl i.m.	Verbesserung	18
47	f	kanadisch	14	c.271dupA	TMA	c.276G>T	TMA	PAH	OH- Cbl i.m.	Verbesserung	20
48	-		15	c.82-9_12delITTC	TMA	c.271dupA	TMA	-	OH- Cbl i.m.	Verbesserung	23
49	m	chinesisch	16	c.1A>G	aHUS	c.80A>G	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	24
50	m	französisch	18	c.82-9_12delITTC	TMA	c.271dupA	TMA	PH	OH- Cbl i.m.	Verbesserung	25
51	m	französisch	18	c.82-9_12delITTC	TMA	c.271dupA	TMA	PAH	keine	verstorben	23
52	m	chinesisch	25	c.80A>G	IgA Nephropathie	c.394C>T	IgA Nephropathie	PH	Cbl	Verbesserung	26

* Eventuell CN-Cbl, im chinesischen Originaltext nicht genau zu entnehmen. Alle Patienten wurden mit OH-Cbl oder Vitamin B₁₂ intramuskulär behandelt.

2.2. Patienten ohne Δ Ex2-Spleißmutation

Nr	G	Ethnie	Alter	Mutation		renal	PAH, PVOD	Therapie	Outcome	Quelle
				Allel 1	Allel 2					
1	f	osteuropäisch	0,033	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	27
2	m	italienisch	0,041	c.271dupA	c.666C>A	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	28
3	m	italienisch	0,058	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	28
4	m	-	0,066	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	keine	verstorben	29
5	m	-	0,068	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	keine	verstorben	29
6	w	spanisch	0,074	c.328_331del	c.328_331del	TMA	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	30
7	m	italienisch	0,077	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	28
8	m	italienisch	0,085	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	28
9	f	orientalisch	0,1	c.481C>T	c.457C>T	aHUS	-	Cbl i.m.	Verbesserung	31
10	m	-	0,25	c.271dupA	c.271dupA	aHUS, TMA	-	OH-Cbl i.m.	verstorben	32
11	m	-	0,25	c.271dupA	c.271dupA	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	33
12	f	-	0,42	c.481C>T	c.481C>T	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	32
13	f	türkisch	0,42	c.484G>T	c.484G>T	aHUS	-	CN-Cbl i.m.	asymptomatisch	34
14			0,5	c.484G>T	c.484G>T	aHUS	PH	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	35
15	f	türkisch	1,25	c.484G>T	c.484G>T	-	PAH	OH-Cbl i.m.	asymptomatisch	36
16	m	chinesisch	1,5	c.217C>T	c.609G>A	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	37
17	f	indisch	1,92	c.271dupA	c.347T>C	Häm./ Prot.	PAH	keine	verstorben	38
18	m	afrikanisch	2	c.271dupA	c.389A>G	-	PAH	OH-Cbl i.m.	verstorben	39
19	m		2	c.271-272dupA	c.347T>C	aHUS	PAH	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	40
20	m	niederländisch	2,5	c.464G>A	c.464G>A	aHUS	PVOD	OH-Cbl i.m.	verstorben	4
21	m	afrikanisch	3	c.271dupA	c.389A>G	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	39
22	f	chinesisch	3,3	c.365A>T	c.609G>A	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	37
23	/	spanisch	9	c.271dupA	c.565C>A	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	NT, Verbesserung	41
24	m	caucasian	13,6	c.271dupA	c.388T>C	aHUS, TMA	-	OH-Cbl i.v., später oral	Verbesserung	42
25	f	spanisch	18	c.271dupA	c.565C>A	TMA	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	43
26	f		19	c.271dupA	c.556G>A	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	44
27	m	caucasian	20	c.271dupA	c.389A>G	aHUS, TMA	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	45
28	m	portugiesisch	23	c.565C>A	c.565C>A	aHUS	-	OH-Cbl i.v.	NT, Verbesserung	46
29	f	-	26	c.271dupA	c.389A>G	TMA	-	OH-Cbl i.m.	NT, Verbesserung	23
30	f	französisch	28	c.565C>A	c.565C>A	aHUS	PAH	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	47
31	f	-	39	c.365A>G	c.457C>T	TMA	-	OH-Cbl i.m.	verstorben	48
32	m	italienisch	45	c.220delA	c.395_397del	aHUS	-	OH-Cbl i.m.	Verbesserung	49

2.3. Literaturangaben für Tabellen 2.1. und 2.2.

1. Liu Y, Yang L, Shuai R, Huang S, Zhang B, Han L, Sun K, Wu Y. (2022). Different Pattern of Cardiovascular Impairment in Methylmalonic Acidaemia Subtypes. *Front Pediatr.* Feb 23;10:810495. doi: 10.3389/fped.2022.810495.
2. Liu XQ, Yan H, Qiu JX, et al. (2017). [Pulmonary arterial hypertension as leading manifestation of methylmalonic aciduria: clinical characteristics and gene testing in 15 cases]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 49(5):768-777. Chinese.
3. Liu X, Xiao H, Yao Y, Wang S, Zhang H, Zhong X, Yang Y, Ding J, Wang F. (2023). Prominent renal complications associated with *MMACHC* pathogenic variant c.80A>G in Chinese children with cobalamin C deficiency. *Front Pediatr.*, 10;10:1057594. doi: 10.3389/fped.2022.1057594.
4. Kömhoff M, Roofthoof MT, Westra D, Teerstra TK, Losito A, van de Kar NCAJ, Berger RMF (2013). Combined pulmonary hypertension and renal thrombotic microangiopathy in cobalamin C deficiency. *Pediatr.*, 132:e540–e544.
5. Liu J, Peng Y, Zhou N, Liu X, Meng Q, Xu H, Zhao S. (2017). Combined methylmalonic acidemia and homocysteinemia presenting predominantly with late-onset diffuse lung disease: a case series of four patients. *Orphanet J Rare Dis.* 12(1):58. doi: 10.1186/s13023-017-0610-8
6. Yoshizawa H, Nogami K, Yaoi H, Shima M. (2019). Pulmonary hypertension with diffuse lung lesions in cobalamin C defect. *Pediatr Int.*, 61(10):1062-1063. doi: 10.1111/ped.13971.
7. Martinez de Companon Z, Poblet-Puig M, Valles G, et al. (2017). Cobalamin disorder CblC presenting with hemolytic uremic syndrome and pulmonary hypertension. *Nefrologia (Engl Ed.)*, 38(3):333-335. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nefro.2017.03.019.
8. Koenig JC, Rutsch F, Bockmeyer C, Baumgartner M, Beck BB, Kranz B, et al. (2015). Nephrotic syndrome and thrombotic microangiopathy caused by cobalamin C deficiency. *Pediatr Nephrol.*, 30(7):1203-6. doi: 10.1007/s00467-015-3110-x.
9. Chen M, Zhuang J, Yang J, Wang D, Yang Q. (2017). Atypical hemolytic uremic syndrome induced by CblC subtype of methylmalonic academia: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*, 96(43): e8284.
10. Van Hove JL, Van Damme-Lombaerts R, Grunewald S, et al. (2002). Cobalamin disorder Cbl-C presenting with late-onset thrombotic microangiopathy. *Am J Med Genet.*, 111(2): 195-201. doi: 10.1002/ajmg.10499.
11. Juan T, Chao-Ying C, Hua-Rong L, Ling W. (2022). Rare cause of coronary artery ectasia in children: A case report of methylmalonic acidemia with hyperhomocysteinemia. *Front Pediatr.* 10:917734. doi: 10.3389/fped.2022.917734.
12. Liu, J., Tang, X., Zhou, CZ., Xu, H., Yang, H., Ruxuan, H., Li, H., Zhao, S. (2020). Cobalamin C deficiency presenting with diffuse alveolar hemorrhage and pulmonary microangiopathy. *Pediatric Pulmonology*; 55(6):1481-1486. doi: 10.1002/ppul.24781.

13. Chen, Yin, He & Xu (2018). Pulmonary embolism in child with combined methylmalonic acidemia and homocystinuria. *Pediatric Invest*, 2(2): 131-133. doi: 10.1002/ped4.12047.
14. Zhu J, Wan S, Zhao X, Zhu B, Lv Y, Jiang H. (2022). Acute Lymphoblastic Leukemia in Combined Methylmalonic Acidemia and Homocysteinemia (cblC Type): A Case Report and Literature Review. *Front Genet*. 13:856552. doi: 10.3389/fgene.2022.856552.
15. Chen Q, Bao H, Wu H, Zhao S, Huang S, Zhao F. (2017). Diagnosis of cobalamin C deficiency with renal abnormality from onset in a Chinese child by next generation sequencing: a case report. *Exp Ther Med*. 14:3637–43. doi: 10.3892/etm.2017.4970.
16. Guignonis V, Frémeaux-Bacchi V, Giraudier S, et al. (2005). Late-onset thrombotic microangiopathy caused by cblC disease: association with a factor H mutation. *Am J Kidney Dis*. 45(3):588–595.
17. Bouts AH, Roofthoof MT, Salomons GS, Davin JC. (2010). CD46- associated atypical hemolytic uremic syndrome with uncommon course caused by cblC deficiency. *Pediatr Nephrol* 25:2547–2548.
18. Kömhoff (unpublished)
19. Liao HY, Shi XQ, Li YF. (2020). Metabolic and genetic assessments interpret unexplained aggressive pulmonary hypertension induced by methylmalonic acidemia: A case report. *World J Clin Cases*. 8(6):1137-1141. doi: 10.12998/wjcc.v8.i6.1137.
20. Wen, L., Guo, Y. & Shi, X. (2020). Pulmonary hypertension in late-onset methylmalonic aciduria and homocystinemia: a case report. *BMC Pediatrics*. 20(1):243. doi: 10.1186/s12887-020-02130-9.
21. Losito A, Pittavini L, Covarelli C. (2012). Thrombotic microangiopathic nephropathy, pulmonary hypertension and nephromegaly: case report of a patient treated with endothelin receptor antagonist. *Clin Nephrol*. 77(2):164–70.
22. Petropoulos TE, Ramirez ME, Granton J, et al. (2018). Renal thrombotic microangiopathy and pulmonary arterial hypertension in a patient with late-onset cobalamin C deficiency. *Clinical Kidney Journal*, 11(3):310-314.
23. Lemoine, M., François, A., Grangé, S., Rabant, et al. (2018). Cobalamin C Deficiency Induces a Typical Histopathological Pattern of Renal Arteriolar and Glomerular Thrombotic Microangiopathy. *Kidney Int Rep*. 3(5):1153-1162. doi: 10.1016/j.ekir.2018.05.015.
24. Pang L, Chen J, Yu H, Huang H, Jin B, Wang X, Li H. (2022). Case Report: A Rare Case of Thrombotic Microangiopathy Induced by Remethylation Disorders. *Front Med (Lausanne)*. 9:837253. doi: 10.3389/fmed.2022.837253.
25. Grangé S, Bekri S, Artaud-Macari E, Francois A, Giraul C, Poitou AL, et al. (2014) Adult-onset renal thrombotic microangiopathy and pulmonary arterial hypertension in Cobalamin C deficiency. *Lancet*. 386(9997):1011-2.
26. Zhao QH, Wu WH, Fu LJ, Wang L. (2021). Adult-onset hypoxaemia, diffuse lung lesions, and pulmonary hypertension in cobalamin C defect: a case report. *Eur Heart J Case Rep*. 5(6):ytab251. doi: 10.1093/ehjcr/ytab251.

27. Sharma AP, Greenberg CR, Prasad AN, Prasad C. Hemolytic uremic syndrome (HUS) secondary to cobalamin C (cb1C) disorder. (2007). *Pediatr Nephrol.* 22(12): 2097–103.
28. Menni F, Testa S, Guez S, Chiarelli G, Alberti L, Esposito S. (2012). Neonatal atypical hemolytic uremic syndrome due to methylmalonic acid-uria and homocystinuria. *Pediatr Nephrol.* 27(8):1401–5.
29. Mesa-Medina O, Ruiz-Pons M, García-Nieto V, León-González J, López-Mendoza S. (2014). Methylmalonic acidemia with homocystinuria. A very rare cause of kidney failure in the neonatal period. *Nefrologia*, 34(4):539-40 English, Spanish. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2014.May.12058.
30. Wood WD, Elmaghrabi A, Gotway G, Wolf M. (2022). The roles of homocysteinemia and methylmalonic acidemia in kidney injury in atypical hemolytic uremic syndrome caused by cobalamin C deficiency. *Pediatr Nephrol.*, 37(6):1415-1418. doi:10.1007/s00467-021-053726.
31. Francis PJ, Calver DM, Barnfield P, Turner C, Dalton RN, Champion MP. (2004). An infant with methylmalonic aciduria and homocystinuria (cb1C) presenting with retinal haemorrhages and subdural haematoma mimicking non-accidental injury. *Eur J Pediatr.*, 163(7):420-1. doi: 10.1007/s00431-004-1440-y.
32. Topaloglu R, İnözü M, Gülhan B, Gürbüz B, Talim B, Coşkun T. (2018). Do not miss rare and treatable cause of early-onset hemolytic uremic syndrome: Cobalamin C Deficiency. *Nephron*, 142(3):258-263. doi: 10.1159/000497822.
33. Karava V, Kondou A, Dotis J, Sotiriou G, Gerou S, Michelakakis H, Vargiami E, Economou M, Zafeiriou D, Printza N. (2021). Hemolytic Uremic Syndrome Due to Methylmalonic Acidemia and Homocystinuria in an Infant: A Case Report and Literature Review. *Children (Basel)*. 8(2):112. doi: 10.3390/children8020112.
34. Adrovic A, Canpolat N, Caliskan S, et al. (2016). Cobalamin C defect-hemolytic uremic syndrome caused by new mutation in MMACHC. *Pediatr Int.*, 58(8):763-765. doi: 10.1111/ped.12953.
35. Barlas UK, Kihtr HS, Goknar N, Ersoy M, Akcay N, Sevketoglu E. (2018). Hemolytic uremic syndrome with dual caution in an infant: cobalamin C defect and complement dysregulation successfully treated with eculizumab. *Pediatr Nephrol.*, 33(6):1093-1096. doi: 10.1007/s00467-018-3941-3.
36. Gündüz M, Ekici F, Ozaydin E, Ceylaner S, Perez B. (2014). Reversible pulmonary arterial hypertension in cobalamin-dependent cobalamin C disease due to a novel mutation in the MMACHC gene. *Eur J Pediatr.*, 173(12): 1707-10. doi.org/10.1007/s00431-014-2330-6.
37. Li QL, Song WQ, Peng XX, Liu XR, He LJ, Fu LB. (2015). Clinical characteristics of hemolytic uremic syndrome secondary to cobalamin C disorder in Chinese children. *World J Pediatr* 11(3): 276-80. doi: 10.1007/s12519-015-0032-4.
38. Gupta A, Kabra M, Gupta N. (2021). Combined Methylmalonic Aciduria and Homocystinuria Presenting as Pulmonary Hypertension. *Indian J Pediatr.* 88(12):1244-1246. doi: 10.1007/s12098-021-03938-8.

39. Iodice FG, Di Chiara L, Boenzi S, et al. (2013). Cobalamin C defect presenting with isolated pulmonary hypertension. *Pediatrics*, 132(1): e248-51. doi: 10.1542/peds.2012-1945.
40. De Simone, L., Capirchio, L., Roperto, R. M., Romagnani, P., Sacchini, M., Donati, M. A., & De Martino, M. (2018). Favorable course of previously undiagnosed Methylmalonic Aciduria with Homocystinuria (cbIC type) presenting with pulmonary hypertension and aHUS in a young child: A case report. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(1), 1–5. doi.org/10.1186/s13052-018-0530-9.
41. Richard E, Jorge-Finnigan A, Garcia-Villoria J, et al. (2009). Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cbIC) with homocystinuria (MMACHC). *Human mutation*, 30(11): 1558-66.
42. Ardissino, G., Perrone, M., Tel, F., Testa, S., Morrone, A., Possenti, I., Tagliaferri, f., Dilena, R., Meni, F. (2017). Case report: Late Onset Cobalamin Disorder and Hemolytic Uremic Syndrome: A Rare Cause of Nephrotic Syndrome. *Case Reports in Pediatrics*, 2794060. doi: 10.1155/2017/2794060.
43. Varo I, Bueno Delgado M, Dios Fuentes E, et al. (2015). Combinación de acidemia metilmalónica y homocisteinuria; a propósito de un caso [Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria; a case report]. *Nutr Hosp.*, 31(4):1885-8. Spanish. doi: 10.3305/nh.2015.31.4.8544.
44. Philipponnet C, Desenclos J, Brailova M, Aniort J, Kemeny JL, Deville C, Fremeaux-Bacchi V, Souweine B, Heng AE. (2020). Cobalamin C deficiency associated with antifactor h antibody-associated hemolytic uremic syndrome in a young adult. *BMC Nephrol.*, 21(1):96. doi: 10.1186/s12882-020-01748-2.
45. Cornec-Le Gall E, Delmas Y, De Parscau L, Doucet L, Ogier H, Benoist JF, et al. (2014). Adult-onset eculizumab-resistant hemolytic uremic syndrome associated with cobalamin C deficiency. *Am J Kidney Dis.*, 63(1):119–23. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.08.031.
46. Huemer M, Scholl-Bürgi S, Hadaya K, et al. (2014). Three new cases of late-onset cbIC defect and review of the literature illustrating when to consider inborn errors of metabolism beyond infancy. *Orphanet J Rare Dis.*, 161(9). doi.org/10.1186/s13023-014-0161-1.
47. Kaaniche, F. M., Chaari, A., Bacouch, N., Bahloul, M. & Bouaziz, M. (2016). Syndrome hémolytique et urémique de l'adulte jeune par trouble du métabolisme de la cobalamine : à propos d'un cas, *La Presse Médicale*, 45(1). doi.org/10.1016/j.lpm.2015.10.014.
48. Thauvin-Robinet C, Roze E, Couvreur G, Horrellou MH, Sedel F, Grabli D, Bruneteau G, Tonneti C, Masurel-Paulet A, Perennou D, Moreau T, Giroud M, de Baulny HO, Giraudier S, Faivre L. (2008). The adolescent and adult form of cobalamin C disease: clinical and molecular spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(6): 725-8. doi: 10.1136/jnnp.2007.133025.
49. Kalantari S, Brezzi B, Bracciamà V, Barreca A, Nozza P, Vaisitti T, Amoroso A, Deaglio S, Manganaro M, Porta F, Spada M. (2022). Adult-onset CblC deficiency: a challenging diagnosis involving different adult clinical specialists. *Orphanet J Rare Dis.*, 17(1):33. doi: 10.1186/s13023-022-02179-y.

3. Zweifaktorielle Varianzanalyse

3.1. CHX: Monomere

3.1.1. Deskriptive Statistik (Monomere)

Zeit	Kein Cbl-Zusatz			Cyanocobalamin			Hydroxycobalamin		
	M	SD	N	M	SD	N	M	SD	N
0h	100	0	7	100	0	7	100	0	7
3h	54,48	7,53	7	75,35	10,1	7	58,38	6,52	7
6h	45,04	6,53	7	53,27	3,97	7	47,34	4,34	7
12h	36,34	6,73	7	46,29	11,57	7	40,45	5,64	7

3.1.2. Ergebnisse der Zweifaktorielle Varianzanalyse (Monomere)

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	892,7	6	148,8	F (6, 54) = 4,556	0,0008
Time	43275	3	14425	F (3, 54) = 441,7	<0,0001
Treatment	1433	2	716,3	F (2, 18) = 10,99	0,0008
Subject	1173	18	65,17	F (18, 54) = 1,995	0,0263
Residual	1764	54	32,66		

3.1.3. Post-hoc T-Tests (p-Value korrigiert mittels Bonferroni-Korrektur), (Monomere)

Zeit	Vergleich		M _{Diff}	95% CI	t	adj. p	Signifikanz
0h	Kein Cbl	CN-Cbl	0	-7,82 bis 7,82	0	>0,99	ns
	Kein Cbl	OH-Cbl	0	-7,82 bis 7,82	0	>0,99	ns
3h	Kein Cbl	CN-Cbl	-20,87	-28,68 bis -13,06	6,11	<0,0001	****
	Kein Cbl	OH-Cbl	-3,9	-11,72 bis 3,912	1,14	0,5134	ns
6h	Kein Cbl	CN-Cbl	-8,23	-16,04 bis -0,4110	2,41	0,0371	*
	Kein Cbl	OH-Cbl	-2,3	-10,11 bis 5,518	0,67	>0,999	ns
12h	Kein Cbl	CN-Cbl	-9,94	-17,76 bis -2,128	2,91	0,0095	**
	Kein Cbl	OH-Cbl	-4,12	-11,92 bis 3,709	1,20	0,4660	ns

3.2. CHX: Dimere

3.2.1. Deskriptive Statistik (Dimere)

Zeit	Kein Cbl-Zusatz			Cyanocobalamin			Hydroxycobalamin		
	M	SD	N	M	SD	N	M	SD	N
0h	100	0	7	100	0	7	100	0	7
3h	61,75	6,53	7	80,85	9,15	7	68,85	7,40	7
6h	48,58	4,78	7	57,61	4,38	7	54,21	8,24	7
12h	39,46	3,66	7	50,16	8,85	7	44,83	8,38	7

3.2.2. Ergebnisse der Zweifaktorielle Varianzanalyse (Dimere)

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Time x Treatment	675,5	6	112,6	F (6, 54) = 4,656	0,0007
Time	37298	3	12433	F (3, 54) = 514,2	<0,0001
Treatment	1321	2	660,7	F (2, 18) = 8,418	0,0026
Subject	1413	18	78,48	F (18, 54) = 3,246	0,0004
Residual	1306	54	24,18		

3.2.3. Post-hoc T-Tests (p-Value korrigiert mittels Bonferroni-Korrektur), (Dimere)

Zeit	Vergleich		M _{Diff}	95% CI	t	adj. p	Signifikanz
0h	Kein Cbl	CN-Cbl	0	-7,59 bis 7,59	0	>0,99	ns
	Kein Cbl	OH-Cbl	0	-7,59 bis 7,59	0	>0,99	ns
3h	Kein Cbl	CN-Cbl	-19,1	-26,62 bis -11,58	5,82	<0,0001	****
	Kein Cbl	OH-Cbl	-7,09	-14,61 bis 0,42	2,16	0,0682	ns
6h	Kein Cbl	CN-Cbl	-9,03	-16,55 bis -1,51	2,75	0,0151	*
	Kein Cbl	OH-Cbl	-5,63	-13,15 bis 1,89	1,71	0,1816	ns
12h	Kein Cbl	CN-Cbl	-10,70	-18,22 bis -3,18	3,26	0,0034	**
	Kein Cbl	OH-Cbl	-5,37	-12,89 bis 2,15	1,63	0,2132	ns

a. Lebenslauf - Platzhalter

b. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden in Marburg waren:

Vorklinik

Adamkiewicz, Baranowski, Bette, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Fritz, Kinscherf, Leitner, Lill, Neumüller, Oliver, Oberwinkler, Preisig-Müller, Renigunta, Rost, Sahmland, Stahl, Steiniger, Thieme, Weihe, Westermann, Wrocklage

Klinik

Aigner, Balsler, Bartsch, Bauck, Bauer, Becker, Becker, Bien, Bösner, Brehm, Brinschwitz, Carl, Czubayko, Dellweg, Dettmeyer, Eschbach, Geraedts, Gerken, Görg, Gress, Gress, Groß, Hertl, Hoch, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kerwat, Kircher, Kirschbaum, Klemmer, Klingel, Kömhoff, König, Kruse, Kühnert, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Mann, Mohr, Moll, Mutters, Müller, Neubauer, Nikolaizik, Nimsky, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Rastan, Reese, Renigunta, Renz, Richter, Riemer, Ruchholz, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schratt, Schu, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sevinc, Steuder, Stuck, Sommer, Tackenberg, Thieme, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vorwerk, Wagner, Weber, Wißniowski, Wiesmann, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zentgraf.

c. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich in den letzten Jahren bei der Erstellung der Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Weber und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Kömhoff für die Aufnahme in das Laborteam der Kinderneurologie und dafür, dass sie immer an die Fertigstellung der Arbeit geglaubt haben, auch wenn es mir selbst manch einmal schwer fiel. Herrn Prof. Dr. Kömhoff danke ich zudem für seine sorgfältige Erstkorrektur dieser Arbeit.

Für die fachkundliche Betreuung im Labor möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Aparna Renigunta und Herrn Dr. Elie Seaayfan bedanken – Danke für die viele Zeit, die ihr in das Rätseln über verschobene Bandenhöhen, unglückliche Zellen und unkonventionelle Protokolländerungen gesteckt habt sowie den Enthusiasmus, den ihr geteilt habt, wenn es dann doch funktionierte.

Ohne eine Person wäre ich im Labor ganz und gar verloren gewesen – danke Nadine Schalopp für die gründliche Einarbeitung und das Teilen deiner Fähigkeiten und Fertigkeiten in allen Problemlagen. Durch dich habe ich nicht nur die Kunst des Pipettierens, Zentrifugierens und Zellkultivierens gelernt, sondern auch eine liebe Freundin gewonnen.

Für die Unterstützung, langen Diskussionen und dem Austausch über spannende Paper, verzwickten Ergebnisinterpretationen und dem Teilen von Auf- und Abs danke ich ganz besonders Josch, Lars, Imran, Anna, Maja und Andreas. Zudem möchte ich mich bei Tom, Irma, Michelle, Regina, Christina und Sabrina für die gute Atmosphäre im Labor bedanken.

Ein großer Dank geht an meinen lieben Ehemann Tobias, der durch die zahlreichen Spaziergänge mit unseren Söhnen das Verfassen dieser Arbeit erst möglich gemacht hat. Danke für deine sachlich, nüchterne Art, die kurzzeitigen Anflügen von Verzweiflung nie Raum bot und mir immerzu festen Halt gibt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ein besonders großes Dankeschön geht an meinem lieben Vater für seine jahrelange Unterstützung, das Verständnis und die Korrekturlesearbeiten.

d. Ehrenwörtliche Erklärung