

Zusammenfassung

Gephyrin ist ein multifunktionelles Säuger-Protein mit zwei sehr verschiedenen physiologischen Funktionen: der Clusterung von inhibitorischen Neurorezeptoren in der postsynaptischen Membran von Nervenzellen und der Molybdäncofaktor- (Moco) Biosynthese. Während bei der Moco-Synthese die Insertionsreaktion von Molybdän (Mo) in das Molybdopterin-Grundgerüst in Bakterien die Aktivitäten von zwei Proteinen benötigt, liegen bei Eukaryoten diese Aktivitäten beider Proteine in Multi-Domänen-Proteinen, wie Gephyrin in Säugern und Cnx1 in Pflanzen, vor. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Moco-Synthesefunktion von Gephyrin, mit dem Ziel, die evolutive Relevanz der Fusion beider Domäne in Eukaryoten zu verstehen. Durch die Etablierung eines *in vitro* Assays für die Moco *de novo* Synthese mit gereinigten Proteinen, wurde einerseits die ATP-abhängige Moco-Synthese durch Gephyrin bei physiologischen Molybdat-Konzentrationen nachgewiesen und andererseits eine 60-fach erhöhte Katalyserate der Moco-Synthese in Anwesenheit von Holo-Gephyrin im Vergleich zu den isolierten Einzeldomänen ermittelt. Damit liegen erstmals experimentelle Hinweise vor, dass Produkt-Substrat-Kanalierung in Proteinen des Grundstoffwechsels eine Triebkraft für die Fusion von Proteindomänen in Eukaryoten sein kann, während diese Funktionen in Bakterien durch separate Proteine übernommen werden. Gephyrin wird zudem gewebespezifisch in verschiedenen Isoformen exprimiert, die sich meist durch die Insertion von Spleiß-Kassetten in der Gephyrin-spezifischen C-Domäne unterscheiden. Einen Einfluss der C-Domäne auf die Moco-Funktion von Gephyrin wurde bis jetzt nicht gezeigt. Durch die experimentelle Untersuchung von drei Gephyrin Spleiß-Varianten in dieser Arbeit konnten jedoch Hinweise auf eine strukturelle Beteiligung der C-Domäne an der Orientierung der G- und E-Domänen im Holo-Protein erbracht werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Molybdäncofaktor-Defizienz (MoCD). Dabei wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde aufgrund der schwierigen Diagnose von MoCD eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von S-Sulfocystein (SSC) entwickelt, da SSC im Urin von MoCD-Patienten akkumuliert. Die SSC-Quantifizierungsmethode wurde im Laufe dieser Arbeit validiert. Zudem wurde eine hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit erreicht, die einen erfolgreichen Einsatz bei der Diagnose von MoCD sowie der täglichen Bestimmungen von SSC in therapierten MoCD-Patienten ermöglichte. Als Zweites wurde auf Grund des ähnlichen Symptomenverlaufs der MoCD und Sulfitoxidase- (SO) Defizienz, eine Enzym-Ersatztherapie mit der pflanzlichen SO (PSO) etabliert und untersucht. PSO-behandelte Moco-defiziente Mäuse zeigten keine MoCD-typischen Symptome, zudem wurde eine Verlängerung ihrer mittleren Lebenserwartung erreicht. Eine vollständige Heilung der behandelten Mäuse war jedoch nicht möglich. Vermutlich starben die Mäuse am Tag 16 der Ersatztherapie an akkumuliertem Wasserstoffperoxid, das während der PSO-Reaktion generiert wurde. Zum Vergleich wurden Varianten der humanen und murinen SO-Proteine generiert, die keine Cytochrom-b₅-Domäne tragen. Nach erfolgreicher Expression, Reinigung und kinetischer Charakterisierung wurde die Fähigkeit der generierten SO-Varianten, Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor zu benutzen, überprüft und bestätigt. Als Basis für die Entwicklung einer potentiellen Enzym-Ersatztherapie für MoCD, könnten diese SO-Varianten nach PEGylierung gemeinsam mit humaner Katalase, die hier ebenfalls exprimiert und gereinigt wurde, verwendet werden. Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der humanen Cysteine-Dioxygenase (CDO). Die Inhibition der CDO soll als mögliche Strategie der Sulfitreduktion in MoCD-Patienten dienen. Nach erfolgreicher Expression und kinetischer Charakterisierung der CDO konnte ein Hochdurchsatzassay entwickelt werden, mit dessen Einsatz potentielle Inhibitoren identifiziert und der Zusammenhang der Cystein-Anreicherung mit neurodegenerativen Erkrankungen untersucht werden kann.